



**Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología**

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados en  
Odontología “Dr. Keisaburo Miyata”**

**Análisis de toxicidad y efecto inhibitorio de microorganismos  
mediante la adición de nanopartículas de óxido de zinc y plata  
en polimetilmetacrilato**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Odontológicas**

**Presenta:**

**E.O.P. Areli Jocabed Villagrán Villegas**

**Director de Tesis:**

**Dr. en C. S. Ulises Velázquez Enríquez**

**Codirector de Tesis:**

**Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis**

**Dr. en C. S. René García Contreras**



**2022-2026**

**Toluca, Estado de México, noviembre de 2022**

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Introducción .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. Antecedentes .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1.1 Polimetilmetacrilato (PMMA) .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.2 Clasificación.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.2. 2 PMMA de autopolimerización .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Manipulación – procesamiento .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.4 Propiedades del PMMA .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.4.1 Propiedades biológicas .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.4.2 Propiedades físicas .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>1.4.3 Propiedades mecánicas.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.4.4 Propiedades químicas .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.4.5 Aplicaciones del PMMA.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.4.6 PMMA y la adhesión microbiana .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.5 Estomatitis protésica.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.6 Candida albicans .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.6.1 Candida albicans y su interacción con nanopartículas .....</b>                   | <b>16</b> |
| <b>1.7 Streptococcus mutans .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.8 Nanotecnología .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.8.1 Nanomateriales .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.8.2 Síntesis .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.8.3 Caracterización .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.8. 4 Absorbancia .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>1.8. 5 Microscopía electrónica de barrido /SEM (Scanning Electron Microscope).....</b> | <b>21</b> |
| <b>1.9 Mecanismo de acción de nanopartículas.....</b>                                     | <b>21</b> |
| <b>1.10 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) .....</b>                                | <b>22</b> |
| <b>1.10.1 Mecanismo de acción.....</b>  | <b>23</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.11 Nanopartículas de plata (AgNPs)</b> .....                 | <b>24</b> |
| <b>1.11.1 Mecanismo de acción</b> .....                           | <b>24</b> |
| <b>1.12 Cultivos celulares primarios</b> .....                    | <b>26</b> |
| <b>1.12.1 Inmunohistoquímica</b> .....                            | <b>27</b> |
| <b>1.12.2 Toxicidad</b> .....                                     | <b>27</b> |
| <b>1.13. Microbiología</b> .....                                  | <b>28</b> |
| <b>1.13. 1 Bacterias y crecimiento en medios de cultivo</b> ..... | <b>28</b> |
| <b>1.13. 2 Aislamiento de microorganismos</b> .....               | <b>28</b> |
| <b>1.13.3 Cultivo en placa</b> .....                              | <b>29</b> |
| <b>1.13. 4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</b> .....    | <b>29</b> |
| <b>1.13. 5 Ensayos de evaluación de efecto inhibitorio</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>1.14 Ensayos de biocompatibilidad, ensayo de MTT</b> .....     | <b>29</b> |
| <b>2. Planteamiento del Problema</b> .....                        | <b>32</b> |
| <b>3. Justificación</b> .....                                     | <b>34</b> |
| <b>4. Hipótesis</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>5. Objetivos</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>6. Materiales y métodos</b> .....                              | <b>37</b> |
| <b>6.1 Diseño del estudio</b> .....                               | <b>37</b> |
| <b>6.2 Universo:</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>6.3 Muestra:</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>6.4 Criterios de selección</b> .....                           | <b>38</b> |
| <b>6.5 Variables</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>6.6 Procedimiento</b> .....                                    | <b>40</b> |
| <b>6.7 Consideraciones Bioéticas</b> .....                        | <b>49</b> |
| <b>6.8 Análisis Estadísticos</b> .....                            | <b>49</b> |
| <b>7. Resultados</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>8. Discusión</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>9. Conclusiones</b> .....                                      | <b>59</b> |
| <b>10. Referencias</b> .....                                      | <b>61</b> |
| <b>11. Anexos</b> .....   | <b>68</b> |

## Resumen

**Introducción:** El polimetilmetacrilato (PMMA) utilizado en prótesis para la rehabilitación de pacientes edéntulos o parcialmente edéntulos, niños con aparatología fija o removible y pacientes con trastornos articulares, ha sido el material de primera elección por su fácil manejo y fácil adaptación en las estructuras orales, aunque a su vez es un importante colonizador del ambiente oral. **Objetivo:** Evaluar cuantitativamente el nivel de citotoxicidad que se ejerce sobre fibroblastos gingivales humanos (HGF) y células madre de papila apical (SCAP), así como la adhesión de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y *Candida albicans* (*C. albicans*) en PMMA autoporimerizable adicionado con recubrimiento de ZnO y AgNPs. **Métodos:** Se confeccionaron 108 de muestras de PMMA de 3 marcas comerciales (Opti-Cryl™, Nic-Tone™ y Lang™) posteriormente se realizó una síntesis química por el método de T. Bala para el recubrimiento de nanopartículas con precursor de óxido de zinc (Acetato de Zinc, Fagalab) y plata (Sales de plata, Fagalab 2276). Se obtuvieron 54 muestras de 5 x 2 mm y se inocularon en HGF y SCAP, y 54 muestras de 10 x 2 mm éstas se inocularon en caldo de cultivo de *S. mutans* y *C. albicans*, evaluandolas a través del ensayo de reducción de sales de tetrazolio- MTT (bromuro de 3-[4-5-dimetiltiazol-2-ii]-2,5-difeniltetrazolio).

A su vez se llevo a cabo el método de difusión en disco con soluciones de la síntesis de ZnO y AgNPs en caldo de cultivo de *C. albicans* y *S. mutans*, evaluando el efecto inhibitorio de la solución química de ZnO y AgNPs a través de la medición de los halos de inhibición, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El análisis estadístico se efectuó mediante pruebas de normalidad, Shapiro-Wilk para realizar la prueba de ANOVA de un factor y post-hoc de Tukey con un valor de  $p \leq 0.05$  para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

**Resultados:** Los HGF y SCAP en contacto directo con PMMA demostraron de baja a nula viabilidad celular, por otro lado la adhesión de microorganismos presento efecto inhibitorio en PMMA con NPs comparado con los grupos control.

**Conclusiones:** El recubrimiento de ZnO y AgNPs cumple con la propiedad antibacteriana y antifúngica pero son necesarios más estudios en modelos celulares para su aplicación clínica.

## Introducción

La cavidad oral es uno de los reservorios con mayor proliferación y variabilidad microbiana, es importante conservar el equilibrio entre estos organismos ya que, al presentar una disbiosis fácilmente se desarrolla biopelícula patógena que aumenta la posibilidad de desarrollar múltiples enfermedades. Entre los organismos más sobresalientes que participan en este proceso son el *Streptococcus mutans*, una de las bacterias con mayor participación en el proceso de caries dental y, por otro lado, *Candida albicans* hongo oportunista responsable de la estomatitis tipo II.

Estas especies microbianas son ampliamente recomendadas para probar la eficacia de terapias antisépticas. <sup>1</sup>

El polimetilmetacrilato (PMMA) es uno de los materiales más utilizados para la creación de prótesis orales que, utilizado en poblaciones vulnerables como adultos mayores, pacientes medicamente comprometidos, niños y personas sin las indicaciones adecuadas de higiene, se convierte en un huésped de fácil colonización para microorganismos como *C. albicans* entre otros, formando un microbioma oral patógeno. <sup>2</sup>

Existen diversos métodos para combatir o contrarrestar la proliferación de estos microorganismos, desde cambios en la alimentación, cambio en el tipo de medicación por efectos en la disminución salival, enjuagues y tratamiento farmacológico, este último con el daño consecuente de la creación de resistencia bacteriana por parte del usuario, lo que conduce a un ciclo de intervenciones para contrarrestar la recurrencia de este microorganismo, por lo que es de gran importancia en la práctica odontológica tener alternativas para combatir microorganismos patógenos. <sup>3,4</sup>

La nanotecnología aplicada en materiales dentales, ha surgido como un gran e importante recurso para combatir a microorganismos patógenos como el *S. mutans* y *C. albicans*, esto se debe a la capacidad inhibitoria que poseen, en este sentido las ZnO y AgNPs puede ser incorporadas al PMMA para cumplir dicha función inhibitoria,<sup>2,3</sup> aunque en la actualidad por la popularidad de su uso, es importante

estudiar las implicaciones de esta adición y de su interacción con biomoléculas y microorganismos.<sup>5</sup>

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es el evaluar la citotoxicidad y efecto antimicrobiano del PMMA posterior a la adición de ZnO y AgNPs.

## 1. Antecedentes

El polimetilmetacrilato o polimetacrilato de metilo (PMMA) es un polímero inodoro de ácido acrílico que Redtenbacher informó por primera vez en 1884, su aplicación biomédica fue gradual, en 1937 se introdujo al mercado en forma de polvo para la fabricación de bases de dentaduras.

A partir de la década de 1940 se convirtió en un biomaterial esencial para laboratorios y clínicas dentales, en 1945 el PMMA curado en frío estuvo disponible comercialmente, para 1946 ya era el material líder para la realización de dentaduras postizas, en 1950 se utilizó para la cementación de prótesis de huesos femorales, para 1950 y 1960 se diversificó su uso en odontología, que iba desde prótesis, coronas provisionales y prótesis maxilofaciales. El PMMA por sus propiedades de fácil procesamiento, propiedades mecánicas aceptables, estética, rentabilidad y toxicidad relativamente baja reemplazó otros materiales.<sup>6</sup>

Sin embargo presenta afinidad para el depósito de formación de biopelícula dental en su superficie,<sup>7</sup> las cuales mantienen su integridad estructural y pueden generar resistencia a los agentes antimicrobianos sistémicos y tópicos sino se se elimina el reservorio primario, presentando así reincidencia de la infección.<sup>3,8</sup>

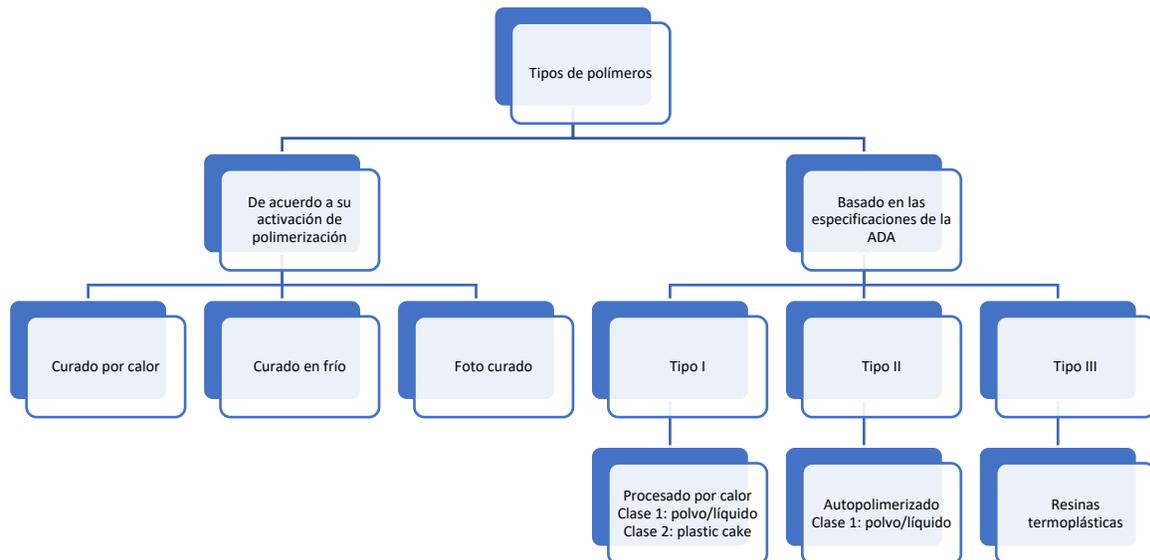
Se han implementado diversos enfoques para inhibir y controlar la formación de biopelícula patógena, uno de los que han adquirido popularidad es la implementación de nanopartículas, las cuales se han utilizado con la finalidad de mejorar las propiedades físicas y químicas del PMMA.<sup>6</sup>

## 1.1 Polimetilmetacrilato (PMMA)

El PMMA poli [1- (metoxi carbonil) -1- metil etileno] es un polímero sintético preparado mediante la adición y polimerización de radicales libres de metacrilato de metilo ( $C_5O_2H_8$ )<sub>n</sub>.

El proceso de polimerización, se produce a través de una serie de reacciones químicas por las cuales se forma la macromolécula o polímero, a partir de un gran número de moléculas conocidas como monómeros, el proceso se inicia y activa generando un radical libre ya sea químicamente o con energía (como calor, luz visible, luz ultravioleta).<sup>6, 9</sup>

De acuerdo con la especificación no. 12 de la Asociación Dental Americana (ADA, por sus siglas en inglés), los polímeros para base de dentaduras se clasifican en varios tipos:



Los tipos I, II y III (de acuerdo a las especificaciones de la ADA), la norma ISO 20795-1-2013 incluyen polímeros activados por luz (Tipo IV) y polimerizados por microondas (Tipo V).<sup>6</sup>

## **1.2 Clasificación**

De acuerdo a su activación por polimerización el PMMA se clasifica en varios tipos, como:

5. PMMA polimerizado por microondas
6. PMMA fotopolimerizado
7. PMMA de polimerización en calor
8. PMMA de autopolimerización

### **1.2 .1 PMMA de polimerización en calor**

Se encuentra en el mercado en forma de polvo y líquido y se usa comunmente para fabricar bases de dentaduras y prótesis removibles. El polvo de PMMA contiene un iniciador de peróxido de benzoilo, un plastificante (ftalato de dibutilo), opacificantes (óxido de titanio y óxido de zinc), fibras, pigmentos o tintes, el componente líquido contiene monómero de metacrilato de metilo (MMA), dimetiacrilato de etilenglicol como agente reticulante e hidroquinona como agente inhibidor. El desarrollo de la polimerización comienza con la unión de ambos componentes y necesita energía térmica para activar el iniciador, siendo el objetivo del ciclo de calentamiento el lograr un alto grado de polimerización y disminuir los monómeros residuales en la prótesis polimerizada. <sup>6</sup>

### **1.2. 2 PMMA de autopolimerización**

Se encuentra en la misma presentación que el anterior y no requiere de energía térmica para su proceso de polimerización, se agrega un iniciador de amina terciaria como dimetil-p-toludina al PMMA, que activa el peróxido de benzoilo, generando químicamente radicales libres para iniciar la polimerización. El proceso de polimerización es notablemente más bajo que el que se realiza por calor, dejando monómeros residuales sin polimerizar en el material, que tienden a filtrarse. Entre sus ventajas éste presenta mejor estabilidad dimensional y adaptación, presentando menor contracción de polimerización, pero menor grado de polimerización, lo que

compromete las propiedades mecánicas, como la resistencia y dureza. Por otro lado, el iniciador de amina se oxida con el tiempo, lo que resulta en una decoloración, una estabilidad de color deficiente y una temperatura de transición vítrea más baja. Debido a estas desventajas, los materiales de PMMA se utilizan solo para fabricar cucharillas personalidas, aparatología para ortopedia maxilar en odontopediatría, ferulas oclusales, prótesis parciales provisionales y para reparación de prótesis removibles, etc. <sup>6</sup>

### **1.3 Manipulación – procesamiento**

Generalmente las fórmulas de PMMA se suministran en polvos poliméricos y líquidos monoméricos incoloros, la reacción exotérmica comienza con la mezcla de polvo y líquido del PMMA, con el proceso típico de polimerización de iniciación, activación, propagación y terminación. Para evitar discrepancias, es necesario utilizar la proporción recomendada de polvo y líquido de PMMA (2. 5:1 w/v o 3-3.5:1 v/v).

