



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela  
Nacional de  
Estudios  
Superiores

UN/M  
POSGRADO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD LEÓN  
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIONES EN ODONTOLOGÍA**

**Estudio comparativo in vitro del efecto antimicrobiano,  
citotóxico y estrés oxidativo de Fluoroplat, Saforide y  
Fagamin**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de Especialista en Odontología  
Pediátrica**

**Presenta:**

**Paulina Lozano Garza**

**Director: M. en C. Paloma Netzayeli Serrano Díaz**

**Asesores: Dr. René García Contreras  
Esp. Abraham Mendoza Quintanilla**

Escuela Nacional de Estudios Superiores, León, Guanajuato. Junio, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

A mis papás y mi hermana, por siempre apoyarme y confiar en mí. Gracias por ayudarme y enseñarme a luchar para cumplir mis sueños, este logro es gracias a ustedes

A Omar por apoyarme y motivarme a seguir

A Domy y Polo que a pesar de la distancia, siempre están presentes

A mis amigos Cynthia, Cristian, Dainer, Gustavo, Mitzy, Nayeli, Paola, Pedro, Rodrigo, Samuel y Yareli. Gracias por todos los momentos que compartieron conmigo

## **Agradecimientos**

A la ENES, por darme la oportunidad de formarme como especialista.

A los doctores Paloma Netzayeli Serrano Díaz, René García Contreras, Abraham Mendoza Quintanilla, y Germán Villanueva Sánchez por su tiempo compartido y por las facilidades que me otorgaron para realizar esta tesis.

# ÍNDICE

Resumen .....	7
Abstract .....	8
Introducción.....	9
CAPÍTULO I .....	11
1.0 Marco teórico.....	12
1.1 Caries .....	12
1.2 Plata.....	14
1.3 Remineralización .....	14
1.4 Fluoruro diamino de plata .....	16
1.4.1. Ventajas de Fluoruro diamino de plata .....	18
1.4.2. Desventajas de Fluoruro diamino de plata.....	18
1.4.3. Indicaciones del FDP .....	18
1.4.4. Contraindicaciones .....	19
1.4.5. Marcas comerciales de fluoruro diamino de plata al 38%.....	20
1.4.6. Protocolo para aplicación de fluoruro diamino de plata al 38% .....	23
Antecedentes .....	25
CAPÍTULO II .....	27
2.1. Planteamiento del problema.....	28
2.2. Pregunta de investigación .....	29
2.3. Justificación.....	30
2.4. Objetivo general .....	31
2.5. Objetivos específicos .....	31
2.6. Hipótesis.....	32
CAPÍTULO III .....	33
3.1. Materiales y Métodos .....	34
3.2. Criterios de selección .....	34
3.3. Variables .....	35
3.3.1. Descripción de variables.....	35
3.4. Procedimiento .....	37
3.4.1.-Ensayo de susceptibilidad Antimicrobiano.....	37
3.4.1.1. Difusión en Agar.....	37
3.4.1.2. Microdilución .....	38
3.4.2. Citotoxicidad .....	39

3.4.3.Estrés oxidativo .....	40
Consideraciones éticas .....	42
CAPÍTULO IV .....	43
Resultados .....	44
4.1. Ensayo de susceptibilidad Antimicrobiano .....	44
4.1.1 Difusión en agar .....	44
4.1.2 Microdilución .....	45
4.2. Citotoxicidad .....	47
4.3.Estrés oxidativo .....	53
Discusión.....	53
Conclusiones.....	56

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Prueba de Kruskall Wallis, ensayo de difusión en agar .....	45
Gráfica 2 Especies reactivas de oxígeno.. .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Stretococcus mutans ATCC35668 .....	133
Tabla 2 Operacionalización de variables.....	3735
Tabla 3 Resultados citotoxicidad 1, 3 y 5 minutos.....	4847
Tabla 4 Resultados 15 y 30 minutos, 1 hora. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 49
Tabla 5 Resultados 3, 6 y 24 horas.....	5050
Tabla 6 Resultados de cc50 .....	5252

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Instructivo Saforide.....	21
Fig. 2 Caja de 96 pocillos .....	39
Fig. 3.Distribución de dosis en ensayo de difusión en agar .....	45
Fig. 4 Distribución de dosis en ensayo de difusión en agar .....	45
Fig. 5 Dosis bacteriostática y bactericida .....	46
Fig. 6 Minuto 1, Control .....	53
Fig. 7 Minuto 1, Fluoroplat 1.9mM.....	53
Fig. 8 Minuto 1, Saforide 1.9mM .....	53
Fig. 9 Minuto 1, Fagamin 1.9mM.....	53
Fig. 10 Minuto 1, Fluoroplat 31mM.....	53

Fig. 11 Minuto 1, Saforide 31mM .....	53
Fig. 12 Minuto 1, Fagamin 31mM.....	53
Fig. 13 Minuto 1, Fluoroplat 62mM.....	53
Fig. 14 Minuto 1, Saforide 62mM .....	53
Fig. 15 Minuto 1, Fagamin 62mM.....	53
Fig. 16 Minuto 1, Fluoroplat 124mM.....	53
Fig. 17 Minuto 1, Saforide 124mM .....	53
Fig. 18 Minuto 1, Fagamin 124mM.....	53