Por otro lado, de acuerdo a su consistencia, la manipulación de la mezcla se puede dividir en varias etapas, arenosa, pastosa fibrosa, gomosa y rígida, a las que les sigue el relleno y acabado de las bases de prótesis, a su vez el PMMA no debe crear vapores tóxicos ni polvo durante su procesamiento, debe ser sencillo de incorporar, insertar, moldear y polimerizar, con un tiempo de fraguado relativamente corto y ser insensible a las variaciones en estos procesos de manipulación. <sup>6,9</sup>

### **1.4 Propiedades del PMMA**

El PMMA para su correcta función debe cumplir con propiedades químicas, biológicas, físicas, mecánicas, térmicas, dimensionales, biofuncionales y de biocompatibilidad. <sup>6, 10</sup>

### 1.4.1 Propiedades biológicas

Lo ideal es que el PMMA cumpla con la propiedad de biocompatibilidad, la cual es la propiedad biológica más importante, es la capacidad de un material para funcionar en un entorno biológico con una respuesta favorable del huésped y la biofuncionalidad implica que el material no debe ejercer ningún efecto adverso sobre los tejidos, siendo biocompatible sin causar irritación, toxicidad o mutagenicidad en los tejidos orales.

El PMMA deberá ser insípido, inodoro, no tóxica y no ser irritante al entrar en contacto con tejidos orales, para cubrir estos requerimientos, debe ser insoluble con saliva y con cualquier otro fluido que esté en boca, también debe ser impermeable a los fluidos orales para ser higiénica y lo menos desagradable en cuanto a sabor y olor.<sup>9</sup>

Se ha informado que la presencia de monómeros residuales o sin polimerizar en la base de la prótesis esta asociado a irritación de la mucosa, inflamación del tejido y citotoxicidad.<sup>6, 10</sup>

Esta propiedad se rige bajo la normativa del documento no. 41 de la ANSI/ADA sobre la evaluación biológica de los materiales dentales, en estas se incluyen las pruebas *in vitro* de citotoxicidad, la lisis de la membrana de los glóbulos rojos, la mutagenesis y la carcinogénesis, así como pruebas en animales, también por el documento de la ISO 10993 la cual es la norma sobre la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales, en la norma se abordan dos tipos de pruebas: las pruebas iniciales sobre toxicidad, sensibilización y toxicidad sistémica (*in vitro*) y las pruebas complementarias sobre toxicidad crónica, carcinogenicidad y biodegradación (animales o personas).

La normalización de las pruebas de biocompatibilidad de los materiales dentales ha supuesto un gran apoyo para el estudio de la biocompatibilidad, así como para proteger al usuario, representando un compromiso para los fabricantes, académicos y usuarios.<sup>9</sup>

### **1.4.2 Propiedades físicas**

La sorción que es la captación de agua o fluidos orales, se da debido a la polaridad molecular, en esta las moléculas de agua se infiltran a través de las cadenas poliméricas actuando como plastificantes, pueden conducir a la expansión del material afectando la estabilidad dimensional así como la solubilidad, éstas deben mantenerse al mínimo, según la ISO 20795-1 deben ser inferiores a 32 y 1.6  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . La conductividad térmica sirve para conducir adecuadamente la temperatura de los alimentos a los tejidos orales de los pacientes, está es baja en el PMMA ( $5,7 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). La alta estabilidad de color y contracción por polimerización (lineal o volumétrica) son otras de las propiedades a considerar, esta última puede provocar cambios dimensionales notables e imprecisiones durante la fabricación de la prótesis. <sup>6</sup>

### **1.4.3 Propiedades mecánicas**

Son la resistencia a la flexión, al impacto, a la fractura y dureza superficial.

La base de la prótesis debe tener una resistencia a la flexión para soportar las complejas fuerzas de la masticación sin deformación permanente o fractura y se evalúa de acuerdo a las directrices de la norma ISO 20795-1 en esta el PMMA debe tener la capacidad de soportar tensiones de tracción, compresión y cizallamiento. <sup>6</sup>

### **1.4.4 Propiedades químicas**

Idealmente, los materiales de PMMA deberían ser altamente insolubles y no reactivos a los fluidos orales y nutrientes, así como lograr una correcta unión con los dientes artificiales, estos son resinas orgánicas que son insignificadamente solubles en agua, sin embargo, su solubilidad es alta en solventes orgánicos (como cetonas y ésteres). De manera similar, las soluciones alcohólicas actúan como plastificantes y pueden reducir la temperatura de transición vítrea.

Debe evitarse el almacenamiento o la limpieza de prótesis dentales con soluciones alcohólicas. Aunque no reaccionan químicamente con el agua, el almacenamiento

repetitivo en agua puede provocar cambios dimensionales o agrietamiento debido a la sorción y secado cíclico del agua. Los agentes de reticulación (como el dimetacrilato de etilenglicol y el dimetacrilato de 1,4-butilenglicol) se agregan comúnmente al PMMA, estos son beneficiosos al reducir la tendencia del PMMA a solubilizarse en disolventes orgánicos y mejorar su resistencia al agrietamiento. Además, los reticulantes disminuyen la formación de capas de inhibición de oxígeno y monómeros residuales en materiales polimerizados.

De acuerdo con la norma ISO 20795-2 la liberación de monómero residual (MR) para PMMA de ortodoncia no debe exceder el 5 % en peso, controlar la liberación de MR es de gran importancia de acuerdo a lo reportado por sus efectos secundarios en las mucosas orales, se sugiere que en PMMA autopolimerizable se realice un proceso de inmersión en agua durante 24 h y en PMMA termopolimerizable una inmersión en agua a 50° C durante 60 min con la intención de disminuir la liberación de MR. <sup>11</sup>

#### **1.4.5 Aplicaciones del PMMA**

Sus uso abarcan campos como ingeniería, salud y odontología. Además de las prótesis orales, en odontología se incluye la fabricación de dientes, cucharillas de impresión, coronas temporales, obturadores para paladares hendidos, férulas oclusales, modelos impresos, muñones para la planificación de un tratamiento, rebase y reparación de prótesis, aparatología removible, como retenedores, planos de mordida, aparatos miofuncionales, protectores de mordida y férulas oclusales. <sup>6</sup>

#### **1.4.6 PMMA y la adhesión microbiana**

Los biofilms microbianos son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie viva o inerte en un ambiente acuoso que está rodeado de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), el cual es sintetizado por las células microbianas y consta de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y en algunos casos de ADN extracelular. Estas sustancias forman una red que influye en la porosidad, contenido de agua, carga, sorción, hidrofobicidad y estabilidad mecánica de las

biopelículas, además la matriz extracelular brinda nutrientes para las células de los biofilms. Las biopelículas orales son polimicrobianas y están constituidas por más de 700 especies de diferentes microorganismos y su composición puede variar de acuerdo a los diferentes sustratos de la cavidad oral. En un entorno bucal sano, existe un equilibrio entre las células del biofilm y el huésped humano, sin embargo, la acumulación de estos con levaduras y bacterias puede conducir al desarrollo de enfermedades como caries, periodontitis, estomatitis inducida por el uso de prótesis, periimplantitis e infecciones endodónticas, este tipo de células son diferentes a las células planctónicas, ya que estas exhiben mayor resistencia a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del huésped. Por lo tanto el control de éstas es crucial para prevenir enfermedades y mantener la homeostasis en la cavidad oral. <sup>1,6</sup>

Desde el punto de vista clínico el PMMA es una herramienta importante en la rehabilitación oral, ya que mejora la función masticatoria, tiene propiedades estéticas, fonéticas y mecánicas aceptables, mejora la calidad de vida, es de fácil procesamiento, fabricación económica, estabilidad en el medio bucal, nula toxicidad, gran capacidad de estética, combinación de colores adecuada, sin embargo, la gran desventaja es la facilidad de depósito de formación de biopelícula dental en su superficie, actualmente se trabaja en la composición química de los materiales o en la producción de una capa hidrofílica en su superficie, destinada a interrumpir la formación de biopelículas. <sup>3, 7, 8, 12, 13</sup>

Una característica principal y favorecedora para la acumulación de biopelícula es la porosidad del PMMA, ya que la inestabilidad dimensional de este material durante la fase de curado por calor convencional aumenta el número de poros en la matriz del PMMA convirtiéndose en una superficie adecuada para los microorganismos. <sup>2,</sup>

## 1.5 Estomatitis protésica

Las comunidades polimicrobianas en la cavidad bucal se presentan como biopelículas, éstas comprenden bacterias y levaduras, y pueden provocar infecciones dentales, la prevención de estas infecciones se logra mediante la eliminación mecánica de biopelículas de los tejidos duros de la boca, a menudo complementada con agentes antimicrobianos adyuvantes.<sup>3, 15</sup> Sin embargo, estas biopelículas mantienen su integridad estructural y pueden generar resistencia a los agentes antimicrobianos sistémicos y tópicos ya que no se elimina el reservorio fúngico primario que es la prótesis contaminada, presentando así reindigencia de la infección.<sup>3, 15</sup>

La estomatitis protésica (EP) es una reacción inflamatoria que se produce principalmente por una infección fúngica por *C. albicans*. De acuerdo a Newton, Silva Pinto *et al.*, la EP se clasifica en 3 tipos de acuerdo al área de aparición: petequias dispersas en la mucosa palatina (tipo I); eritema difuso (tipo II); e hiperplasia papilar con eritema difuso (tipo III).

Muchos factores contribuyen a la aparición de esta condición, como el uso de prótesis mal adaptadas, su uso continuo, el tipo de material, alguna condición sistémica del paciente (p. ej. inmunoterapia, VIH, diabetes, etc), pacientes condicionados al uso de terapias medicamentosas (más de 400 de los medicamentos que consumen pueden llevar a reducir la secreción salival), por otro lado, la falta de destreza en la higiene o indicaciones incorrectas promueven la formación de ésta biopelícula conduciendo al desarrollo de estomatitis, neumonía o fungemia sistémica poniendo en peligro la vida del paciente.<sup>2, 3, 7, 15</sup>

También las propiedades superficiales del material base de la prótesis, como la rugosidad y dureza de la superficie, pueden tener una influencia significativa en la incidencia de EP.<sup>15</sup>

La base de la dentadura es un puerto para la colonización microbiana; por lo tanto, un material de base para prótesis que resista la adhesión y proliferación de *C. albicans* podría reducir la incidencia de EP. Se han implementado diferentes enfoques para inhibir y controlar la EP, como la aplicación tópica de agentes

antifúngicos, la modificación de la superficie de la base de la prótesis y la incorporación de agentes antimicrobianos en la resina base de la dentadura.<sup>15</sup>

Agentes antifúngicos orales para el tratamiento de la EP, como fluconazol, nistatina, anfotericina B, miconazol, ketoconazol, itraconazol y clotrimazol son efectivos en el tratamiento de la EP, pero sus inconvenientes incluyen efectos secundarios tóxicos y el desarrollo de cepas resistentes.<sup>15, 16</sup>

## **1.6 *Candida albicans***

Las especies de *Candida* tienen una afinidad muy fuerte por la superficie de la base acrílica debido a su naturaleza específica pero también a sus propiedades hidrofóbicas, también la rugosidad de la superficie influye directamente en la adherencia inicial de los microorganismos a las superficies, el desarrollo de biopelículas y colonización de *C. albicans*, en la pared celular de *Candida* existen adhesinas, principalmente manoproteínas, responsables de la adhesión a las células huésped.<sup>2, 5</sup>

### **1.6.1 *Candida albicans* y su interacción con nanopartículas**

Los NPs de Ag envuelven las células de *C. albicans* provocando la ruptura de la membrana fúngica y la inhibición del proceso de gemación normal. Los iones de plata (Ag<sup>+</sup>) se liberan en el medio acuoso desde la resina acrílica para ejercer su influencia antifúngica.<sup>15</sup>

## **1.7 *Streptococcus mutans***

La caries dental continua siendo de las enfermedades orales más comunes y dependientes de biopelículas, provocando la destrucción de la estructura dental por el ataque ácido de bacterias cariogénicas como el *S. mutans*, componente clave de la patogénesis el cual es su capacidad de producir grandes cantidades de glucanos y ácidos que exceden la capacidad amortiguadora de la saliva, es capaz de unirse a los dientes y sobrevivir en un ambiente ácido.

Estas bacterias suelen estar presentes como agregados de células de microorganismos unidas entre sí, en una matriz extracelular y firmemente unidas a la superficie del diente. <sup>17, 18, 19</sup>

La caries es una enfermedad dinámica y específica del sitio que implica la destrucción de la estructura dental, como resultado de un desequilibrio en el equilibrio fisiológico entre los iones minerales presentes en la estructura dental y la placa implicando procesos de desmineralización y remineralización. <sup>19</sup>

## **1.8 Nanotecnología**

El término “nanotecnología” fue introducido por primera vez por el Dr. Richard Feynman en 1959 y lo describe como el uso de materiales con propiedades mecánicas y químicas mayores a las utilizadas a gran escala. <sup>4, 20</sup>

La nanotecnología y nanociencia abarcan el estudio de fenómenos y materiales, la manipulación de estructuras, dispositivos y sistemas existentes a nano escala, con dimensiones inferiores a 100 nm. El tamaño de las nanopartículas es similar al de la mayoría de las moléculas y estructuras biológicas, lo que las convierte en candidatas interesantes para aplicaciones en investigación biomédica tanto *in vivo* como *in vitro*.

Las propiedades de las nanopartículas han creado la posibilidad de desarrollar muchos productos innovadores y ampliar la gama de sus aplicaciones, su incorporación puede mejorar las propiedades ópticas, químicas, eléctricas y mecánicas de los compuestos. <sup>5, 7, 21, 23</sup>

Por lo tanto, la nanotecnología se ha convertido en una potente ayuda para diversas aplicaciones médicas y dentales, incluida la remineralización dental, la regeneración de tejidos blandos y duros, la anestesia local, los sistemas de administración de fármacos, ortodoncia, problemas de hipersensibilidad, el tratamiento de la enfermedad periodontal y la caries dental. <sup>4, 13, 20, 21</sup>

La nanotecnología también desempeña un papel importante en los equipos utilizados por los odontólogos, como las unidades de polimerización con luz LED (*light-emitting diode*), la protección de los tejidos duros dentales contra los

alimentos que contienen ácido, caracterización de materiales dentales, entre otros.

20

Para la aplicación de nanopartículas en sistemas biológicos, la biocompatibilidad es una característica esperada, el observar las respuestas con las dosis aplicadas ayudará a precisar la cantidad apropiada de nanopartículas a administrar, en términos de toxicidad media y los límites de exposición humana para prevenir cualquier efecto secundario. <sup>5</sup>

Para la creación de materiales nanométricos, esta se puede dar mediante dos estrategias: la estrategia de molienda del material a granel (método *top-down*) o de síntesis a partir de la nucleación con el subsiguiente crecimiento de las partículas mediante condensación y/o coagulación (método *bottom-up*) estos métodos son los más comunes en la fabricación de nanomateriales y se pueden llevar a cabo en fase líquida o coloidal. <sup>20</sup>

### **1.8.1 Nanomateriales**

Son materiales a nanoescala, es decir, los nanomateriales tienen propiedades únicas, de naturaleza física y química.