## Resumen

**Introducción:** Uno de los principales problemas de salud pública en odontología es la caries, a pesar de los intentos realizados por disminuirla no se ha tenido éxito. El fluoruro diamino de plata es una solución utilizada tópicamente, que inhibe la progresión de caries, sin embargo, su uso seguro no se ha determinado ampliamente. **Objetivo:** Comparar el efecto citotóxico del fluoruro diamino de plata  $[Ag(NH_3)_2F]$  de tres distintas marcas Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) en células pulpares humanas (CPH) y el efecto antimicrobiano en *Streptococcus mutans* ATCC 35668. **Metodología:** Estudio experimental *in vitro*. El  $Ag(NH_3)_2F$  fue inoculado a diferentes concentraciones (0-124 mM), la actividad antimicrobiana se realizó por difusión en agar para determinar zona de inhibición y microdilución para determinar dosis mínima inhibitoria, la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT (Tiempo dosis-respuesta), se realizó ensayo de fluorimetría intracelular para detectar especies reactivas de oxígeno. Se realizaron pruebas no paramétricas, para agar Kruskal Wallis y pruebas paramétricas para citotoxicidad, microdilución y estrés oxidativo análisis estadísticos de ANOVA y prueba pos-hoc de Tukey fijando un valor de  $p < 0.05$ . Los ensayos se realizaron por triplicado hasta obtener reproducibilidad en los métodos ( $n=27$ ). **Resultados:** El ensayo de difusión en agar mostró una media en las zonas de inhibición de: Fluoroplat:  $7.6 \pm 0.4$ - $13.4 \pm 2.0$ mm, Saforide:  $5.33 \pm 0.6$ - $13.69 \pm 1.8$ mm, Fagamin:  $7.17 \pm 0.15$ - $12.50 \pm 0.44$ mm, control positivo (penicilina 10,000 u/ml y estreptomycin 10mg):  $25.43 \pm 5.16$ mm. Se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Fluoroplat, Saforide y Fagamin de 31 mM como dosis bacteriostática y 62 mM de dosis bactericida. El contacto directo con los tres agentes indujeron una muerte celular irreversible y reducción significativa ( $p < 0.05$ ) de la viabilidad celular desde el minuto de contacto en cultivo con CPH obteniendo la siguiente media en la dosis máxima de 124mM: 1 minuto Fluoroplat  $48.6 \pm 9.6$ , Saforide  $46.2 \pm 7.1$ , Fagamin  $48.4 \pm 9.7$ , 3 minutos Fluoroplat  $13.3 \pm 6$ , Saforide  $12.9 \pm 6$ , Fagamin  $13.9 \pm 24$ , 5 minutos Fluoroplat  $37 \pm 9$ , Saforide  $29.7 \pm 1.1$ , Fagamin  $33.4 \pm 1.7$ , 15 minutos Fluoroplat  $33.1 \pm 1.1$ , Saforide  $32.7 \pm 1.3$ , Fagamin  $38.1 \pm 9$ , 30 minutos Fluoroplat  $63.3 \pm 1$ , Saforide  $47.4 \pm 1.5$ , Fagamin  $62.1 \pm 1.4$ , 1 hora Fluoroplat  $49.5 \pm 1.8$ , Saforide  $41.7 \pm 2.6$ , Fagamin  $45.5 \pm 1$ , 3 horas Fluoroplat  $55.7 \pm 3.5$ , Saforide  $47.7 \pm 5$ , Fagamin  $54.4 \pm 2.4$ , 6 horas Fluoroplat  $54.4 \pm 5$ , Saforide  $56.19 \pm 3$ , Fagamin  $53.2 \pm 1.3$ , 24 horas Fluoroplat  $69.7 \pm 2.2$ , Saforide  $103.2 \pm 12.4$ , Fagamin  $72.9 \pm 2.8$ . El producto que produce la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno es el Saforide.

**Conclusiones:** El fluoruro diamino de plata al 38% tiene efecto bactericida y una citotoxicidad moderada, por lo que su uso en la práctica clínica en odontopediatría deberá ser utilizado con todas las barreras de protección y en casos de lesiones cariosas no profundas.

**Palabras clave:** fluoruro diamino de plata, viabilidad celular, agar, microdilución, ROS, efecto antimicrobiano.

## Abstract

**Introduction:** One of the main public health problems in dentistry is dental caries, although attempts to reduce it have not been successful. Silver diamine fluoride is a topical solution which inhibits the progression of caries, however, its safe usage has not been widely determined. **Objective:** To compare the cytotoxic effect of silver diamine fluoride [Ag (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F] of three different Fluoroplat® (NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) in human pulp cells (HPC) and the antimicrobial effect in *Streptococcus mutans*. **Methodology:** In vitro experimental study, non-probabilistic sampling. The Ag (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F was inoculated at different concentrations (0-124 mM), the antimicrobial activity was performed by agar diffusion to determine the inhibition zone and microdilution to determine minimum inhibitory dose, the cell viability was determined by the MTT test (dose-response time), intracellular fluorometry assay was performed to detect reactive oxygen species. Parametric tests were performed for Kruskal Wallis agar and for cytotoxicity, microdilution and oxidative stress ANOVA statistical analysis and Tukey post-hoc test setting a value of  $p < 0.05$ . The tests were performed in triplicate until reproducibility was obtained in the methods ( $n = 9$ ). **Results:** Direct contact with the three agents induced an irreversible cell death and significant reduction ( $p < 0.05$ ) of the cell viability from the minute of contact in culture with HPC with the following ranges in the maximum dose of 124mM: 1 minute Fluoroplat  $48.6 \pm 9.6$ , Saforide  $46.2 \pm 7.1$ , Fagamin  $48.4 \pm 9.7$ , 3 minutes Fluoroplat  $13.3 \pm .6$ , Saforide  $12.9 \pm .6$ , Fagamin  $13.9 \pm 24$ , 5 minutes Fluoroplat  $37 \pm .9$ , Saforide  $29.7 \pm 1.1$ , Fagamin  $33.4 \pm 1.7$ , 15 minutes Fluoroplat  $33.1 \pm 1.1$ , Saforide  $32.7 \pm 1.3$ , Fagamin  $38.1 \pm .9$ , 30 minutes Fluoroplat  $63.3 \pm 1$ , Saforide  $47.4 \pm 1.5$ , Fagamin  $62.1 \pm 1.4$ , 1 hour Fluoroplat  $49.5 \pm 1.8$ , Saforide  $41.7 \pm 2.6$ , Fagamin  $45.5 \pm 1$ , 3 hours Fluoroplat  $55.7 \pm 3.5$ , Saforide  $47.7 \pm .5$ , Fagamin  $54.4 \pm 2.4$ , 6 hours Fluoroplat  $54.4 \pm 5$ , Saforide  $56.19 \pm 3$ , Fagamin  $53.2 \pm 1.3$ , 24 hours Fluoroplat  $69.7 \pm 2.2$ , Saforide  $103.2 \pm 12.4$ , Fagamin  $72.9 \pm 2.8$ . The agar diffusion test showed zones of inhibition with the following ranges: Fluoroplat:  $7.6 \pm 0.4$ - $13.4 \pm 2.0$ mm, Saforide:  $5.33 \pm 0.6$ - $13.69 \pm 1.8$ mm, Fagamin:  $7.17 \pm 0.15$ - $12.50 \pm 0.44$ mm, positive control (penicillin 10,000 u / ml and streptomycin 10mg):  $25.43 \pm 5.16$ mm. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of Fluoroplat, Saforide and Fagamin of 31 mM were obtained as bacteriostatic dose and 62 mM of bactericidal dose. The product that produces the most reactive oxygen species is Saforide. **Conclusions:** 38% silver diamine fluoride has a bactericidal effect and moderate cytotoxicity, so its use in clinical practice in pediatric dentistry should be used with all protective barriers and in cases of non-deep carious lesions.