Los nanomateriales, a menudo también llamados nanoestructuras, pueden clasificarse por su dimensión, las nanoestructuras de dimensión cero son nanopartículas, y las nanoestructuras unidimensionales son nanocables y nanovarillas, las películas delgadas son nanoestructuras bidimensionales. <sup>20</sup>

Entre las nanopartículas se encuentran los óxidos metálicos que son valiosos no solo por su amplia variedad de propiedades físicas y químicas, sino también por su efecto antibacteriano. <sup>8</sup>

Las nanopartículas (NPs) incluyen partículas esféricas, cúbicas o en forma de aguja con un rango de tamaño nanométrico, las NPs metálicas, incluidos los óxidos y las NPs orgánicas incorporadas con polímeros o recubiertas sobre superficies de diferentes biomateriales, pueden tener numerosas aplicaciones dentales. <sup>4</sup>

Actualmente incluyen nanoporos, nanotubos de carbono, nanocápsulas, nanoanillos, nanoesferas y dendrímeros. El diámetro más pequeño de las NPs

mejora no solo sus propiedades mecánicas, sino también su acción antimicrobiana debido a su alta relación superficie:volumen. <sup>4</sup>

### **1.8.2 Síntesis**

Un gran desafío en nanotecnología es la síntesis controlada y decidida de nanomateriales y nanoestructuras.

Los métodos para sintetizar nanomateriales son muy amplios y dependen de varios factores, como la dimensión de los materiales creados (0D, 1D, 2D, 3D) y la clase de material producido.

El tipo de nanomaterial más utilizado en odontología y un denominador común en los nanomateriales dentales son las nanopartículas de tipo 0D.

Los métodos de síntesis de nanopartículas dependen de la clase de material a la que pertenece la partícula: metal, cerámica o polímero. Las nanopartículas se pueden sintetizar en fase sólida, líquida o gaseosa y dependiendo del método de síntesis se obtendrá una forma irregular o regular y distribuciones de tamaño de partícula anchas o estrechas. <sup>20</sup>

### **1.8.3 Caracterización Espectroscopía UV-vis (Ultravioleta-visible)**

Las primeras observaciones de medición de nanopartículas se realizaron durante principios de la década del siglo XX, asociadas principalmente con Zsigmondy, quien realizó estudios detallados de nanomateriales, en tamaños de hasta 10 nm. Realizar la caracterización se vuelve un proceso imperativo para asegurarse de trabajar con materiales que estén a escala nanométrica. Cada material tiene un comportamiento diferente por lo que es crucial que el análisis se realice con la técnica adecuada. <sup>1</sup>

La espectroscopía UV-vis es una técnica analítica rápida, muy útil y confiable que mide la absorbancia o transmitancia de la luz, para la caracterización primaria de nanopartículas sintetizadas que también se utiliza para monitorear la síntesis y estabilidad de diversas nanopartículas, entre ellas las AgNPs. Esta es un tipo de

espectroscopia de absorción en la que se ilumina una muestra con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en el rango ultravioleta (UV) y visible (VIS) aunque la longitud de onda oscila entre 100 y 380 nm y la componente visible sube hasta los 800 nm, la mayoría tiene un rango de trabajo entre 200 y 1100 nm. Dependiendo la sustancia, esta absorbe la luz y la luz que viaja a través de los medios se transmite y se refleja, refractada por los cristales, así los compuestos con diferencias de energía se absorben en diferentes longitudes de onda registrándose mediante un instrumento adecuado. <sup>24</sup>

Las AgNPs tienen propiedades ópticas únicas que las hacen interactuar fuertemente con longitudes de onda de luz específicas. Es rápida, fácil, simple, sensible, selectiva para diferentes tipos de NPs, solo necesita un período corto de tiempo para la medición y, finalmente, no se requiere calibración para la caracterización de partículas de suspensiones coloidales. En AgNPs, la banda de conducción y la banda de valencia se encuentran muy cerca una de la otra en la que los electrones se mueven libremente. Estos electrones libres dan lugar a una banda de absorción de resonancia de plasmones superficiales (SPR), que se produce debido a la oscilación colectiva de electrones de nanopartículas de plata en resonancia con la onda de luz. La absorción de las AgNPs depende del tamaño de las partículas, el medio dieléctrico y el entorno químico. La observación de este pico, asignado a un plasmón superficial, está bien documentada para varias nanopartículas metálicas con tamaños que van desde 2 a 100 nm. <sup>25</sup>

#### **1.8. 4 Absorbancia**

Las nanopartículas plasmónicas se utilizan en una amplia gama de aplicaciones, debido a esto se requiere de procesos de caracterización. Aunque existen diversos métodos, no hay un método unificado para evaluar la estabilidad coloidal de las NPs plasmónicas. La eficacia de cada aplicación está intrínsecamente ligada a su estabilidad en suspensión, aunque pequeños cambios en la solución (concentración de la sal de fondo, temperatura, pH) o cambios en las NPs (recubrimiento o concentración de la superficie) pueden afectar su estabilidad. <sup>26</sup>

La lectura de estas nanopartículas se pueden determinar por medio de la lectura de UV-vis, en el que se mide la absorbancia, también conocida como densidad óptica (DO) es la cantidad de luz que absorbe un objeto, esta corresponde a la excitación electrónica en el objeto. <sup>24</sup>

### **1.8. 5 Microscopía electrónica de barrido /SEM (*Scanning Electron Microscope*)**

A diferencia del TEM (microscopio electrónico de transmisión) tiene menor poder de resolución, éste utiliza piezas sólidas y permite la percepción de proyecciones tridimensionales, un haz electrónico barre la muestra y los electrones producidos desde la superficie sirven para reconstruir una representación tridimensional de la superficie. <sup>27</sup>

Es un método de imagen de superficie, capaz de identificar diferentes tamaños de partículas, distribuciones de tamaño, formas de nanomateriales y la morfología de la superficie de las partículas sintetizadas en micro y nanoescala, también se puede sondear la morfología de las partículas y obtener un histograma a partir de las imágenes, ya sea midiendo y contando las partículas manualmente o utilizando un software específico. La combinación de SEM con espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDX) se puede utilizar para examinar la morfología del polvo de plata y también realizar análisis de composición química. La limitación de SEM es que no puede analizar la estructura interna, pero puede proporcionar información sobre la pureza y el grado de agregación de nanopartículas. <sup>25</sup>

### **1.9 Mecanismo de acción de nanopartículas**

La nanoterapia ofrece la posibilidad de controlar las biopelículas utilizando las propiedades biocidas de las nanopartículas.

Tras su aplicación, las NPs dañan las membranas celulares, perjudicando la acción de los microorganismos. Esta propiedad antimicrobiana específica de las NPs, con efectos adversos mínimos en el huésped, hace que sean adecuadas como agentes antimicrobianos o portadores. <sup>4</sup>

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo las NPs controlan el crecimiento de bacterias dentro de la cavidad bucal, incluida la liberación de iones metálicos, el estrés oxidativo y los mecanismos no oxidativos, aunque la acción biocida mediada por contacto sigue siendo el mecanismo más importante y comunmente propuesto. Esto implica que las NPs cargadas positivamente sean atraídas electrostáticamente a la membrana celular bacteriana cargada negativamente. Esta atracción altera la permeabilidad de la pared celular, lo que provoca la ruptura de la membrana y la fuga de organelos intracelulares.

La ventaja de las NPs sobre las estrategias antimicrobianas convencionales es que éstas no se ven afectadas por los mecanismos de resistencia a los antibióticos porque forman un contacto directo con la pared celular bacteriana, en lugar de penetrarla. <sup>4</sup>

El mecanismo de acción antibacteriano de las NPs se puede dividir aproximadamente en tres tipos:

1. Interacción con la pared celular y la membrana de peptidoglicano, provocando la lisis celular;
2. Interacción con proteínas bacterianas e interrumpir la síntesis de proteínas;
3. Interacción con el ADN bacteriano (citoplasmático) y prevenir la replicación del ADN. <sup>13</sup>

### **1.10 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs)**

El óxido de zinc es un material multifuncional, atractivo para la electrónica y la optoelectrónica, Cierech también se ha probado como medio de contraste en biosensores, agentes anticancerígenos, para la administración de fármacos, la administración de genes, la regeneración de tejidos y para funciones diagnósticas y terapéuticas. <sup>16</sup>

La creación de métodos para adquirir ZnONPs con forma y tamaños controlados permitió el inicio de la investigación sobre el uso de nanomateriales de ZnO, para la industria, farmacéutica y cosmética. <sup>2</sup>

Este óxido metálico varía en tamaño de partícula, con tamaños que van desde micras hasta nanómetros.<sup>3,4</sup>

La incorporación de ZnONPs al PMMA y sus características fueron descritas por los autores (Cierech et al, 2016), siendo el primer intento exitoso de producir nanocompuestos de PMMA y de ZnONPs.<sup>2</sup>

La actividad antibacteriana y antifúngica de las ZnONPs fue la principal razón para comenzar en 2014 la investigación sobre prótesis dentales.<sup>2</sup>

### **1.10.1 Mecanismo de acción**

Los iones de zinc muestran una actividad antibacteriana eficaz y siendo mayor cuando está presente en forma de nanopartículas. El efecto bactericida de las ZnONPs puede atribuirse a su capacidad para interactuar con la membrana celular de varias especies bacterianas; el Zn se une fuertemente a lípidos y proteínas, cambiando el equilibrio osmótico y aumentando la permeabilidad de la membrana, estas aumentan el estrés oxidativo dentro de la célula bacteriana debido a su capacidad para generar  $Zn^{2+}$  y especies reactivas de oxígeno, que también pueden inhibir el crecimiento de bacterias planctónicas.

Es importante mencionar dos aspectos importantes con respecto a los efectos biológicos de las ZnONPs:

1. La toxicidad de estas nanopartículas parece depender de la dosis, y
2. El recubrimiento.

La funcionalización de éstas alteran las características antibacterianas del zinc en comparación con la actividad antibacteriana del metal en su estado a granel.<sup>2, 21</sup>

Éstas pueden perturbar el crecimiento bacteriano al interactuar con la superficie bacteriana o penetrando en el interior de las células bacterianas. Esto lleva a interrumpir los sistemas enzimáticos bacterianos al desplazar iones de magnesio esenciales para la actividad enzimática de las bacterias y posteriormente, mostrar un importante efecto bactericida.<sup>8, 18, 21</sup>

## 1.11 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Las propiedades antibacterianas de la plata son ampliamente aceptadas en biomedicina, por lo que las AgNPs se combinan con diferentes materiales para generar efectos antimicrobianos adicionales que ayudan a disminuir la formación de biopelículas y mantener una mejor salud bucal. <sup>4, 8, 21</sup>

Las nanopartículas de plata se sintetizan normalmente mediante métodos químicos húmedos partir de complejos de  $\text{AgNO}_3$  en presencia de un agente reductor. <sup>15, 20</sup>

En odontología, se deben considerar aspectos fundamentales durante la preparación de AgNPs, tales como:

1. La difusión de nanopartículas en un biofilm de placa exhibe una relación inversa entre tamaño y efectividad, de modo que las nanopartículas mayores de 50 nm no pueden penetrar el biofilm; y
2. Las nanopartículas cargadas negativamente tienen dificultad para difundirse a través de la biopelícula, posiblemente por la disposición de grupos carboxilo y fosforilo en la superficie de las bacterias que hacen que la superficie celular sea electronegativa. <sup>21</sup>

### 1.11.1 Mecanismo de acción

Los cationes metálicos como la plata en dosis suficientes tienen un efecto dañino para las células vivas, la acción antimicrobiana de estos iones se fundamenta en los daños de la pared y membrana celular, la oxidación de proteínas y lípidos y la interrupción del enlace de hidrógeno entre las cepas de ADN dado que la plata tiene una fuerte tendencia a oxidarse y las nanopartículas tienen una gran relación superficie/volumen, éstas pueden tener un alto contenido de óxido de plata. <sup>15, 20</sup>

Sus iones son capaces de actuar sobre diferentes estructuras de la célula bacteriana, principalmente estos iones parecen adherirse a la pared celular y la membrana citoplásmica a través de la atracción electrostática y la afinidad con las proteínas de azufre, mejorando así la permeabilidad de la membrana y provocando también la ruptura de estas estructuras, después de la absorción de iones de plata libres en las células, las enzimas respiratorias pueden desactivarse, generando

especies reactivas de oxígeno pero interrumpiendo la producción de trifosfato de adenosina. Las especies reactivas de oxígeno pueden ser un agente principal en la provocación de la alteración de la membrana celular y la modificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) como el azufre y el fósforo son componentes importantes del ADN, la interacción de los iones de plata con el azufre y el fósforo del ADN puede causar problemas en la replicación del ADN, la reproducción celular o incluso provocar la eliminación de los microorganismos. Además, los iones de plata pueden inhibir la síntesis de proteínas al desnaturalizar los ribosomas en el citoplasma.<sup>23</sup>

En las bacterias Gram-negativas, las porinas de la membrana externa también participan en la captación de AgNPs. Las moléculas bacterianas que pueden ser dañadas por las nanopartículas incluyen el ADN, las proteínas y los lípidos, éstas también estimulan la respuesta al estrés oxidativo que provoca la destrucción de las células bacterianas y aumentan la desfosforilación de los residuos de tirosina en los sustratos peptídicos bacterianos, lo que inhibe el crecimiento y la viabilidad bacteriana.<sup>22, 23</sup>

Debido a la necesidad de disolución de las nanopartículas para una acción antibacteriana eficaz (a través de la liberación de Ag<sup>+</sup>), el tamaño y la forma de las partículas pueden influir en su acción junto con su concentración. Las nanopartículas con forma esférica o cuasi esférica, aquellas con un tamaño más pequeño tienen una mayor actividad una vez que su superficie exhibe un área más grande, por lo que son más propensas a la disolución en comparación con las más grandes.

Se reportó que la actividad de las NPs con tamaños menores a 10 nm se debe principalmente a la propia nanopartícula, mientras que para aquellas mayores a 10 nm el mecanismo predominante ocurre a través de los iones de plata. De esta manera, aún no se ha determinado el rango preciso de tamaño en el que las AgNPs tienen efectos antimicrobianos. Es importante considerar que el efecto de las AgNPs sobre las bacterias Gram negativas fue diferente al de otras bacterias estudiadas, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana no puede explicarse únicamente por la liberación de Ag<sup>+</sup>, esto se puede deber a que el grosor de la pared celular de las

bacterias Gram negativas es más estrecho que el de las bacterias Gram positivas.

22, 23

Debido a su tamaño pequeño las NPs penetran fácilmente en las membranas celulares, lo que provoca daños e inactividad de las bacterias. Su eficacia bactericida aumenta significativamente en aquellas que tienen menos de 10 nm de diámetro. <sup>4, 15, 21</sup>

### **1.12 Cultivos celulares primarios Fibroblastos gingivales (HGF)\***

Son células predominantes de tejido conectivo, estas células representa una fuente ideal de biopsias de tejido debido a su accesibilidad y baja morbilidad comparada con otros tejidos, esto están involucrados en la reparación del tejido conectivo gingival y en la mediación de la morfogénesis en las células epiteliales, ayudando en la restauración del epitelio oral, esta es una célula mesenquimatosa obicua involucrada en funciones vitales como embriogénesis, homeostasis, reparación de tejidos, jugando un papel importante en los procesos de revestimiento. <sup>26, 27, 28</sup>

Los cultivos celulares son una herramienta importante en las investigaciones médicas, odontológicas y biológicas, las cuales apoyan las terapias celulares y estrategias tisulares de bioingeniería, así como pruebas de biocompatibilidad en el uso de resinas y polímeros en odontología. <sup>27</sup> Múltiples estudios han demostrado que dichas células tiene la capacidad de diferenciarse en más de un linaje *in vitro*.