**Key words:** silver diamine fluoride, cell viability, agar, microdilution, ROS, antimicrobial effect

## Introducción

El sistema estomatognático es parte fundamental de la vida porque tiene múltiples funciones como fonación, masticación, y es parte indispensable del aparato digestivo, ya que por la cavidad bucal inicia el proceso de digestión, por lo que al estar afectado disminuye la calidad de vida del paciente.<sup>1</sup>

Uno de los principales problemas de salud pública en el área de odontología es la caries, a pesar de los esfuerzos realizados a través del tiempo para disminuirla no se ha tenido éxito.<sup>2</sup>

Según la Organización Mundial de la Salud del 60-90% de los escolares y casi el 100% de adultos a nivel mundial presentan caries.<sup>3</sup> Alrededor del 30% de la población mundial en edades comprendidas entre los 65 y 74 años no tienen dientes naturales.<sup>4</sup> Estas cifras son alarmantes, ya que nos indican que la falta de salud bucal es un problema a nivel mundial.<sup>3</sup>

A nivel mundial no existe la cultura de prevención. Las personas no le dan importancia a la salud bucal, hasta que presentan dolor o sufren algún traumatismo es cuando acuden al odontólogo, lo que también es ocasionado por la falta de actividades preventivas y de promoción de la salud.<sup>5</sup>

Los patrones de enfermedad que cambian rápidamente en todo el mundo están estrechamente relacionados con el cambio de estilos de vida donde se incluye la caries y enfermedades orales.<sup>6</sup>

Uno de los principales objetivos de la odontopediatría es crear conciencia en los pacientes y en sus papás de la importancia de los órganos dentarios y sus estructuras adyacentes, mediante la prevención y curación de enfermedades del sistema estomatognático durante la infancia por lo que es importante utilizar alternativas de tratamiento que no sean tan agresivas e invasivas para el paciente cuando sea posible.<sup>7</sup>

La odontología pediátrica ha evolucionado y actualmente existe una extensa cantidad de tratamientos restauradores y preventivos. Para poder elegir el tratamiento correcto se debe tomar en cuenta las condiciones de higiene, hábitos, estilo de vida y el interés que tengan los papás en la salud bucal de sus hijos para poder mejorar el pronóstico del tratamiento.<sup>8</sup>

El fluoruro diamino de plata al 38% es una solución utilizada tópicamente, que inhibe la progresión de caries disminuyendo el riesgo de exposición pulpar en caries dentinarias profundas, permitiendo la posterior realización de la restauración definitiva.<sup>2</sup>

El propósito de este trabajo es comparar tres marcas diferentes de fluoruro diamino de plata al 38% que son: Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) para determinar la viabilidad en células pulpares humanas y cuál tiene mejor efecto antimicrobiano en *S. mutans*.

# CAPÍTULO I

# 1. Marco teórico

## 1.1 Caries

La caries es una enfermedad infecciosa, crónica e irreversible, caracterizada por la destrucción de tejidos del diente y provocada por la acción de ácidos producidos por microorganismos que integran la placa dental.<sup>9</sup>

Es la enfermedad crónica más común, los niveles más altos de caries se encuentran en los países con ingresos medios, en los que el consumo de azúcar está creciendo y los sistemas sanitarios no son capaces de proveer una prevención apropiada ni un correcto acceso a los cuidados dentales.<sup>10</sup>

Es una enfermedad de origen multifactorial, para que se pueda presentar depende de 4 factores: el primero es el huésped, que abarca la cavidad oral y las estructuras que lo componen, el segundo es la flora oral, el tercer factor es el sustrato que incluye el tipo de dieta y la cantidad ingerida, y el cuarto factor es el tiempo ya que para que los primeros tres factores puedan provocar la caries necesita transcurrir cierto tiempo.<sup>10</sup>

La microbiota oral y humana está compuesta por una gran diversidad de microorganismos.<sup>11</sup>

Es indiscutible la presencia de microorganismos acidógenos y acidúricos como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus* para su desarrollo.<sup>12</sup>

El *S. mutans* es reconocido como la bacteria oral más cariogénica.<sup>9</sup> Su morfología es de coco gram positivo, anaerobio y aerobio facultativo.<sup>13</sup>

Los principales factores de virulencia del *S. mutans*, en la producción de caries son:

1. Acidogenicidad: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto ocasiona que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.<sup>14</sup>
2. Aciduricidad: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.<sup>14</sup>
3. Acidofilicidad: El *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H +) fuera de la célula.<sup>14</sup>
- 4.- Presencia de placa dentobacteriana en la superficie del diente.<sup>15</sup>

En este estudio se utilizó *S. mutans* ATCC 35668. <sup>Tabla 1</sup>

Condiciones de crecimiento	
Temperatura	37°
Ambiente	Aeróbico. <sup>16</sup>

**Tabla 1 Condiciones de crecimiento de Streptococcus mutans ATCC35668**

El entendimiento actual de la caries dental y el surgimiento de nuevos sistemas para su diagnóstico y manejo integral han obligado a los profesionales a reconocer lesiones iniciales o subclínicas y a realizar tratamientos no operatorios que detengan la pérdida o induzcan la ganancia de minerales.<sup>17</sup>

La caries normalmente empieza de manera oculta a la vista en las fisuras del diente o en los espacios interdentarios, en su estadio inicial puede ser detenida e incluso revertida pero en su fase avanzada se forma una cavidad.<sup>10</sup> En ese momento se vuelve necesario un tratamiento para restaurar la función del diente. Si el proceso cariogénico no recibe un tratamiento oportuno, el daño continúa hasta ocasionar alteraciones a nivel pulpar y periapical, causando posteriormente necrosis pulpar.<sup>18</sup> Su tratamiento se basa en el control de la infección, la remineralización de los tejidos, el tratamiento de las complicaciones y la adecuada restauración.<sup>19</sup>

## 1.2 Plata

La biocompatibilidad de los materiales es de suma importancia en las restauraciones; las aleaciones dentales se han utilizado a lo largo de la historia de la odontología; sin embargo, diversos estudios han demostrado que existen iones metálicos desprendidos de las aleaciones que causan daño celular estructural e inducen a inflamación local.<sup>20</sup>

La plata se ha utilizado desde tiempos remotos para el cuidado de la salud, principalmente en su forma metálica, como el nitrato de plata y sulfadiazina de plata para el tratamiento de quemaduras, heridas, infecciones bacterianas<sup>9</sup>, prótesis óseas, ortopedia reconstructiva, dispositivos cardíacos, catéteres, aparatos quirúrgicos, también en forma de plata ionizable en telas para reducir el riesgo de infecciones nosocomiales y productos de higiene personal.<sup>21</sup>

Durante más de 100 años, odontólogos trataron quirúrgicamente y con éxito la caries y la enfermedad periodontal con tres metales: plata, oro y acero inoxidable.<sup>22</sup>

La plata induce la desnaturalización y la oxidación de la pared bacteriana, las cuales conducen a la ruptura de los organelos celulares internos ocasionando muerte bacteriana.<sup>20</sup>