<sup>26</sup> \*por sus siglas en inglés

### **Células madre de Papila Apical (SCAP)\***

Éstas células clasificadas como multipotentes, plantean una interesante perspectiva para su aplicación en diversas terapias de la odontología regenerativa. Residen en “nichos de células madre” de tejido orales mesenquimales y se conocen como células estromales mesenquimales potentes. <sup>29, 30</sup>

Se cree que derivan de la cresta neural y se expresan tanto con marcadores de células mesenquimales como neuroectodérmicos. Se encuentran específicamente

en la parte apical de la papila dental y se presenta después de que se han formado al menos 2/3 de la raíz.<sup>29</sup>

Cumplen con los criterios mínimos estipulados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) como: la capacidad de adherirse rápidamente a las superficies de cultivo plástico, potencial de diferenciación trilineal y la expresión de marcadores comunes como CD105, CD73 y CD90.<sup>30</sup>

En específico las SCAP presentan una expresión positiva al marcador STRO-1, marcador de células mesenquimales.<sup>31</sup>

### **1.12.1 Inmunohistoquímica**

Esta técnica utiliza anticuerpos para localizar proteínas específicas en los cortes de tejido, los anticuerpos frente a moléculas específicas de la célula se emplean para detectar su presencia en los cortes tisulares.<sup>33</sup>

### **1.12.2 Toxicidad**

Existen diversos tipos de pruebas empleadas para medir la biocompatibilidad de los materiales dentales: la prueba *in vitro*, en animales y de uso que se realiza con animales o humanos, cada una representa diferentes ventajas y desventajas pero con la finalidad de evaluar el material antes de su venta al público.<sup>9</sup>

Las reacciones se han clasificado en: tóxicas, inflamatorias, alérgicas y mutagénicas. La división entre estas reacciones se basa en los análisis histológicos y patológicos de los tejidos. En cuanto a las respuestas biológicas a los materiales, la toxicidad fue la primera que se investigó.<sup>9</sup>

Los métodos de prueba *in vitro* utilizados para evaluar la toxicidad de las nanopartículas han revelado las propiedades generales y biológicas de los materiales a medida que adquieren una estructura a nanoescala y dan como resultado la formación de éstas, lo que conduce a múltiples aplicaciones terapéuticas.<sup>5</sup>

Varios factores, como la dosis, el tiempo de exposición, el tamaño, la forma, la química de superficie y el tipo de célula, desempeñan un rol importante en la

mediación de las respuestas celulares cuando las nanopartículas son administradas a las células.<sup>5</sup>

De acuerdo a lo reportado, se sabe que la toxicidad de las AgNPs está directamente relacionadas con la actividad de los iones Ag<sup>+</sup> libres liberados en el medio, también existe otra preocupación con respecto a la capacidad de estas NPs para cruzar la barrera hematoencefálica a través del transporte transsináptico, con la consiguiente acumulación en el cerebro.

Los estudios *in vitro* mostraron que las AgNPs disminuyen la función mitocondrial en células de neuroblastoma murino, células hepáticas, carcinoma de piel humano y queratinocitos epidérmicos humanos. Otros estudios *in vivo* demostraron la influencia de estas nanopartículas en procesos de estrés oxidativo, infarto de miocardio, trombosis e inflamación.<sup>21</sup>

## **1.13. Microbiología**

### **1.13. 1 Bacterias y crecimiento en medios de cultivo**

El cultivo general de la mayor parte de las bacterias exige un medio con abundantes nutrientes, como puede ser agar, una fuente de carbono y un hidrolizado ácido o una fuente de material biológico sometida a degradación enzimática, debido a la composición indefinida, estos se denominan medios complejos. Los medios de cultivo pueden clasificarse en selectivos y no selectivos, los no selectivos permiten distinguir entre las diversas bacterias presentes en una muestra clínica que contienen múltiples microorganismos diferentes, su fundamento es la incorporación de una sustancia que inhiba de manera selectiva el crecimiento de bacterias irrelevantes.<sup>33</sup>

### **1.13. 2 Aislamiento de microorganismos**

Es cuando se busca el crecimiento de un tipo específico de microorganismo que forma parte de una población mixta, esto es a través de medios de cultivo selectivos o diferenciales, que inhiben el crecimiento de microorganismos distintos del que se está buscando.

El cultivo de una muestra bajo cierto grupo de condiciones permitirá que un grupo selecto de formas produzca colonias, para que se logre esto se debe aislar el microorganismo de todos los demás y aislar de forma que su progenie permanezca aislada.

### **1.13.3 Cultivo en placa**

En estas condiciones, en un medio de gel se inmoviliza, el agente ideal para la formación de gel para la mayoría de cultivos microbiológicos es el agar, un polisacárido ácido extraído de ciertas algas rojas.<sup>33</sup>

### **1.13. 4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana Prueba de difusión en disco**

Estandarizada por Kirby y Bauer en 1966, es sencillo y fácil, el cual brinda la información cualitativa o semi cuantitativa respecto a la sensibilidad de un microorganismo a un agente determinado, sin embargo los datos que se obtienen representan un gran valor para iniciar, mantener o cambiar una terapia.<sup>34</sup>

### **1.13. 5 Ensayos de evaluación de efecto inhibitorio**

El método de difusión en agar es un método bien conocido que se utiliza para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de rutina, en las que se miden los diámetros de zona de inhibición.<sup>18</sup>

### **1.14 Ensayos de biocompatibilidad, ensayo de MTT**

La microbiología emplea diversos indicadores del estado fisiológico bacteriano, las técnicas más usadas se basan en estimaciones de reproductibilidad, que evalúan la viabilidad de la población como el porcentaje de células capaces de dividirse. La influencia de los factores que reducen la vitalidad microbiana pero que no necesariamente afectan la multiplicación solo puede determinarse mediante la detección de alteraciones en la estructura y función de las células. Estos abarcan

observaciones de morfología general y características específicas de la membrana, por ejemplo, potencial de la membrana, integridad, capacidad para excluir tintes y motilidad celular y perfiles bioquímicos de moléculas específicas, incluidas las enzimas.<sup>35</sup>

Entre los múltiples métodos que asocian el nivel de actividad enzimática con la condición de la población microbiana, los ensayos basados en biotransformaciones de sales de tetrazolio ganaron mucha popularidad, los métodos que utilizan la reacción de reducción fueron inventados y optimizados a finales del siglo XX y principios del XXI, la investigación se aceleró debido al creciente conocimiento de los mecanismos de reducción de las sales de tetrazolio y la síntesis de nuevos compuestos de esta clase.

Uno de los ejemplos más comunes de sales de tetrazolio utilizadas en bioensayos es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).<sup>35</sup>

Los ensayos de viabilidad y proliferación se basan en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, presentes en las células vivas, para reducir el colorante de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-bromuro de il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un producto de formazán púrpura insoluble o 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) a un producto de formazán naranja soluble en agua.<sup>5</sup>

Los procedimientos basados en MTT se aplican ampliamente a líneas celulares de mamíferos, bacterias y hongos.<sup>5, 35</sup>

El anillo de tetrazol puede someterse a enzimas reductoras que dan como resultado su escisión, el producto de la reacción es un correspondiente formazán de color intenso.<sup>4</sup>

El primer informe sobre la posible aplicación de MTT en la estimación de la viabilidad de las células vivas fue escrito por Mosmann (1983), quien describió la posible evaluación de la respuesta de líneas celulares de mamíferos a citotóxicos compuestos.<sup>35</sup>

Las características bioquímicas de la reducción de tetrazol en células procariotas están influenciadas por las características de estructura-difusibilidad de la sal de

tetrazolio, las condiciones de cultivo, las especies microbianas y la fase de crecimiento de la tensión.

El ensayo MTT también se propuso como método alternativo para la cuantificación de biopelículas microbianas. En comparación con una tinción y extracción con cristal violeta estándar, MTT permite no solo localizar y cuantificar esta estructura, sino principalmente determinar la presencia de bacterias vivas.<sup>35</sup>

La búsqueda de un disolvente ideal de MTT a formazán continuó a lo largo de los años, hasta ahora una de las mejores mezclas propuestas es DMSO alcalino suplementado con amoníaco. Sus ventajas más importantes son la eliminación de las imprecisiones derivadas del pH y la mejora de la estabilidad temporal de la solución.

Por otro lado se sabe que el grado de precipitación de cristales de formazán durante el paso de reducción depende mucho del tipo de medio con el que se trabaje y entre los factores que pueden afectar el resultado final del ensayo de MTT están las características de los microorganismos, por ejemplo, tipo de cepa, fase de crecimiento, nivel de actividad metabólica y condiciones de crecimiento.

El ensayo se clasifica como una de las pruebas más baratas y sencillas, teniendo en cuenta reactivos y equipos necesarios.<sup>35</sup>

## 2. Planteamiento del Problema

El polimetilmetacrilato cumple un rol importante para la función, estética y mejora en la calidad de vida de adultos mayores edéntulos y parcialmente edéntulos, niños con tratamientos de ortopedia maxilar y pacientes con disfunciones temporomandibulares, entre otros, se sabe que el 95% de la fabricación de las prótesis bucales es todavía con PMMA, aunque es importante tomar en cuenta el manejo de la formación de biopelículas que de acuerdo con factores predisponentes como inmunosupresión, fármacos, xerostomía, prótesis mal adaptadas y porosas, resulta en un factor desfavorable para que los pacientes sean susceptibles a padecer estomatitis protésica, una forma común de candidiasis. <sup>3, 13, 36</sup>

Debido a esta situación se vio la necesidad y búsqueda por apostar por la industria de los materiales disponibles pero con terapéuticas prometedoras, es ahí donde entra el uso y aplicación de la nanotecnología con nanopartículas, con sus propiedades físicas y únicas mejoradas. Específicamente se ha encontrado que las nanopartículas combinadas con polímeros en su superficie muestran propiedades superiores en el cuidado de la cavidad oral, con la generación de materiales innovadores. <sup>2, 3, 13, 23</sup>

Estudios *in vitro* han comprobado que las nanopartículas de plata son eficaces en el manejo y disminución de un microbioma oral equilibrado, por otro lado, en el caso nanopartículas de óxido de zinc, se sabe que el óxido de zinc por sí solo funge como un potente bactericida y actualmente el efecto de las nanopartículas de óxido de zinc ha sido poco estudiado.

Los protocolos terapéuticos comunmente utilizados para el manejo de estomatitis protésica han demostrado ser poco eficaces, produciendo a largo plazo resistencia antibiótica y poco control en la adherencia de esta levadura a la superficie protésica y mucosas, por lo que probar con otro tipo de terapéuticas se hace indispensable ya que la implementación de nanopartículas al PMMA podría ser de gran aportación para el manejo de esta condición.

Resulta importante el tener evidencias sobre el efecto inhibitorio y nivel de toxicidad de las nanopartículas de plata y óxido de zinc sobre el *S. mutans* y *C. albicans* en PMMA de diferentes marcas comerciales, ya que esto ayudará a determinar el uso

y aplicación de nanopartículas, y a determinar cuál podría mejorar la actividad inhibitoria para su uso clínico, debido a esto surge la siguiente pregunta de investigación:

**¿Cuál es el efecto de citotoxicidad e inhibición de microorganismos en el PMMA adicionando nanopartículas de ZnO y Ag?**

### 3. Justificación

Debido al aumento continuo de la esperanza de vida y la baja natalidad de la población el futuro demográfico se ve frenado con un aumento en las poblaciones de la tercera edad, cabe mencionar que cuanto mayor es el paciente mayor es la necesidad de rehabilitación protésica, en la literatura se ha reportado un gran número de personas que se encuentran total o parcialmente edéntulos, la solución protésica más común sigue siendo una prótesis removible de polimetilmetacrilato, esto asociado a que las personas mayores a menudo padecen enfermedades sistémicas que se acompañan de terapias medicamentosas que favorecen la proliferación de microorganismos patógenos.<sup>2,7</sup>

Las prótesis bucales son una herramienta que mejoran la función masticatoria con propiedades estéticas y fonéticas para mejorar notablemente la calidad de vida. El material más utilizado es el PMMA, un reservorio de microorganismos causantes de enfermedades bucales.<sup>3,14</sup>

Los pacientes, a menudo en contra de las indicaciones del dentista, usan las prótesis sin descanso nocturno, que, en la mayoría de los casos, da como resultado la formación de una inflamación extensa de la membrana mucosa debajo de la base de la dentadura, resultando en estomatitis común en pacientes inmunodeprimidos, niños y adultos mayores.<sup>8,37</sup>

Las terapias farmacológicas combinadas para combatir levaduras y bacterias son efectivas pero se erradican por un tiempo relativamente corto y más cuando existe un factor predisponente, la principal desventaja radica en que esto conduce a una mayor resistencia a los medicamentos.<sup>16,31,38</sup> Es ahí donde la aplicación de las nanopartículas a PMMA juega un rol importante ante su efecto bactericida. Por razones como las antes mencionadas es trascendente el impacto de las investigaciones como estrategia preventiva para la formación de biopelículas patógenas en la superficies protésicas y como una vía para mejorar los materiales.<sup>2,3,13,14</sup>

## **4. Hipótesis**

### **Hipótesis de trabajo**

Existe baja viabilidad celular y mayor inhibición de microorganismos en el PMMA adicionando nanopartículas de Ag y ZnO

### **Hipótesis Nula**

Existe alta viabilidad celular y menor inhibición de microorganismos en el PMMA adicionado con nanopartículas de Ag y ZnO.

## 5. Objetivos

### **General:**

Evaluar la citotoxicidad y efecto inhibitorio del PMMA posterior a la adición de NPs de ZnO y Ag

### **Específicos:**

Determinar la efectividad del método de T. Bala en la síntesis y adhesión de ZnO y AgNPs

Caracterizar las muestras de PMMA modificados con NPs

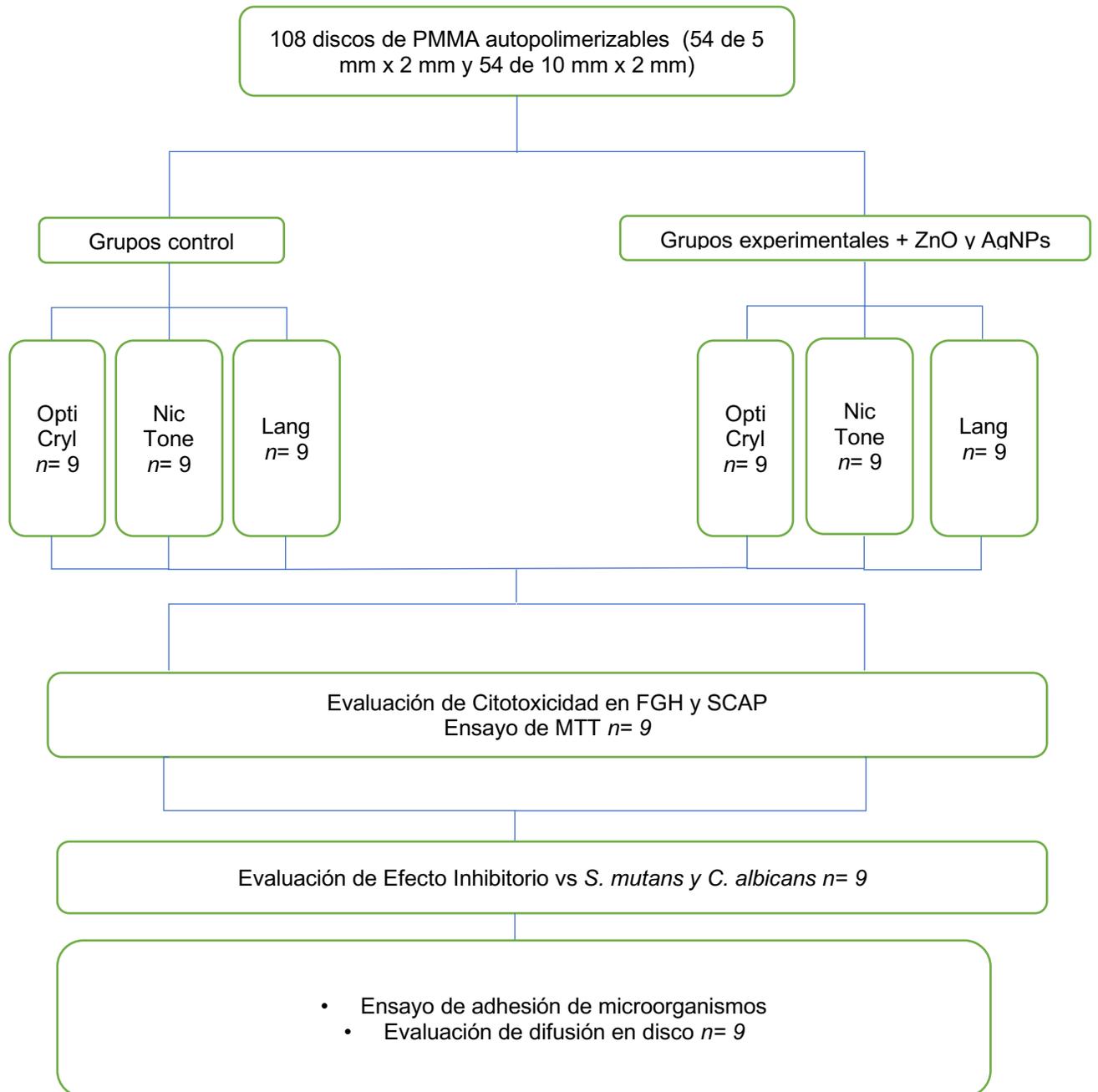
- Identificar el efecto antimicrobiano de la síntesis de ZnO y AgNPs
- Identificar el efecto citotóxico de PMMA con de ZnO y AgNPs
- Determinar la adhesión de *S. mutans* y *C. albicans* en el PMMA con ZnO y AgNPs
- Comparar la citotoxicidad y el efecto inhibitorio del PMMA posterior a la adición de de ZnO y AgNPs

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Diseño del estudio

**Tipo de estudio:** Experimental *in vitro*, comparativo.

Diagrama de diseño de estudio:



## 6.2 Universo:

Polimetilmetacrilato disponible en el mercado y cultivos de líneas celulares de HGF y SCAP, microorganismos *S. mutans* y *C. albicans*.

## 6.3 Muestra:

No probabilístico por conveniencia

**Tamaño:**  $n= 3$  por cada marca comercial para los grupos control y grupos experimentales, tomando en cuenta que los experimentos se realizaron por triplicado.

## 6.4 Criterios de selección

La selección de los discos de polimetilmetacrilato de diferentes casas comerciales se llevó tomando en cuenta las siguientes características:

### Criterios de inclusión

Discos de PMMA autopolimerizable de 5 x 2 mm de espesor y de 10 x 2 mm Opti Ceryl, Nic Tone y Lang (grupos control) y con recubrimiento de ZnO y AgNPs (grupos experimentales) homogéneas (PMMA libre de fibras, pigmentos o decoraciones).

HGF cultivados *ex vivo* a una densidad mínima de  $1 \times 10^5$  cel/mL.

SCAP cultivados *ex vivo* a una densidad mínima de  $1 \times 10^5$  cel/mL.

### Criterios de exclusión

- Discos de PMMA que presenten burbujas, irregularidades o algún defecto en su superficie o contracción y modificaciones en el color detectables a simple vista
- Fibroblastos con más de 15 divisiones celulares

## Criterios de eliminación

Discos de PMMA con modificación circunstancial de la superficie, fracturas o contaminación durante el procedimiento

### 6.5 Variables

|                               |   | Definición conceptual   | Definición operacional   | Tipo de variable      | Escala de medición |
|-------------------------------|---|---|--|-----------------------|--------------------|
| <b>Variable Dependiente</b>   | Actividad Inhibitoria                     | Capacidad de resistencia a la proliferación de microorganismos  | Medición de los microorganismos que sobreviven al contacto directo de muestras de PMMA con ZnO y AgNPs | Cuantitativa continua | De razones         |
|                               | Citotoxicidad                             | Afectación celular causada por la acción de anticuerpos específicos y complementado por células citotóxicas | Interacción del PMMA con ZnO y AgNPs en contacto directo con líneas celulares de FGH y SCAP            | Cuantitativa continua | De razones         |
| <b>Variable independiente</b> | PMMA autopolimerizable + NPs ZnO y NPs Ag | Agente aplicado al PMMA con efecto inhibitorio de microorganismos   | Recubrimiento de ZnO y AgNPs en contacto con <i>S. mutans</i> y <i>C. albicans</i>                     | Cuantitativa continua | Nominal (Mm)       |
|                               | Síntesis de NPs ZnO y Ag                  | Adición de partícula microscópica por síntesis química (T. Bala)  | Adición de ZnO y AgNPs   | Cuantitativa          | De razón           |

## 6.6 Procedimiento

Se establecieron 4 fases para estudio:

1. Confección de muestras de PMMA de diferentes marcas comerciales
2. Síntesis y caracterización de ZnO y AgNPs en muestras de PMMA por el método de T. Bala
3. Estudio antifúngico y antimicrobiano  
Cultivo de *S. mutans* y *C. albicans*
4. Análisis de citotoxicidad de ZnO y AgNPs  
Determinación de la actividad citotóxica mediante ensayo de MTT en *C. albicans* y *S. mutans*  
Subcultivo celular HGF y SCAP  
Inoculación de muestras

### Preparación de muestras de PMMA

La fase experimental se realizó en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el Área de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES)- Unidad León, UNAM.

Se utilizaron 108 muestras clasificadas en 18 grupos, 9 grupos para las pruebas de viabilidad celular con HGF y SCAP y 9 grupos para las pruebas de adhesión de *S. mutans* y *C. albicans*, separadas en 3 grupos de acuerdo a la marca comercial: Opti-Cryl (Newstetic, USA), Nic-Tone (MDC Dental, Mexico) y Lang (Dental MFG Co, IL, USA).<sup>39, 40, 41, 42</sup>

Las muestras fueron elaboradas utilizando un molde de teflón con 10 cavidades cilíndricas de 5 mm de diámetro x 2 mm de grosor y en molde metálico con 3 cavidades cilíndricas de 10 mm de diámetro x 2 mm de grosor.

Para la obtención de muestras de PMMA, se pesaron 2 gr de polímero Nic-Tone, Opti-Cryl y Lang respectivamente adicionando 1200 µL de monómero, se inició la mezcla para depositarla en su respectivo molde al terminar el polimerizado en frío

de las muestras se desalojaron del molde, posteriormente se recortaron, pulieron con piedra rosa por sus cuatro caras y por último se utilizó lijas de grano ultra fino. El total de muestras fueron almacenadas en un vaso de precipitado, añadiendo alcohol isopropílico y se llevaron a tina de ultrasonido para sonicado a lo largo de 10 minutos para descartar impurezas, colocando para secado a temperatura ambiente por 12 h, por último se almacenaron en bolsas para esterilización y se llevaron a esterilización en autoclave. (Fig. 1).

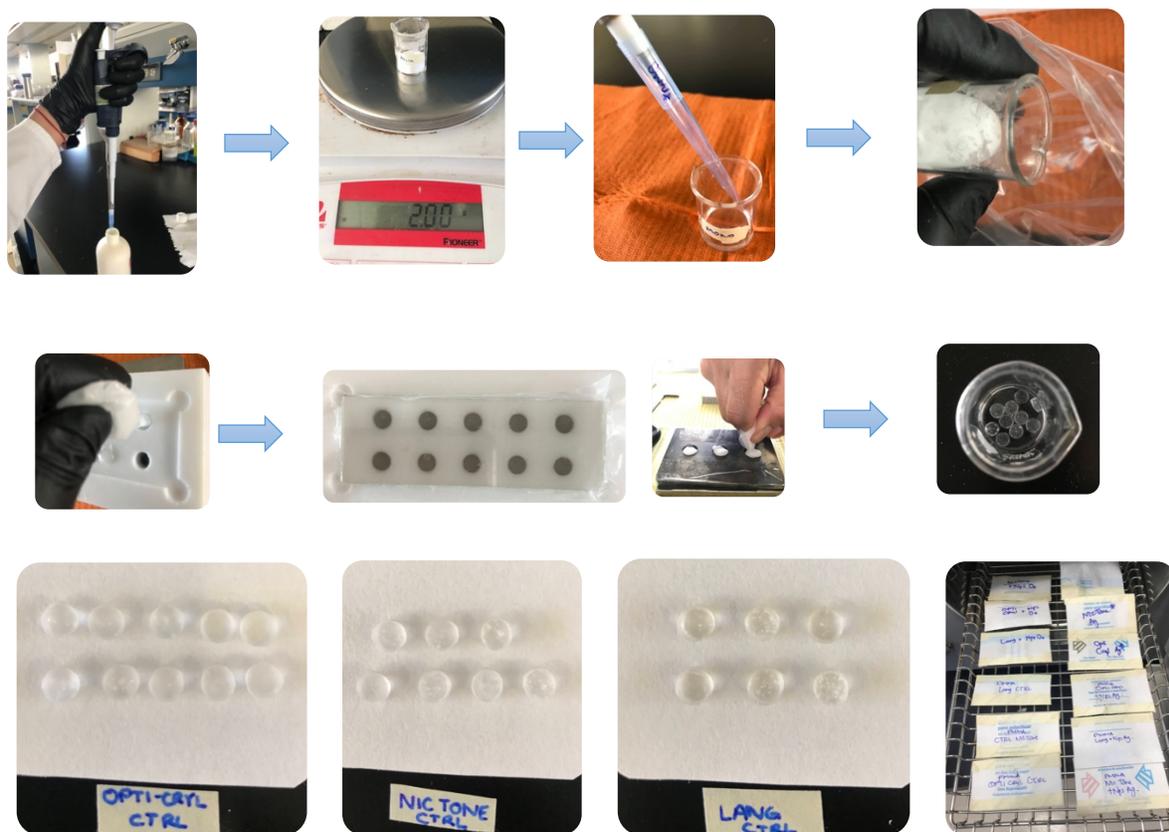


Fig. 1.- Secuencia de preparación de muestras de PMMA.

## 1. Síntesis *in situ* y caracterización de NPs

La síntesis de nanopartículas se llevo a cabo siguiendo el método propuesto por T. Bala y replicado por Jasso *et. Al* (Fig. 2)<sup>43, 44</sup>

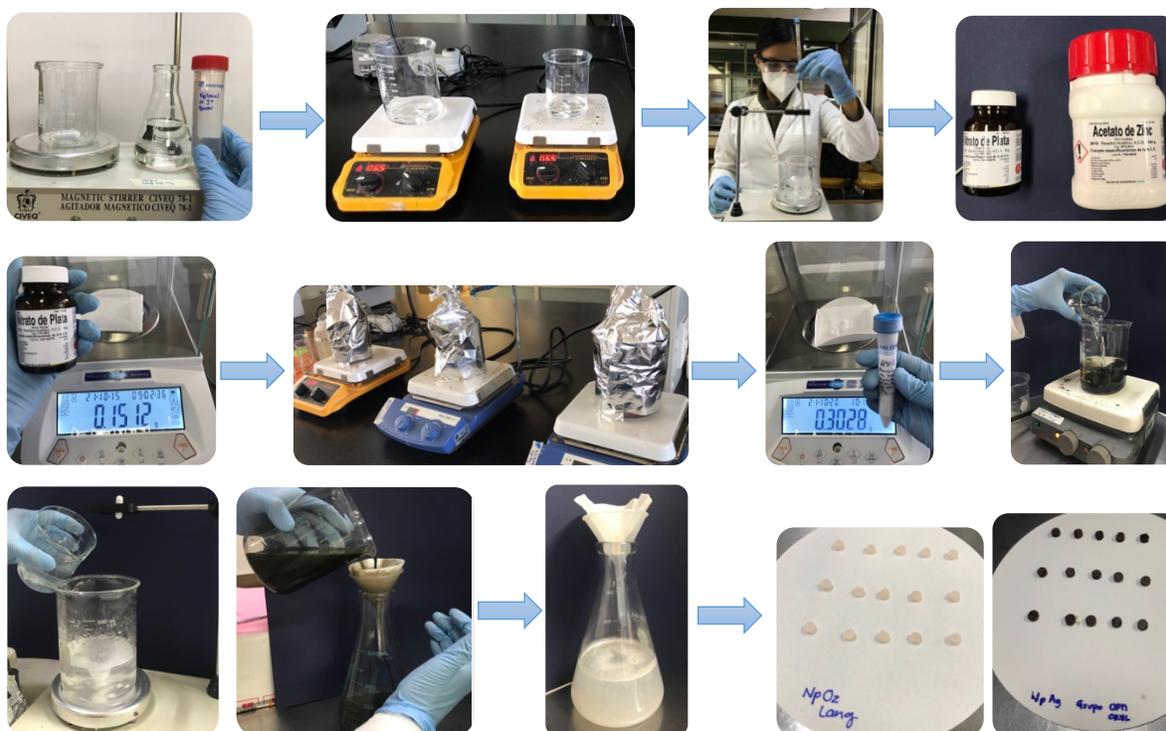


Fig. 2.- Secuencia de síntesis de ZnO y Ag en muestras de PMMA.

## Nanopartículas de ZnO

Se depositaron las muestras de PMMA en una solución de  $1 \times 10^{-2}$  M de ácido oleico (BM, México) con metanol (J. T. Baker, USA), la cual se llevó a agitación a 500 revoluciones por minuto (RPM) hasta la evaporación completa del metanol, posteriormente se elaboró una solución de acetato de zinc (ZnO) (Fagalab, Favela, Mx) a una concentración de  $1 \times 10^2$  M incorporando los discos de PMMA y dejándose en agitación durante 24 h recubriendo con papel aluminio el vaso de precipitado en agitación, transcurridas las 24 h se inició la reducción mediante la incorporación de una solución de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) al  $4 \times 10^2$  (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO/ USA) dejándolo en agitación durante 30 min.

Al término, se retiraron los discos de la solución colocándolas en discos de papel filtro y dejándolas secar a temperatura ambiente, por último se almacenaron las muestras y se esterilizaron durante 20 min a una temperatura de  $128^\circ \text{C}$  (Fig. 2).

## Nanopartículas de Ag

Se depositaron las muestras de PMMA en una solución de  $1 \times 10^2$  M de ácido oleico (BM, México) con metanol (J. T. Baker, USA), la cual se llevo a agitación a 500 revoluciones por minuto (RPM) hasta la evaporación completa del metanol, posteriormente se elaboró una solución de sales de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Fagalab, Favela, Mx) a una concentración de  $1 \times 10^2$  M incorporando los discos de PMMA dejándose en agitación durante 24 h recubriendo con papel aluminio el vaso de precipitado en agitación, transcurridas las 24 h se inició la reducción mediante la incorporación de una solución de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}$ ) al  $4 \times 10^2$  (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO/ USA), dejándolo reaccionar durante 30 min.