## 1.3 Remineralización

La remineralización dental es un tratamiento alternativo de la caries, es indoloro, ya que no requiere anestesia, efectivo y de bajo costo, se basa en la aplicación tópica de compuestos fluorados los cuales forman reservorios lábiles de flúor.<sup>25</sup>

Un agente remineralizante se puede definir como una sustancia capaz de promover la remineralización del tejido dental.<sup>26</sup>

El término remineralización, es utilizado con frecuencia para incluir cualquier intento de precipitación de calcio, fosfato y otros iones dentro de la superficie del esmalte sano o parcialmente desmineralizado, es aceptado como un tratamiento basado en el uso de fluoruros que se depositan en forma de fluoruro de calcio soluble sobre la superficie de la estructura dental o dentro de las lesiones, actúa en la formación de fluorapatita cuando el pH disminuye al producirse el ataque ácido y la consecuente disolución del esmalte, liberándose hacia la saliva y placa, promoviendo los procesos de remineralización.<sup>27</sup>

La saliva es el agente remineralizante natural por excelencia por su contenido de fosfato. Bajo condiciones fisiológicas, logra de manera eficiente mantener el equilibrio entre la sustancia dental y la biopelícula, y en condiciones adversas, cuando existe deficiente remoción de biopelícula o alta ingesta de azúcares, entre otros, el pH tiende a disminuir, busca revertir el proceso de desmineralización; también se considera la saliva un vehículo clave para fomentar la remineralización del esmalte a través de otros agentes remineralizantes.<sup>23</sup>

Después de un ataque ácido, el fluido salivar amortigua los iones de hidrógeno producidos por las bacterias. Cuando el pH es superior a 5,5, de manera natural se presenta remineralización, porque la saliva está sobresaturada de calcio y fosfato con respecto al mineral dental.<sup>26</sup> Por lo que el uso de pasta fluorada es un buen tratamiento para el control de caries.<sup>8</sup>

La filosofía del tratamiento de la caries ha cambiado a través de los años, por lo que la terapia con flúor ahora se utiliza también para detener la caries, no solo para prevenir<sup>3</sup>. Existen distintos tratamientos a las lesiones de caries en sus diferentes momentos de evolución.<sup>12</sup>

La aplicación tópica de flúor proporciona un método no invasivo para el control y prevención de caries, es rentable y fácil de operar. Por lo tanto, los barnices de flúor

se han utilizado ampliamente para tratar la hipersensibilidad de la dentina, prevenir la caries y remineralizar la caries temprana.<sup>23</sup>

#### **1.4 Fluoruro diamino de plata**

El fluoruro diamino de plata ( $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ ) es un agente económico utilizado para el control de la caries, puede ser usado para ayudar a cumplir con los objetivos del milenio de la Organización Mundial de la Salud y cumplir con los criterios del Instituto de Medicina de EE. UU. para el cuidado médico del siglo 21.<sup>27</sup>

El camino propuesto para lograr estos objetivos es la provisión de un paquete básico de salud bucal, que consiste en: atención de emergencia, prevención y que las intervenciones sean rentables, en ese orden.<sup>22</sup> Para lograr estos objetivos, se requerirá el uso de tecnologías simples para mejorar acceso a la atención de salud bucal a un costo mucho menor. Al mismo tiempo, todas las intervenciones preventivas deberán basarse en una evidencia firme. Con la continua expansión de la población y la disminución de la disponibilidad de odontólogos para brindar atención de emergencia y tratamiento restaurador, lo más probable es que el camino hacia la salud oral será un enfoque intenso en la prevención por lo que los compuestos del fluoruro diamino de plata pueden llenar parcialmente esta necesidad.<sup>22</sup>

En 1969 se empezó a utilizar el fluoruro diamino de plata para detener lesiones cariosas en esmalte, incluso en molares permanentes que se encuentran en proceso de erupción, normalmente es una zona de difícil control de placa por lo que muchas veces presentan lesiones cariosas sin haber erupcionado por completo.<sup>24</sup>

La FDA aprobó su uso al 38% en el año 2014,<sup>15</sup> el Consejo Central Farmacéutico del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón lo aceptó como agente terapéutico para tratamiento dental hace medio siglo.<sup>28</sup>

Por la simplicidad y el bajo costo del fluoruro diamino de plata, ha ganado mucha atención en la última década.<sup>29</sup> El efecto cariostático, así como sus propiedades desensibilizantes y bactericidas, han colocado al fluoruro diamino de plata como uno de los principales fluoruros preventivos; combina los efectos antibacterianos de la plata y los efectos remineralizantes del flúor estabilizado en una solución de amoníaco alcalino, proporcionando arresto de caries, prevención de caries secundaria y desensibilización de la dentina.<sup>30</sup>

Estudios clínicos y de laboratorio sugieren que es más efectivo el uso de fluoruro diamino de plata que flúor en barniz.<sup>9</sup>

El fluoruro diamino de plata es una solución sin color utilizada tópicamente al 38%, que inhibe la progresión de caries, disminuyendo el riesgo de exposición pulpar en caries dentinarias profundas, y permitiendo la posterior realización de la restauración definitiva.<sup>31</sup>

En combinación con la hidroxiapatita del esmalte dentario, es capaz de reaccionar rápidamente formando fosfato de plata insoluble ( $\text{PO}_4\text{Ag}_3$ ), de tal forma que el flúor actuaría sobre el esmalte formando la flúorapatita y la  $\text{Ag}^+$  sobre las proteínas del tejido dentinario, aumentando de esta manera la resistencia a las caries. Cuando la dentina se encuentra comprometida, penetra los túbulos dentinarios bloqueando el lumen, además de tener efecto antimicrobiano inactivando bacterias cariogénicas.<sup>23</sup>

Estudios in vitro han demostrado que el fluoruro diamino de plata penetra aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  en esmalte y 50-200  $\mu\text{m}$  en dentina.<sup>24</sup> El nivel de esta solución en saliva dura 6 horas después de su aplicación.<sup>25</sup>

Existen distintas concentraciones de fluoruro diamino de plata, pero la más común y la que ha demostrado tener mejor efecto es al 38%, que contiene 44,800 ppm F.<sup>32</sup>

#### **1.4.1. Ventajas del Fluoruro diamino de plata**

- Actividad antimicrobiana.
- Promueve la remineralización de la lesión de caries.
- El procedimiento es muy sencillo y de bajo costo.
- No requiere mucha infraestructura pudiendo llegar a lugares donde es difícil el acceso a un servicio dental.
- Se puede utilizar con niños que cooperen poco, que sean muy aprehensivos o con alguna necesidad especial.<sup>28</sup>
- Tiempo corto de trabajo.<sup>33</sup>
- Disminuye la necesidad de tratamientos invasivos.
- Evita el uso de la pieza de mano.
- Evita el uso de anestésicos locales.
- Disminuye el miedo.<sup>17</sup>
- Inhibe formación de placa dentobacteriana.<sup>22</sup>

#### **1.4.2. Desventajas del Fluoruro diamino de plata**

- Pigmentación de color negro de la zona afectada por caries, por lo que no es un producto estético, aunque el esmalte periférico sano no se pigmenta.<sup>25</sup>
- Se debe tener un control para evitar su contacto con tejidos blandos, ya que puede provocar lesiones que normalmente desaparecen en 48 horas sin necesidad de algún tratamiento.<sup>34</sup>
- Si se pigmenta la ropa es permanente.<sup>28</sup>
- Sabor metálico en el momento de la aplicación.