Al termino, se retiraron los discos de la solución colocándolas en discos de papel filtro y se dejaron secar a temperatura ambiente, por último se almacenaron las muestras y esterilizaron durante 20 min a una temperatura de  $128^\circ \text{C}$  (Fig. 2).<sup>43, 44</sup>

## Espectroscopía de UV-vis

Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de ZnO y Ag con 1800  $\mu\text{L}$  de agua destilada en una celda de cuarzo y se analizó en un espectrofotómetro de UV-visible Multiskan GO (Thermo Scientific, Finland). Para las ZnONPs se colocó en una absorbancia a una longitud de onda de 0-1000 nm y para las AgNPs a una longitud de onda de 200-400 nm (Fig. 3).<sup>45, 46</sup>



Fig. 3.- Caracterización de ZnO y AgNPs por espectrofotometría UV-vis.

## Pruebas microbianas

Se utilizaron cepas de *S. mutans* (ATCC-35668) y *C. albicans* (ATCC-90028) para efectuar los ensayos de actividad anti microbiana.

### Ensayo de difusión en agar

Se preparó Agar Müller Hinton y Dextrosa saboraud respectivamente (BD Becton Dickinson Bioxon, TM).

El agar Müller-Hinton se elaboró de acuerdo a las recomendaciones del fabricante en una disolución de 28 g en 1 L en un matraz, para la ocasión se prepararon 200 mL combinado con 7.6 g de polvo, se llevaron a agitación hasta el punto de pre ebullición.

Se realizó el sellado del matraz y se llevo a esterilización durante 15 minutos a una temperatura de 128°C/ 2 atm de presión, al finalizar el ciclo de esterilizado, bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, se depositaron 20 mL en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Posteriormente con un asa se tomó un inóculo de la levadura *C. albicans* (ATCC-90028) y *S. mutans* (ATCC-35668)

De un cultivo joven se tomaron 6 colonias de *S. mutans* y 3 de *C. albicans* , en un tubo para densitometria se ajustó la solución al patrón de turbidez de Mc Farland de 0.5 (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL), para el ajuste de la escala Mc Farland se llevó a agitación en vortex y se llevo a lectura adicionando NaCl hasta tener la escala para inoculación.

Una vez establecida la solución de trabajo se tomaron 120  $\mu$ L para esparcir en la caja de agar, realizando el sembrado con la técnica de estriado en 4 sentidos y el sellado del plato con un hisopo estéril.

Posteriormente en los discos de papel (GE, Healthcare, USA) de 6 mm de diámetro se colocaron 20  $\mu$ L de solución acuosa resultante de la síntesis de ZnO y AgNPs , tomando como control positivo anfotericina B para *C. albicans* y clorhexidina para *S. mutans* y como control negativo agua destilada.

Se dejaron en incubación a 37° C durante 24 h y posteriormente se realizó la medición de halos de inhibición (Fig. 4).<sup>47, 48</sup>

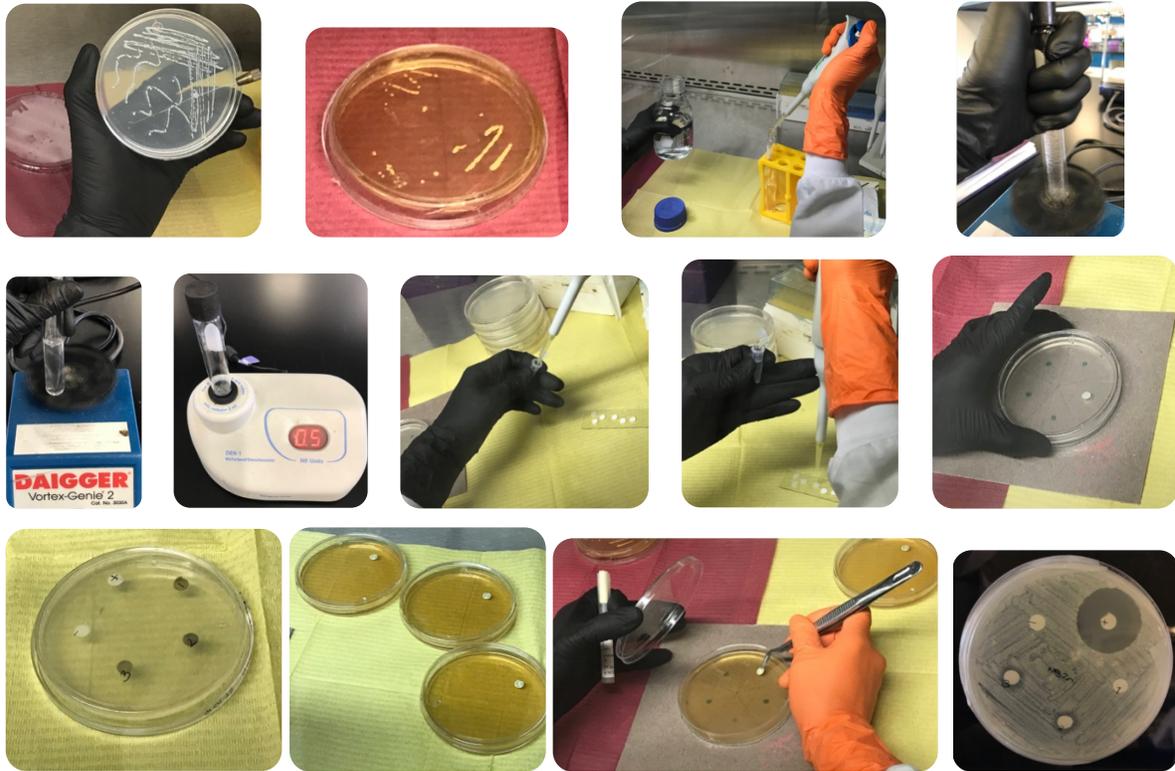


Fig. 4.- Secuencia para el ensayo de difusión en disco

### **Ensayo de susceptibilidad antifúngica de ZnO y AgNPs en *S. mutans* y *C. albicans***

*S. mutans* (ATCC-35668) y *C. albicans* (ATCC-90028) se cultivó aeróbicamente a 37° C bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar en Agar Müller Hinton (Müller-Hinton, Sigma Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) y Dextrosa Saboraud (BD Becton Dickinson Bioxon, TM) respectivamente y se dejó en incubación durante 24 h.

Posteriormente en un tubo falcon se cultivó una colonia en 15 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (sin glutamina, rojo fenol, tamponado con pH 7,0 usando MOPS) y MH se tomaron con con asa estéril 8 colonias de *S. mutans* y 6 colonias de *C.*

*albicans*, las cuales se pusieron en agitación overnight durante 16 h a 180 RPM a temperatura de 37° C.

### **Preparación de solución bacteriana**

En un tubo para densitómetro se colocaron 12 mL de medio RPMI y 10 mL de caldo MH respectivamente, se tomaron 500 µL de la solución *overnight* para alcanzar la escala Mc Farland a 0.5.

### **Solución de trabajo**

Una vez ajustadas las soluciones a la escala Mc Farland se tomaron en un tubo falcon 18 mL de medio de trabajo en una dilución de 1:100 con 180 µL de solución bacteriana, se depositaron en 2 cajas de 24 pocillos con 600 µL de medio de trabajo, depositando las muestras de PMMA y se dejaron en incubación durante 5 días a 180 revoluciones por minuto (RPM) y 37° C realizando cambio de medio cada 24 h, al quinto día se transfirieron las muestras de PMMA a cajas estériles, realizando un lavado con 500 µL de PBS estéril, una vez hecho el lavado se agregó la solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro 0,2 mg/mL (MTT).

Posteriormente se colocaron las cajas en tina de ultrasonido, durante 5 minutos a 37 KHz con 50% de potencia y a temperatura ambiente.

Dejando en incubación por 2 horas, transcurridas las 2 horas, se retiró el medio con MTT y se agregó 500 µL en cada pozo con DMSO manteniendo en incubación por 1 h, por último se trasladó a una caja de 96 pocillos para lectura en espectrofotómetro UV-vis (Thermo Scientific, Multiskan Go), en un rango de 550 nm para *S. mutans* y para *C. albicans* (Fig. 5).<sup>36</sup>



Fig. 5.- Secuencia para el ensayo de adhesión de *S. mutans* y *C. albicans* en PMMA

## Ensayo de citotoxicidad de ZnO y AgNPs

### Ensayo MTT en HGF y SCAP

Las muestras de PMMA de cada grupo ( $n = 3$ ) se llevaron a esterilización con vapor durante 15 min a una temperatura de 128° C, 2 atm de presión, al finalizar el ciclo bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Las células HGF y SCAP se expusieron a las muestras de PMMA y la proliferación se evaluó midiendo la actividad enzimática de la reductasa mediante la transformación de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro 0,2 mg/mL (MTT) en una forma reducida coloreada. Las líneas celulares se cultivaron en el Medium Eagle Modificada (DMEM) de Dulbecco (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 100 U/mL de penicilina-

estreptomicina y 1% de L glutamina en una atmósfera 95% humedad y 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Para los experimentos de citotoxicidad, se preparó el medio de cultivo siguiendo las especificaciones ISO 10993-5, posteriormente se sembraron células a 1x10<sup>5</sup> cell/mL en placas estériles de 24 pozos (Nunc- Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) y se incubaron en estos medios de extracción durante 24 h. Las muestras se pusieron en contacto con las células y se incubaron durante 24 h a 37° C. Posteriormente, las muestras se eliminaron y la viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, Co, St Louis, MO, USA). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Go) a una longitud de onda de 570 nm, utilizando cultivos celulares sin muestras de PMMA como controles. Cada experimento se realizó por triplicado (Fig. 6).<sup>49, 50, 51</sup>

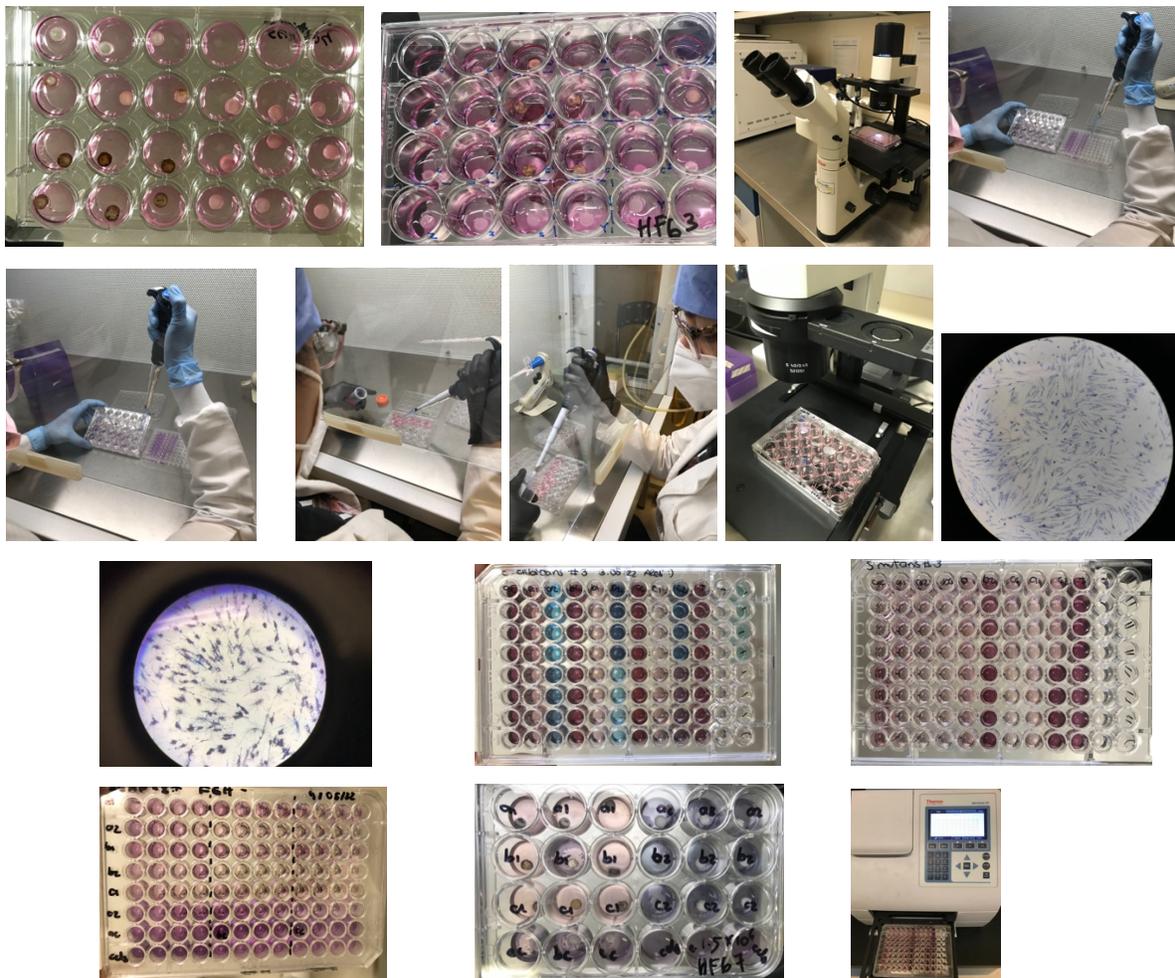


Fig. 6.- Secuencia para el ensayo de citotoxicidad de SCAP y HGF en contacto con ZnO y AgNPs

## **6.7 Consideraciones Bioéticas**

En reglamento de la ley general de salud en materia de investigación en el capítulo I artículo 17 se clasifican los riesgos de investigación, en donde el presente trabajo entra en la clasificación de “investigación sin riesgo” ya que no se utilizó métodos que requieran la intervención de seres humanos. Además, en el artículo 23 señala que no es necesario realizar consentimiento informado por el mismo motivo.

También es necesario recalcar que en la declaración de Helsinki no se viola ningún apartado ya que la investigación es “*in vitro*” y no se utilizaron seres vivos en su elaboración.<sup>46, 47</sup>

Este proyecto cumple con el registro por parte del Comité de Ética en Investigación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México con la clave CEICIEAO-2021-014.

## **6.8 Análisis Estadísticos**

Todos los análisis se realizaron utilizando un software estadístico (SPSS 25, IBM, Nueva York, EE. UU.). La distribución de datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk; posteriormente la diferencias entre materiales en términos de viabilidad celular y adhesión microbiana fueron determinadas mediante la prueba ANOVA de una vía con post-hoc Tuckey. Se establecieron diferencias significativas a partir de  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

**TECHNO | Press** Tp\_Editing System.E (TES.E)

<http://www.techno-press.com/>

Journals > [Submission](#) | [Payment](#) | [Articles](#) |

### Paper Status

|                 |   |                      |            |
|-----------------|---|----------------------|------------|
| <b>Paper ID</b> | ANR2N457 <a href="#">[download]</a>   | <b>Date received</b> | 2022-11-05 |
| <b>Title</b>    | Analysis of toxicity and inhibitory effect of microorganisms by coating zinc oxide and silver nanoparticles in polymethylmethacrylate (PMMA)                      |                      |            |
| <b>Author</b>   | Dr. Ulises Velazquez-Enriquez (Corr. Author), Areli Jocabed Villagran-Villegas, Rogelio Jose Scougall-Vilchis, Rene Garcia-Contreras, Chistian Andrea Lopez-Ayuso |                      |            |
| <b>Status</b>   | E-mail address is confirmed.  |                      |            |

| Date       | Event                 | Detail              |
|------------|-----------------------|---------------------|
| 2022-11-05 | Manuscript Submission | Confirm Mail - Sent |
| 2022-11-05 | Manuscript Submission | Confirmed by author |

**Techno-Press:** Publishers of international journals and conference proceedings. Copyright © 2022 Techno-Press  
P.O. Box 33, Yuseong, Daejeon 34186 Korea Tel: +82-42-828-7995 Fax: +82-42-828-7997 Email: [info@techno-press.com](mailto:info@techno-press.com)

## 8. Discusión

El PMMA seleccionado para esta investigación fue fabricado de acuerdo a la norma ISO-20795-2, se seleccionaron tres marcas diferentes Opti-Cryl, Nic-Tone y Lang, para evaluar el comportamiento y variabilidad en respuesta a la adición de ZnO y AgNPs en modelos celulares y en contacto con levaduras y cultivos bacterianos para medir su efecto inhibitorio.<sup>42</sup>

La ISO indica que el PMMA libera monómero residual y libera una fracción máxima en masa de 5 mg% en peso para los tres tipos de polímeros base: termopolimerizables, autopolimerizables y polimerizables por microondas; Thaithammayanon informó que el monómero residual de PMMA presenta toxicidad y efectos alérgicos en la mucosa, esto podría estar asociado a los resultados de esta investigación en la que las muestras en contacto con HGF y SCAP presentaron viabilidad celular disminuida en comparación con el grupo de cultivo celular control sin contacto con PMMA. El resultado es una respuesta similar en comparación con Schendel *et al.*, quienes exhibieron muestras de plásticos de ortodoncia en contacto con fibroblastos de ratón y queratinocitos humanos.<sup>11, 54</sup>

La intención de este y otros proyectos de investigación es crear un nuevo biomaterial para prótesis o aparatología oral que impidiera la adhesión de microorganismos a la superficie, reduciendo el desarrollo de estomatitis protésica. Autores como Lee *et al.*, utilizaron NP de sílice mesoporosa, mientras que Kim *et al.*, utilizaron nanotubos de carbono, sin embargo, se necesita más evidencia para respaldar su uso clínico. Trabajos como los de Cierech *et al.*, quienes refuerzan el PMMA con ZnO, con una agregación en la que manejaban el suspender el nanocompuesto al monómero para luego agregar el polvo de PMMA, hacen referencia a que este método permite un mayor control sobre la agregación de nanopartículas, tales como morfología, densidad, área, pureza de fase y tamaño medio de partícula y una distribución uniforme en el PMMA, también se caracteriza por la repetibilidad y reproducibilidad de las propiedades de las NPs. Este mismo estudio revela que las ZnONPs disminuyen el crecimiento de células fúngicas y la inhibición es proporcional a la concentración.<sup>7</sup> De igual forma, De Matteis *et al.*,

realizaron la agregación de las AgNPs en el monómero PMMA, a diferencia de otros trabajos al sintetizar las AgNPs, agregaron citrato para modificar la carga negativa de las NPs y así reducir la colonización de *C. albicans*.<sup>14</sup>

Con el fin de favorecer las propiedades físicas, químicas e inhibitorias del PMMA, en odontología se ha utilizado la implementación de nanopartículas; específicamente, las AgNP se han estudiado ampliamente en PMMA y se han obtenido resultados satisfactorios y prometedores sobre el efecto inhibitorio. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre estudios *in vitro* del efecto inhibitorio y la citotoxicidad de las ZnONP cuando se aplica un recubrimiento. Este estudio analiza los resultados de las interacciones toxicológicas del recubrimiento de PMMA con ZnO y AgNPs en un medio biológico.

En esta investigación se realizó el recubrimiento de PMMA mediante la técnica de T. Bala, con la cual se obtienen AgNPs con forma esférica y tamaño de partícula de aproximadamente 4.44 nm, analizadas por TEM según Jasso *et al.*<sup>43,44</sup> Esta técnica es una síntesis de nanopartículas de reducción química húmeda, fácil de procesar y de bajo costo, probada contra *E. coli* y *S. epidermis* para examinar posibles aplicaciones como material antimicrobiano. Del mismo modo, estudios como el de Jasso *et al.*, evaluaron esta técnica para implementarla en brackets de ortodoncia probados contra *S. aureus* y *E.coli*, confirmando un efecto inhibitorio. Según Jandt, las AgNPs generalmente se sintetizan mediante el método químico húmedo en presencia de un agente reductor.<sup>20, 43, 44</sup> En este caso, los espectros UV-vis de la solución de ZnO y AgNPs mostró una banda de absorción con un plasmón de 392 nm para Ag y rango de 1000 para ZnONPs, los datos espectroscópicos confirmaron la presencia de átomos de estas NPs.

Sohail *et al.*, informaron que el uso y la adición de nanopartículas no presentan dificultades de biocompatibilidad. Estas mejoraron varias propiedades del PMMA, como las propiedades mecánicas, la conductividad térmica, la estabilidad dimensional y la actividad antimicrobiana debido a su gran superficie y mejor distribución. Las propiedades de las nanopartículas (morfología, carga, tipo) afectan

a las propiedades finales del PMMA reforzado; las nanopartículas metálicas mejoran la conductividad térmica de la base de la dentadura y permiten una mejor sensación de temperatura de los alimentos. <sup>6</sup>

Se ha informado que la síntesis de PMMA con de ZnO y AgNPs es un auxiliar para mejorar las propiedades antifúngicas y antimicrobianas, además de abordar problemas como el tratamiento de estomatitis protésica para tener un control adecuado del biofilm. <sup>6</sup>

La formación de biopelículas y el crecimiento bacteriano están asociados con enfermedades infecciosas, condiciones prevalentes como caries, enfermedad periodontal y estomatitis protésica. Numerosos estudios han informado la inhibición de la adhesión y el crecimiento microbiano en las superficies de PMMA, incluidos los rellenos de vidrio fluorados, fluorapatita, óxido de titanio TiO<sub>2</sub> recubierto de apatita, también nanopartículas de plata, nanodiamantes y nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con el fármaco antifúngico con anfotericina B y compuestos de amonio cuaternario también para su actividad antibacterial. <sup>6</sup>

Según los informes, las nanopartículas tienen una alta relación superficie-volumen que contribuye a su reactividad, asociada con el tamaño, lo que permite que las nanopartículas atraviesen barreras biológicas; en el caso de las AgNPs que se han estudiado históricamente, su acción antimicrobiana se basa en los efectos dañinos de los cationes metálicos sobre las células vivas. Se ha demostrado su eficacia contra microorganismos como bacterias, virus y hongos. Por otro lado, no todas las AgNPs parecen tener la misma eficacia antimicrobiana; a pesar de que se ha demostrado el efecto antimicrobiano de las AgNPs, este material tiene desventajas, la plata es tóxica para todas las células del cuerpo, no solo para los microbios y el problema se ve agravado por complicaciones en el control de la dosis que también pueden conducir a la decoloración de los materiales utilizados, El papel de diferentes dosis en el recubrimiento de nanopartículas a PMMA en esta investigación ayudaría a mejorar la respuesta de las nanopartículas para pruebas en modelos celulares e implementación en dispositivos por afectación por cambio

de color.<sup>20</sup> Además, se informó la mala estabilidad del color de los AgNP de PMMA, como se ve en este estudio.<sup>8</sup>

Diversos informes han utilizado la farmacología para reducir la adherencia de estos microorganismos. El potencial de resistencia bacteriana a las terapias farmacológicas ya probadas para tratar la estomatitis enfatiza la necesidad de terapias alternativas para reducir la formación de biofilms que caracteriza a esta patología. La presente investigación mostró el comportamiento del PMMA con un recubrimiento de ZnO y AgNPs en los tres grupos de PMMA, mostrando el menor valor de adhesión de levadura al grupo C1 en comparación con la adhesión bacteriana C2. En cuanto a las AgNPs, estas son efectivas contra las biopelículas porque pueden atacar múltiples sitios dentro de la célula a una concentración muy baja (0.5-1.0%) y serán efectivos en nanopartículas de no más de 50 nm para que puedan penetrar la biopelícula, que es similar en este estudio con AgNPs realizado con la técnica de T. Bala y analizado por Jasso *et al.*, siendo efectivas las nanopartículas de 4,44 nm contra biofilms.<sup>21</sup>

Con respecto a la respuesta de las bacterias Gram negativas, se ha informado que las bacterias son más susceptibles a las AgNPs; se reconoce que las nanopartículas menores de 10 nm pueden alterar directamente la permeabilidad celular, ingresar a las células bacterianas y causar daño celular.<sup>22</sup>

El resultado de esta investigación concuerda con lo reportado en otros estudios, observándose un efecto inhibitorio significativo con las AgNPs en comparación con los grupos control; es sustancial mencionar que en los grupos control los resultados no presentaron homogeneidad en su adherencia, el grupo control más bajo fue BC, mientras que hubo un comportamiento errático entre las marcas comerciales, obteniendo resultados homogéneos en BC ya sea con recubrimiento de ZnO o Ag, en cambio, la menor adherencia fue en el grupo AC con mayor eficiencia en la agregación de ZnONPs A2 y el grupo CC marca fue más efectivo con el recubrimiento de AgNPs en el grupo C1.

El uso de AgNPs ha sido de interés por su biocompatibilidad y efecto antimicrobiano; sin embargo, algunos estudios reportan que no hay una mejora significativa en las propiedades luego de su implementación; además, entre sus desventajas está que provocan la decoloración del PMMA. En la búsqueda de una nanopartícula que no genere decoloración y en base a estudios que han demostrado efectividad en la inhibición de hongos y bacterias, las ZnONPs emergen como una apuesta prometedora. Estudios han reportado que estas nanopartículas intervienen en las propiedades mecánicas; por otro lado, la inhibición dependerá del tamaño de partícula, concentración y tipo de microorganismos, a menor tamaño de partícula y mayor concentración, mayor actividad antimicrobiana.<sup>3</sup>

Las ZnONP pueden alterar el crecimiento bacteriano al interactuar con la superficie bacteriana o ingresar a la célula bacteriana, alterando el sistema enzimático bacteriano al desplazar los iones de magnesio, esenciales para la actividad enzimática de las bacterias, logrando un efecto bactericida significativo; las limitaciones en el uso de ZnONPs podrían ser las diferentes concentraciones antibacterianas efectivas contra *S. mutans*, el impacto toxicológico y los efectos potencialmente indeseables, la concentración mínima podría no ser efectiva contra *S. mutans* y una concentración mayor podría inducir citotoxicidad y genotoxicidad.<sup>55</sup>

ZnONP y AgNPs tienen una actividad antibacteriana similar, esto se puede atribuir a su capacidad para interactuar con la membrana celular de varias especies bacterianas. El zinc se ha utilizado en odontología en numerosos materiales, principalmente como componente de relleno del cemento dental, sus iones exhiben una actividad antibacteriana efectiva y este efecto es mayor cuando el óxido de zinc está presente en forma de nanopartículas, lo que se puede atribuir a su capacidad de interacción con la membrana celular de los microorganismos, las ZnONP aumentan el estrés oxidativo dentro de la célula bacteriana debido a la generación de Zn<sup>2+</sup> y especies reactivas de oxígeno que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. El efecto o toxicidad de esta nanopartícula, al igual que ocurre con las AgNPs, está asociado a la dosis.<sup>21</sup>

Estudios como el de Kamonkhantikul encontraron una reducción significativa de *C. albicans* con la adición de silano en PMMA, lo que podría estar asociado con la distribución de ZnONPs, la silanización de los grupos hidroxilo que reaccionan con los grupos hidrolizables del agente de acoplamiento silano , lo que da como resultado que el agente de acoplamiento de silano que rodea la partícula aumente la distancia entre las ZnONPs y mejore la relación superficie-volumen. <sup>3</sup>

Wady *et al.* informaron que las nanopartículas de plata tienen propiedades antifúngicas con baja liberación de Ag<sup>+</sup>. Además, encontraron que la incorporación de AgNPs en PMMA no afectó la adherencia de *C. albicans* y la acumulación de un biofilm ya que no encontraron diferencias significativas entre los grupos control y las resinas acrílicas que contenían AgNPs; sin embargo, en este estudio la adherencia del microorganismo fue significativamente menor con el recubrimiento de PMMA, todos los grupos control mostraron homogeneidad en los valores, las marcas B y C mostraron un comportamiento similar, siendo más efectivo el grupo con AgNPs B1 y C1 que aquellos con los grupos ZnO B2, C2 y B presentaron la mayor adherencia de todos los materiales evaluados con el grupo A1 de Ag, a diferencia del grupo Zn A2.

Además, Wady *et al.*, coinciden con lo reportado por otros autores, mencionando que las partículas de menor tamaño son las de mayor efecto antimicrobiano y permiten el paso a la membrana celular; además, los elementos que contienen fósforo y ADN pueden ser sitios preferenciales para la unión de AgNPs ya que la plata tiene una alta tendencia a reaccionar con dicho compuesto.

La eficacia antimicrobiana de los polímeros con AgNPs se atribuye a la difusión de moléculas de agua en el material al momento de la polimerización, generando la migración de iones de plata o AgNPs a través del polímero hacia el medio acuoso. Por lo tanto, las propiedades del polímero matriz y sus características de difusión de agua juegan un papel en el proceso de liberación de las AgNPs. Se ha informado que la superficie celular y la hidrofobicidad del polímero se correlacionan con la adhesión de *C. albicans* . <sup>56</sup>

La biocompatibilidad es la propiedad de un material que no muestra un efecto tóxico sobre las células *in vitro*, las pruebas de citotoxicidad son necesarias para seleccionar nuevos materiales para uso futuro en la práctica clínica. El ensayo de bromuro de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio es un método basado en la evaluación de la función mitocondrial tras la exposición a sustancias potencialmente tóxicas, en este caso, nanopartículas con diferentes líneas celulares.<sup>16, 36</sup>

En este estudio, la citotoxicidad de ZnONPs mostró resultados de toxicidad en HGF esto coincide con Srakaew *et al.*, reduciendo los efectos tóxicos de las nanopartículas de Zinc al agregar quitosano fosforilado de sodio.<sup>21</sup>

Liu *et al.* encontraron que los AgNP de 5 nm eran más tóxicos que los AgNP de 20 y 50 nm en cuatro tipos de líneas celulares (A549, HepG2, MCF-7, SGC-7901), lo que muestra un efecto dependiente del tamaño de las nanopartículas sobre la viabilidad celular que podría ser relacionados con los resultados obtenidos en este estudio. Ambas líneas celulares (HGF, SCAP) en contacto con ZnO y AgNPs con diferentes marcas comerciales de PMMA mostraron resultados que van desde moderadamente en los grupos A2, B1 y C2 hasta extremadamente citotóxicos para los grupos A1, B2 y C1 en HGF según la clasificación de toxicidad de la ISO 10993.<sup>5</sup>

El efecto citotóxico podría estar asociado al tamaño de la nanopartícula, como se menciona en otros estudios *in vitro* ya que la toxicidad de las AgNPs presenta aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo, daño mitocondrial y daño en el ADN, esto en diferentes tipos de líneas celulares.