#### **1.4.3. Indicaciones del Fluoruro diamino de plata**

- Tratamiento de caries en dentición temporal.
- Prevención de caries de primer grado en molares permanentes

- Tratamiento de sensibilidad dentinaria.
- Tratamiento de pilares de prótesis desvitalizados para reducir filtración marginal.
- Prevención de caries secundarias.<sup>25</sup>
- Pacientes con alto riesgo de caries.<sup>31</sup>
- Prevención de caries radicular.<sup>28</sup>
- Desinfección de conductos radiculares.<sup>17</sup>
- Pacientes con múltiples lesiones cariosas que no pueden ser tratadas todas en una sola visita.<sup>32</sup>
- Cuando el tratamiento restaurativo para dientes primarios no es una opción.<sup>35</sup>

#### **1.4.4. Contraindicaciones**

- Sector anterior, por estética.
- Tratamiento de lesiones de caries profundas.<sup>25</sup>
- Alergia a los componentes.<sup>31</sup>

Grandes cantidades de flúor pueden provocar fluorosis y la plata se puede absorber a través de la mucosa en la boca, cavidad nasal y tejidos de la pulpa y dentina acumulándose en el cuerpo; por lo tanto, es importante que los médicos conozcan el contenido y la estabilidad de la plata y el fluoruro en productos comerciales.<sup>30</sup>

La literatura actual no ha reportado efectos sistémicos por el uso de fluoruro diamino de plata al 38%.<sup>36</sup>

En cuanto al problema de estética se realizó un estudio en el que evaluaban la aceptación de los padres a la tinción del fluoruro diamino de plata en el cuál concluyeron que la tinción en los dientes posteriores fue más aceptable que la tinción en dientes anteriores, aunque la tinción en los dientes anteriores era indeseable, la mayoría de los padres prefirieron esta opción a técnicas como sedación o anestesia

general cuando existía problemas de conducta en sus hijos, prefiriendo comprometer la estética. Por lo que se recomienda incluir en el consentimiento informado fotografías de la pigmentación, especialmente cuando se colocará en dientes anteriores.<sup>37</sup>

El fluoruro diamino de plata se encuentra en concentraciones de 10%, 12%, 30%, and 38%.<sup>38</sup> Se ha sugerido el uso del fluoruro diamino de plata en menor concentración al 38%, pero los resultados son inconsistentes, por lo que se tiene que utilizar al 38% si se quiere detener la caries.<sup>28</sup>

#### **1.4.5. Marcas comerciales de fluoruro diamino de plata al 38%**

Existen distintas marcas comerciales de fluoruro diamino de plata al 38%, en el presente estudio utilizaremos Fluoroplat® (NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) y las tres marcas tienen una concentración del 38% y vienen en presentación de gotero de 5 ml.

##### **Fluoroplat® (NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina)**

Está compuesto por: nitrato de plata, ácido fluorhídrico, hidróxido de amonio y agua.

Aplicación: tópica

1. Limpie la superficie a tratar.
2. Secar con aire.
3. Aplicar fluoroplat pinceleando una fina capa con una torunda de algodón embebido durante un lapso no mayor a tres minutos.
4. Enjuague con abundante agua o solución salina de 1- 3%.

Presentación

Kit: frasco de 5 y 10 ml con mango aplicador y cepillos descartables.

Repuesto: frasco de 5 y 10 ml.

# Precauciones

El fluoruro diamino de plata al 38% es ligeramente irritante de los tejidos blandos. Si accidentalmente la encía fuese afectada se irritara tornándose blanquecina. La lesión es reversible en un término máximo de 48 horas. Si desea acelerar el proceso, tratar con solución de benzocaína tópica al 12, 15 o 20%.

La aplicación de fluoruro diamino de plata al 38% origina una pigmentación marrón oscuro a negro. El uso de soluciones salinas al 1-3% y agua oxigenada diluida se recomienda para neutralizar este efecto y evitar el teñido de áreas no deseadas.<sup>39</sup>

## Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón)

Se anexa instructivo en japonés por problemas de traducción. Fig.1

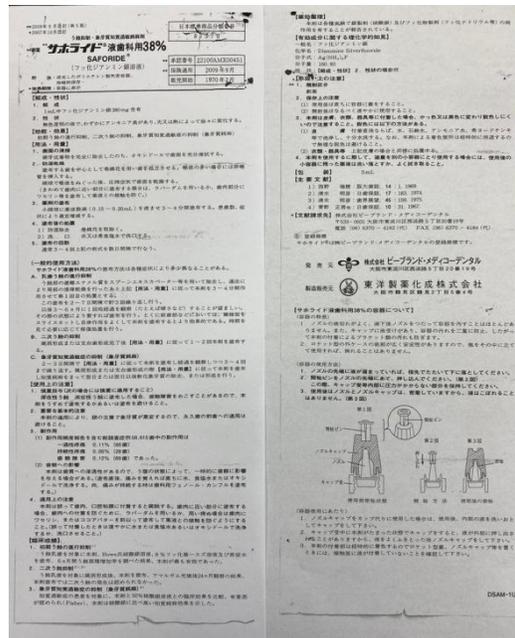


Fig. 1 Instructivo Saforide.

## **Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina)**

Composición:

Solución de fluoruro de diamino de plata,  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ , al 38% P/V.

Instrucciones de uso:

1. Lavar y secar bien el diente antes de comenzar el tratamiento.
2. Aplicar con hisopo o pincel impregnados con 2 o 3 gotas del producto. Se coloca sobre el diente, se deja actuar unos minutos frotando el área aplicada.
3. Enjuagar bien para eliminar restos de la solución.

Para evitar contacto de Fagamin con la membrana mucosa protéjala con rollos de algodón o dique de hule.

En caso de caries cercana a encía es conveniente cubrir la misma con algún protector gingival o vaselina.

Cuando ocurre el contacto accidentalmente o cuando el paciente manifieste dolor, enjuague inmediatamente con buches de agua con sal o agua oxigenada. Si el dolor persiste aplicar fenol alcanforado de uso odontológico.