Además, en las AgNPs se observó que cuando se administran en líneas celulares (MC3T3-E1, PC12), inducen muerte celular cuando tienen un tamaño de 10 nm, siendo la toxicidad mayor que las AgNPs de 50-100 nm; esto podría explicar por qué el recubrimiento con nanopartículas de aproximadamente 4 nm resultó tóxico con las líneas celulares utilizadas, principalmente con las SCAP.<sup>5</sup>

Ikielowicz *et al.* encontraron que la exposición de AgNPs a HGF da como resultado un aumento del estrés oxidativo, lo que desencadena una cascada de reacciones inflamatorias que llevan a la apoptosis y al deterioro de la viabilidad celular, pero esto depende de la concentración, la exposición, el tamaño y el tipo de nanopartícula como se menciona en otras investigaciones, también mostraron que las AgNPs en contacto con HGF se internalizaron y se encontraron principalmente en las mitocondrias que son vulnerables al estrés oxidativo, esto también podría explicar el resultado de este estudio. <sup>57</sup>

Dentro de las limitaciones de este estudio, no se analizó si el recubrimiento de NPs sobre PMMA altera las propiedades físicas del material, ni si la liberación de monómero residual influyó en el efecto inhibitorio y viabilidad celular; Por otro lado, sería útil manejar PMMA termopolimerizable para acercarse al estudio a la práctica clínica, así como probar el uso de diferentes dosis y tamaños de NPs para evitar la citotoxicidad que presenta o el uso de un agente que regule el efecto directo de NPs con medios celulares, así como se propone su aplicación en modelos animales con la intención de ampliar más el conocimiento de la reacción de dicho recubrimiento.

## 9. Conclusiones

La adición de NPs en PMMA señala el uso potencial de este nuevo biomaterial como medida terapéutica ante la adhesión de microorganismos en PMMA ya que mejoró notablemente su efecto inhibitorio, demostrándolo en todos los grupos con recubrimiento de NPs.

Por otro lado, los hallazgos de esta investigación son los siguientes:

El tamaño de las nanopartículas juega un papel importante en la disminución de la viabilidad celular, la inhibición de microorganismos fue adecuada en esta investigación por lo que se consideró que se alcanzaron granulometrías adecuadas para éste propósito.

Las marcas de PMMA mostraron una respuesta interesante en contacto con medios bacterianos y de levaduras, Opti-Cryl mostró mayor adherencia pero todos reaccionaron favorablemente a la agregación del recubrimiento.

A la luz de esta investigación, el óxido de zinc y plata son agente antibacteriano y antifúngico eficaces, con ZnONPs presentó buena inhibición para la adhesión de *S. mutans* y *C. albicans* en la marca Opti-Cryl, incluso mejor que los grupos con nanopartículas de plata, es decir, tiene un uso potencial para ser considerado a los materiales dentales con efecto inhibitorio, por lo que podría ser utilizado para la prevención de la estomatitis protésica, con enfoques prometedores en odontología, de acuerdo a nuestros resultados esta síntesis es efectiva para dicha intención.

La posterior evaluación del efecto citotóxico en modelos celulares demostró que la exposición de HGF y SCAP ante el recubrimiento de ZnO y AgNPs en PMMA comprometió la viabilidad celular, lo que amplía el conocimiento de la respuesta de ZnO y AgNPs, en el caso de SCAP, el mecanismo de toxicidad aún no está claro porque mostró una respuesta variable en comparación con HGF y, por lo tanto, se necesitan más estudios para su implementación a dispositivos dentales.

Adicionalmente, se sugieren más estudios para evaluar los efectos genotóxicos de la implementación de un recubrimiento de NPs en PMMA y su uso clínico.

## 10. Referencias

1. Subramini K, Ahmed W. Nanobiomaterials in clinical dentistry, 2 Ed. 2019
2. Cierech M, Osica I, Kolenda A, et al. Mechanical and Physicochemical Properties of Newly Formed ZnO-PMMA Nanocomposites for Denture Bases. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8 (5):305.
3. Kamonkhantikul K, Arksornnukit M, Takahashi H. Antifungal, optical, and mechanical properties of polymethylmethacrylate material incorporated with silanized zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 2353-2360.
4. Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov Today*. 2019; 24 (1):85-98.
5. Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Vilar-Pineda J, Martínez-Espinosa JC, de la Fuente-Hernández J, Castaño VM. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 3999-4006.
6. Zafar MS. Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): An Update. *Polymers (Basel)*. 2020;12 (10): 2299.
7. Cierech M, Kolenda A, Grudniak AM, et al. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. *Int J Pharm*. 2016; 510 (1): 323-335.
8. Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Nöpänkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 3801-3812.
9. Kenneth J. Anusavice. Phillips. Ciencia de los materiales dentales. 11ª edición. Málaga, España; Elsevier Saunders; 2004: 77-99.

10. Zheng J, Su Q, Wang C, et al. Synthesis and biological evaluation of PMMA/MMT nanocomposite as denture base material. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22 (4): 1063-1071.
11. Thaitamyanon P, Sirichompun C, Wiwatwarrapan C. Ultrasonic treatment reduced residual monomer in methyl methacrylate-based orthodontic base-plate materials. *Dent Oral Craniofac Res*. 2018 4 (3): 1-5.
12. Vikram S, Gopi N. Effect of zinc oxide nanoparticles on the flexural strength of polymethylmethacrylate denture base resin. *Eur Oral Res*. 2020; 53 (1): 31-5.
13. Song W, Shaohua G. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecule*. 2019, 24: 1033.
14. De matteis V, Cascione M, Cristina C. Silver nanoparticles addition in poly (methylmethacrylate) Dental Matrix: Topographic and Antimycotic Studies. *Int J Mol Sci*. 2019, 20, 4961.
15. Gad M, Mohammed S. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Proble*. 2020; 57 (1): 95-102.
16. Cierech M, Wojnarowicz J, Kolenda A, et al. Zinc Oxide Nanoparticles Cytotoxicity and Release from Newly Formed PMMA-ZnO Nanocomposites Designed for Denture Bases. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9 (9):1318.
17. Fejerskov, O., Kidd, E., 2008. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*, second ed. Blackwell Munksgaard, Oxford.

18. Almoudi MM, Hussein AS, Abu Hassan MI, Mohamad Zain N. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. *Saudi Dent J*. 2018; 30 (4): 283-291.
19. Mihai A. *Nanobiomaterials in Dentistry*, vol. 11. Elsevier, 2016
20. Jandt K, Watts D. Nanotechnology in dentistry: present and future perspectives on dental nanomaterials. *Dent Mat*. 2020, 36: 1365-1378.
21. Padovani G, Feitosa V, Sauro S. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends in Bio*. 2015, 20: 1-17
22. Xiaoxeu I, Zhang J, Shuping I, et al. The Antibacterial Mechanism of silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J of Nano*. 2020, 15: 2555-2562.
23. Noronha V, Paula A, Durán G. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mat*. 2017, 2982.
24. Rocha, F.S., Gomes, A.J., Lunardi, C.N., Kaliaguine, S. and Patience, G.S. (2018), Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *Can. J. Chem. Eng.*, 96: 2512-2517.
25. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (9):1534.
26. Ray TR, Lettiere B, de Rutte J, Pennathur S. Quantitative characterization of the colloidal stability of metallic nanoparticles using UV-vis absorbance spectroscopy. *Langmuir*. 2015; 31 (12): 3577-3586.

27. Diar- Bakirly S, El-Bialy T. Human gingival fibroblasts: isolation, and characterization and evaluation of CD146 expression. Saudi J Biol Sci. 2021; 28: 2518-2526.
28. Bationo R, Rouamba A, Diarra A, Beugré-Kouassi M, Jordana F, Beugré JB. Culture of human gingival fibroblast: an experimental model. Cell Biol. 2020; 1: 8-11.
29. Gamal A, Al-Berry N, Hassan A, Rashed V, Iacono V. *In vitro* evaluation of the human gingival fibroblast/gingival mesenchymal stem cell dynamics through perforated guide tissue membranes: cell migration, proliferation and membrane stiffness assay. J Periodon Res. 2017.
30. Nada O, El Bacly R. Stem cell from the apical papilla (SCAP) as tool for endogenous tissue regeneration. 2018; 6: 1-16.
31. Bakopoulou A, About I. Stem cells of dental origin: current research trends and key milestones towards clinical application. Stem cells Int. 2016; 16:1-20.
32. Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. Biomed Res Int. 2019: 1-8.
33. Jawetz. Medical's microbiology, 26<sup>th</sup> ed. Mc Graw Hill 2016
34. Velasco J, Araque M, Araujo E, Longa A, Nieves B. Manual práctico de bacteriología clínica. 1<sup>a</sup> Ed, Universidad de los Andes, 2008
35. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria- A review. Act Histo. 2018: 303-311.
36. Moreno-Maldonado, V., Acosta-Torres, L. S., Barceló-Santana, F. H., Vanegas-Lancón, R. D., Plata-Rodríguez, M. E., & Castano, V. M. Fiber-

reinforced nanopigmented poly (methyl methacrylate) as improved denture base. Journal of Applied Polymer Science. 2012, 126 (1): 289-296.

37. Méndez-Serrano, J., Velazquez-Enriquez, U., Contreras-Bulnes, R., De La Rosa-Gómez, I., Sawada, T., & Yamaguchi, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* to silver nanoparticle-modified polymethylmethacrylate. *Interciencia*. 2020, 45 (1), 23-27.
38. Vazquez-Muñoz, R, Avalos-Borja, M, Castro-Longoria, E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PloS one*. 2014, 9 (10), 10887.
39. Acrylics- Opti-Cryl [Internet] Opti.cryl [Consultado 2022 mayo 16] <https://www.newstetic.com/producto/veracril-opticryl-autopolimerizable-monomero/>
40. Acrylics- Nic- Tone [Internet] Nic.tone [Consultado 2022 mayo 16] [https://dentalmdc.us/our-brands/nictone\\_poly/](https://dentalmdc.us/our-brands/nictone_poly/)
41. Acrylics- Lang [Internet] Lang [Consultado 2022 mayo 16] <https://www.langdental.com/products-Ortho-Jettm-Package-60>
42. ISO-20795-2, “Dentistry Base polymers. Part 2: orthodontic base polymers”, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2013.
43. B Bala T, Armstrong G, Laffir F, Thornton R. Titania-silver and alumina-silver composite nanoparticles: novel, versatile synthesis, reaction mechanism and potential antimicrobial application. *J Colloid Interface Sci*. 2011; 356 (2):395-403.

44. J Jasso-Ruiz, I.; Velazquez-Enriquez, U.; Scougall-Vilchis, R.J.; Lara-Carrillo, E.; Toral-Rizo, V.H.; López-Castañares, R.; Morales-Luckie, R.A. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles on Orthodontic Brackets: A New Alternative in the Prevention of White Spots. *Coatings* 2019, 9, 480.
45. Abd-Elhady HM, Ashor MA, Hazem A, et al. Biosynthesis and Characterization of Extracellular Silver Nanoparticles from *Streptomyces aizuneusis*: Antimicrobial, Anti Larval, and Anticancer Activities. *Molecules*. 2021;27(1):212.
46. Thomas R, Snigdha S, Bhavitha KB, Babu S, Ajith A, Radhakrishnan EK. Biofabricated silver nanoparticles incorporated polymethyl methacrylate as a dental adhesive material with antibacterial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans*. *3 Biotech*. 2018; 8 (9):404
47. Bauer A. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966, 45 (4), 493-496.
48. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 1227-1249.
49. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJ. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(8):1051-1059.
50. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2):55-63.

51. ISO 10993-5, "Biological evaluation of medical devices. Part 5 Test for in vitro cytotoxicity", International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.
52. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2018; 28 (10).
53. Diario Oficial de la Federación. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud 1984. México; 2017.
54. S Schendel KU, Lenhardt M, Fusenig NE, Komposch G. The testing of the toxicity of the plastics used in orthodontics. *Fortschr Kieferorthop.* 1992; 53 (6): 354.
55. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol.* 2012;112(6):1163-1172.
56. Inkielewicz-Stepniak I, Santos-Martinez MJ, Medina C, Radomski MW. Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1677-1687.

## 11. Anexos

### Anexo I. Comprobante de plagio

The screenshot shows the iThenticate interface. The top header includes the iThenticate logo, the document title "Análisis de toxicidad y efecto inhibitorio de microorganismos mediante la adición de nanopartículas de óxido de zinc y plata", the author "POR ARELI JOACABED VILLAGRÁN VALLEGAS", and a summary of exclusions: "Citas excluidas Bibliografía excluida" and a similarity score of "1% SIMILAR".

The main content area is titled "Resumen" and contains the following text:

**Introducción:** El polimetilmetacrilato (PMMA) utilizado en prótesis para la rehabilitación de pacientes edéntulos o parcialmente edéntulos, niños con aparatología fija o removible y pacientes con trastornos articulares, ha sido el material de primera elección por su fácil manejo y fácil adaptación en las estructuras orales, aunque a su vez es un importante colonizador del ambiente oral. **Objetivo:** Evaluar cuantitativamente el nivel de citotoxicidad que se ejerce sobre fibroblastos gingivales humanos (HGF) y células madre de papila apical (SCAP), así como la adhesión de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y *Candida albicans* (*C. albicans*) en PMMA autopolimizable adicionado con recubrimiento de ZnO y AgNPs. **Métodos:** Se confeccionaron 108 de muestras de PMMA de 3 marcas comerciales (Opti-Cryl™, Nic-Tone™ y Lang™) posteriormente se realizó una síntesis química por el método de T. Bala para el recubrimiento de nanopartículas con precursor de óxido de zinc (Acetato de Zinc, Fagalab) y plata (Sales de plata, Fagalab 2276). Se obtuvieron 54 muestras de 5 x 2 mm y se inocularon en HGF y SCAP, y 54 muestras de 10 x 2 mm éstas se inocularon en caldo de cultivo de *S. mutans* y *C. albicans*, evaluandolas a través del ensayo de reducción de sales de tetrazolio- MTT (bromuro

On the right side, a "Resumen de Coincidencias" panel shows a single match:

| Match ID | Source   | Words       | Copy Date              | Similarity |
|----------|----------|-------------|------------------------|------------|
| 1        | Internet | 94 palabras | Copiado el 06-Dic-2020 | 1%         |

The match source is identified as "ruemex.mx".

At the bottom of the page, a status bar indicates "PÁGINA: 1 DE 60" and "Versión solo texto del ...".

## Anexo II. Instrumento de Medición

**Nombre del investigador principal:** Areli Jocabed Villagrán Villegas

**Título:** Análisis de toxicidad y efecto inhibitorio de microorganismos mediante la adición de nanopartículas de óxido de zinc y plata en polimetilmetacrilato

| Ensayo 1 |                          |                |                           |                      |                     |
|----------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|---------------------|
| Fecha    | Línea celular (SCAP-HGF) | Conteo celular | Nanopartículas utilizadas | PMMA Marca comercial | (%) Células viables |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |

| Ensayo 2 |                          |                |                           |                      |                     |
|----------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|---------------------|
| Fecha    | Línea celular (SCAP-HGF) | Conteo celular | Nanopartículas utilizadas | PMMA Marca comercial | (%) Células viables |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |

| Ensayo 3 |                          |                |                           |                      |                     |
|----------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|---------------------|
| Fecha    | Línea celular (SCAP-HGF) | Conteo celular | Nanopartículas utilizadas | PMMA Marca comercial | (%) Células viables |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |
|          |                          |                |                           |                      |                     |

| Ensayo 1 |                |          |                           |                         |                        |
|----------|----------------|----------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Fecha    | Microorganismo | Colonias | Nanopartículas utilizadas | PMMA<br>Marca comercial | (%)<br>Células viables |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |

| Ensayo 2 |                |          |                           |                         |                        |
|----------|----------------|----------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Fecha    | Microorganismo | Colonias | Nanopartículas utilizadas | PMMA<br>Marca comercial | (%)<br>Células viables |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |

| Ensayo 3 |                |          |                           |                         |                        |
|----------|----------------|----------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Fecha    | Microorganismo | Colonias | Nanopartículas utilizadas | PMMA<br>Marca comercial | (%)<br>Células viables |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |
|          |                |          |                           |                         |                        |