En caries incipientes se aplica Fagamin sólo una vez, pero en otros casos puede ser necesario más de una aplicación.

Cuidados en la manipulación:

- Utilice guantes.
- Tápese inmediatamente después de usar.
- Presérvese de la luz.
- Manténgase en lugar fresco.
- En caso de mancharse la piel, lávese con agua oxigenada.

Advertencias:

- Debido a que la reacción de la plata sobre la dentina pueda producir un oscurecimiento de la misma, no es conveniente utilizar Fagamin en los dientes permanentes anteriores o dónde el factor estético es importante.
- En el caso de caries profundas, debido a que pueden ocurrir filtraciones hasta la pulpa, se aconseja evitar su uso o diluir la dosis con agua destilada. En una proporción 1:10.
- También pueden ocurrir filtraciones hasta la pulpa según la calidad del diente.

Restricciones:

No aplicar muy cerca de pulpa o cuando se sabe hay filtraciones profundas.

Presentación:

- Envase gotero de plástico negro conteniendo 5 ml. <sup>40</sup>

#### **1.4.6. Protocolo para aplicación de fluoruro diamino de plata al 38%**

- Detección de lesiones cariosas para elegir las que puedan ser sometidas al tratamiento.
- Profilaxis con cepillo
- Retire los restos gruesos de la lesión cariosa para permitir un mejor contacto de fluoruro diamino de plata con dentina desnaturalizada.
- Minimice el contacto con encía y las membranas mucosas para evitar la posible pigmentación o irritación; considere aplicar manteca de cacao o use rollos de algodón para proteger alrededor de los tejidos gingivales, con cuidado de no cubrir accidentalmente superficies de la lesión cariosa.
- Seque con un flujo suave de aire comprimido (o use rollos de algodón/gasa) las superficies afectadas de los dientes.

- Doble el aplicador, sumérgalo y elimine el exceso de líquido antes de la aplicación.
- Aplique fluoruro diamino de plata directamente solo a la superficie dental afectada.
- Seque con un flujo suave de aire comprimido durante al menos un minuto.
- Retire el exceso de fluoruro diamino de plata con gasa, rollo de algodón o bolita de algodón para minimizar la absorción sistémica.<sup>32</sup>
- Enjuagar con agua.<sup>41</sup>

El tiempo ideal de aplicación es de un minuto.<sup>33</sup>

#### Indicaciones posoperatorias

- No ingerir alimentos ni bebidas por 30 minutos a una hora.
- Se debe hacer un monitoreo cada 3 o 6 meses y una intervención para reducir factores de riesgo del individuo para lograr un manejo integral de la caries y no solo mantener el arresto de lesiones de caries.<sup>33</sup>

Gran parte del éxito clínico de una restauración dental se basa en la formación de un sello biológico entre el diente y la restauración incluso si parte de la dentina cariada queda dentro de la preparación. Cuando las bacterias viables en la dentina cariada restante en la base de una cavidad se sella completamente con una restauración, gradualmente pierden su viabilidad. Sin embargo, como seguridad adicional sería ideal que todos los microorganismos restantes se volvieran no viables en el momento de la colocación de la restauración por lo que puede colocarse fluoruro diamino de plata antes de colocar una restauración.<sup>42</sup>

Se han observado buenos resultados con la aplicación anual, pero se obtiene mejor efecto con aplicación semestral durante al menos dos años.<sup>43</sup>

## Antecedentes

Brandao Scarpelli y colaboradores, hicieron un estudio de difusión en agar y de concentración mínima inhibitoria en *S. mutans*, *E. coli* and *E. faecalis*, en el cual demostraron que el fluoruro diamino de plata al 38% tiene mejores resultados que al 30% <sup>44</sup>, coincidiendo con Almeida y cols. en su estudio de difusión en agar con fluoruro diamino de plata al 30% y 12 % en sus resultados comprobaron que la actividad antibacteriana de los agentes cariostáticos fue más efectivo con mayores concentraciones.<sup>45</sup>

En un estudio realizado por Lou y colaboradores, analizaron el efecto antimicrobiano en difusión en agar en platos inoculados con *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces naeslundii*, con discos impregnados de fluoruro de diamino de plata, fluoruro de plata, nitrato de plata, y fluoruro de amonio. Las zonas de inhibición demostraron que los 4 agentes tienen efecto antibacteriano, aunque el fluoruro de amonio a concentración baja no tiene efecto. También se realizó en fluoruro de sodio, cloruro de amonio, fluoruro de sodio, cloruro de sodio y nitrato de sodio los cuales no tuvieron efecto antimicrobiano, por lo que concluyen que el efecto antimicrobiano esta dado por los iones de plata y el efecto anticaries de la plata tópica, las soluciones parecen estar restringidas a las de los iones de plata.<sup>21</sup>

Alves y colaboradores examinaron la actividad antimicrobiana determinando la concentración inhibitoria máxima de fluoruro diamino de plata al 12%, 16 % y 30%, fluoruro de fosfato acidulado en gel y en espuma puro y con 6 diluciones, en *S. mutans*, *Streptococcus oralis* y *Lactobacillus casei*. Concluyen que los productos de fluoruro diamino de plata tienen efecto antimicrobiano en los tres agentes, el fluoruro de fosfato acidulado en gel mostró efecto antimicrobiano con *S. mutans* y *S. oralis*, mientras que el fluoruro de fosfato acidulado en espuma no presentó efecto antimicrobiano.<sup>46</sup>

García y colaboradores realizaron un estudio de citotoxicidad de plata y fluoruro diamino de plata en células pulpares humanas (CPH), fibroblastos humanos de ligamento periodontal (FLPDH), fibroblastos humanos gingivales (FGH) y células de carcinoma escamoso oral humano, mediante el bioensayo de colorimetría rápida MTT, obteniendo los siguientes resultados: Las células más sensibles después de 24 horas de contacto con  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$  correspondieron de la siguiente manera: CSH-3>CPH>CSH-2>CSH-4>FGH>FLPDH. Por otro lado, la sensibilidad a la plata pura ( $\text{AgCl}$ ) correspondió: CPH>FGH>CSH-3>CSH-2>FLPDH>CSH-4. Se observó ligero efecto de hormesis en células FGH, en otro estudio de citotoxicidad de los metales contra fibroblastos gingivales humanos dieron los siguientes resultados:  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$  (más citotóxico) >  $\text{AgCl}$ >  $\text{CuCl}_2$ >  $\text{CuCl}$ ,  $\text{CoCl}_2$ > $\text{NiCl}_2$ >  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  (menos citotóxico). El contacto con  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$  durante solo una hora indujo la muerte celular irreversible, mientras que la mayor duración del contacto con  $\text{AgCl}$  o  $\text{CuCl}_2$  fue necesario para inducir la muerte celular irreversible, concluyendo en ambos estudios que la citotoxicidad puede ser causa de incompatibilidad biológica; por lo que debe ser considerado el riesgo-beneficio.<sup>20,47</sup>

# CAPÍTULO II

## 2.1. Planteamiento del problema

La caries es un problema de salud pública a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos y medidas preventivas que se han tomado, no se ha logrado combatir esta enfermedad.<sup>2</sup>

El fluoruro diamino de plata al 38% es una opción de tratamiento que no implica dolor, ya que no es necesario anestesiarse, se conserva la estructura dental porque no es necesario realizar una cavidad para eliminar la caries ya que tiene un efecto remineralizante y requiere muy poco tiempo de trabajo, por lo que es una excelente opción en pacientes pediátricos que regularmente presentan rechazo al odontólogo<sup>48</sup>, además de tener efecto bacteriostático y bactericida.<sup>17</sup>

Existe mucho rechazo al fluoruro diamino de plata por la pigmentación que presenta, pero debemos tomar en cuenta el beneficio que podemos obtener, entre ellos la disminución de la ansiedad, el miedo en pacientes pediátricos,<sup>37</sup> y sobre todo el efecto bacteriostático y bactericida que tiene.

A pesar de que no es un producto nuevo existen pocos estudios donde nos indiquen la citotoxicidad, el efecto antimicrobiano y el estrés oxidativo que produce, por lo que la falta de conocimiento puede ser un factor para que exista el rechazo hacia este producto.

Se sabe que el fluoruro diamino de plata es útil para detener procesos cariosos pero no existen estudios que determinen la dosificación y efectos adversos, por lo que su uso es relativamente empírico.

## 2.2. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto citotóxico y estrés oxidativo en células pulpaes humanas; y qué efecto antimicrobiano presentan Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans*?

### 2.3. Justificación

*S. mutans* es la principal bacteria cariogénica.<sup>1</sup> Si al estarse formando la caries no recibe un tratamiento oportuno, el daño continúa hasta ocasionar alteraciones a nivel pulpar y periapical por lo que es importante detenerlo antes.<sup>17</sup>

Al utilizar el fluoruro diamino de plata al 38% no se retira tejido dental, ya que ayuda a remineralizar el tejido cariado evitando la destrucción de tejido remanente, preservando la estructura dental.<sup>43</sup>

Existen distintas marcas del fluoruro diamino de plata al 38%, por lo que es importante conocer cuál tiene mejor efecto antimicrobiano ocasionando el menor daño a células pulpares, o si todas tiene el mismo efecto ya que uno de los principales objetivos del odontólogo es conservar la vitalidad de los órganos dentarios.

Es un producto de bajo costo ya que con una gota se pueden tratar 5 dientes<sup>43</sup>; al igual que el campo operatorio requerido para realizar el tratamiento, por lo que es una buena opción para pacientes que no tienen posibilidades de acudir al odontólogo regularmente y en zonas de difícil acceso.<sup>28</sup> Por lo tanto es importante conocer las características para utilizarlo correctamente y poder obtener un beneficio

En pacientes pediátricos al disminuir el tiempo operatorio y no requerir anestesia local, se puede controlar mejor la ansiedad y miedo del paciente.

Si conocemos cual es la citotoxicidad y el efecto antimicrobiano del fluoruro diamino de plata al 38%, será más fácil considerarlo como opción al realizar un plan de tratamiento y poder ofrecer al paciente una alternativa más.

## 2.4. Objetivo general

Determinar y comparar el efecto citotóxico y de estrés oxidativo en CPH, así como el efecto antimicrobiano ante *S. mutans* del fluoruro diamino de plata al 38% de tres distintas marcas comerciales Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) a diferentes concentraciones.

## 2.5. Objetivos específicos

1. Determinar la viabilidad en células pulpaes humanas en contacto con fluoroplat, fagamin y saforide al 38%.
2. Determinar el efecto antimicrobiano en *S. mutans* en contacto con Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) al 38%.
3. Identificar cuál marca tiene mayor viabilidad en células pulpaes humanas.
4. Identificar cuál marca tiene mayor efecto antimicrobiano en *S. mutans* en contacto con Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) al 38%.

## 2.6. Hipótesis

El nivel de citotoxicidad, de estrés oxidativo y efecto antimicrobiano contra *S. mutans* es diferente entre Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina).

# **CAPÍTULO III**

### 3.1. Materiales y Métodos

#### Tipo de estudio

- Experimental *in vitro*.

#### Universo de estudio

- Fluoruro diamino de plata al 38%: Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina)
- *Streptococcus mutans* ATCC35668.
- Cultivo primario con células pulpares humanas.

#### Selección y tamaño de la muestra

- N= 27, no probabilístico por cuotas.

### 3.2. Criterios de selección

#### Criterios de inclusión

- Cultivos microbianos sembrados uniformemente.
- Cultivos con crecimiento celular.
- Cultivos que estén a densidad 0.5 Mc Farland.
- Cultivos con formación de especies reactivas de oxígeno.

#### Criterios de exclusión

- Microorganismos diferentes a *Streptococcus mutans*.
- Fluoruro diamino de plata de distinta concentración.
- Cultivo
- s de distinta línea celular.

### Criterios de eliminación

- Volumen diferente de agentes antimicrobianos.
- Cultivos con células contaminadas.
- Agar contaminado.
- Caldo contaminado.

### 3.3. Variables

#### Independientes:

- Tipo de agente.
- Tiempo.
- Dosis.

#### Dependientes:

- Efecto antimicrobiano.
- Citotoxicidad.
- Estrés oxidativo.

#### 3.3.1. Descripción de variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Medición
<b>Tipo de agente</b>	Independiente	Es una solución sin color utilizada tópicamente compuesto por 24.4-28.8% plata y 5-5.9% flúor	Sustancia con propiedades bactericidas, remineralizantes y cariostáticas	Fluoroplat Saforide Fagamin

		con un pH de 10, que inhibe la progresión de caries. <sup>43</sup>		
<b>Tiempo</b>	Independiente	Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro. <sup>49</sup>	Periodo en el que se realiza el experimento.	Minuto y hora
<b>Dosis</b>	Independiente	Cantidad o porción de algo material o inmaterial. <sup>50</sup>	Cantidad de agente utilizado para el experimento.	uM
<b>Efecto antimicrobiano <i>streptococcus mutans</i></b>	Dependiente	Sustancias que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo de <i>streptococcus mutans</i> . <sup>10</sup>	Cantidad medida en milímetros en halo de inhibición de <i>streptococcus mutans</i> en antibiograma.	mm
<b>Citotoxicidad</b>	Dependiente	La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones	Viabilidad en células pulpares.	nm

		celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. <sup>51</sup>		
<b>Estrés oxidativo</b>	Dependiente	Aparece en las células y tejidos cuando existe una perturbación del equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras. <sup>52</sup>	Viabilidad en células pulpareas	nm

Tabla 2 Operacionalización de variables

### 3.4. Procedimiento

#### 3.4.1.-Ensayo de susceptibilidad Antimicrobiano

##### 3.4.1.1. Difusión en Agar

Se inoculó *S. mutans* ATCC 35668 en agar Muller Hinton, durante 24 horas a 37° C. Se ajustó la densidad celular a 0.5 en escala estándar de Mc Farland para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  ml de bacteria.

Se prepararon las siguientes dosis: 248 mM, 124 mM, 62 mM, 31 mM, 15.5 mM, 7.7mM, 3.8mM, con fluoruro diamino de plata al 38% de cada marca, Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp.,

Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) en 1.5 ml de agua destilada estéril.

Se inocularon 200 µL de bacteria en cajas Petri desechables estériles con 200 ml de agar Muller Hinton discos de papel filtro del número 1 de 6mm de diámetro, con 20 µl de cada dosis preparada, se colocaron 4 discos por plato con pinzas estériles. Se utilizó como control positivo penicilina con estreptomina 10,000/10mg y como control negativo agua destilada. Se incubaron las cajas 24 horas a 37°C. Para medir las zonas de inhibición se colocó la caja de Petri sobre una superficie oscura iluminada con luz reflejada, y con una regla se midió la zona de inhibición en milímetros. Se calculó el porcentaje de inhibición, el promedio y desviación estándar en Excel.

Se realizaron pruebas de normalidad y al no ser paramétrico se realizó análisis estadístico de Kruskal Wallis fijando un valor de  $p < 0.05$ . Los ensayos se realizaron por triplicado hasta obtener reproducibilidad en los métodos ( $n=27$ ).

#### **3.4.1.2. Microdilución**

La metodología se llevó a cabo siguiendo los estatutos del Clinical and Laboratory Standards Institute. Se inoculó *S. mutans* ATCC 35668 en agar Muller Hinton por 24 horas a 37°C para la obtención de un cultivo joven.

En un tubo falcon de 15 mL estéril se propagaron 3 colonias de cultivo joven de 24 horas colocando 7 mL de caldo Muller Hinton. Se dejó en agitación continua a 200 rpm por una noche a 37°C.

Del tubo que se mantuvo en agitación una noche antes se tomaron 400 µl y se midió hasta obtener la absorbancia de 1.0. En un tubo falcon de 50 ml se colocaron 30 ml de caldo Muller Hinton con 150mL para obtener la concentración de trabajo de  $5 \times 10^4$ .

Se preparó dosis máxima con fluoruro diamino de plata al 38% de cada marca, Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina), fueron diluidos en 1.5 ml de agua destilada estéril a una concentración de 248 mM.

Se colocaron las concentraciones a probar placas de 96 pocillos de la siguiente forma: Fig.2

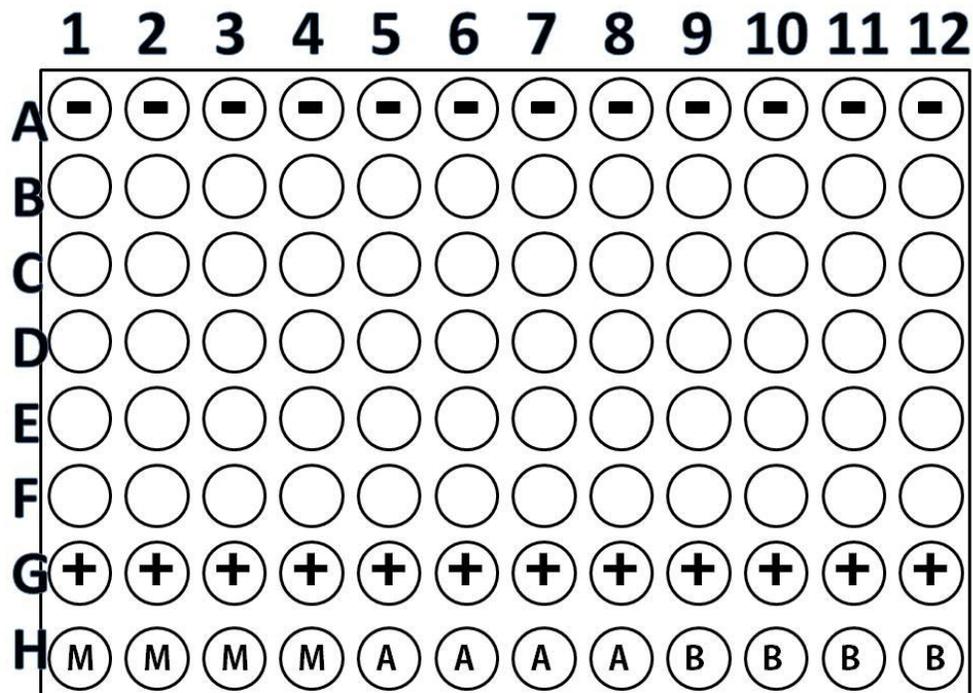


Fig. 2 Caja de 96 pocillos. a) + dosis máxima, b) - dosis mínima, c) M medio sin bacteria, d) A medio con antibiótico, e) B medio con bacteria

Se realizaron lecturas visuales a las 24 horas de incubación y en espectrofotómetro Multiskan Go a 600nm de longitud de onda.

### 3.4.2. Citotoxicidad

Se realizó aislamiento de células pulpaes humanas, cuando se alcanzó la confluencia celular necesaria se realizó un subcultivo celular, se aspiró medio de cultivo DMEM (suero fetal bovino 10% 4µl, glutamex 1% 440µl, penicilina G con

sulfato de estreptomicina 880µl), se lavó con PBS y se colocó 1ml de tripsina-EDTA, se incubó durante 5 minutos a 37°, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Se estableció subcultivo para CPH. Se agregan 9.6 ml de medio de cultivo y se inoculan 100 µL en cada pocillo de un plato de 96 pocillos a una densidad de 4 x 10<sup>5</sup> células/mL. Las células se incubaron 48 horas para lograr una correcta adhesión y proliferación celular. Se preparó dosis máxima con fluoruro diamino de plata al 38% de cada marca, Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) disuelta en 1.5 ml de agua destilada estéril a una concentración de 248 mM. Se cambió medio de cultivo del plato de 96 pocillos, se colocó 100 µL de medio de cultivo utilizando como control la primer fila del plato, se inoculó dosis máxima en la última hilera para realizar diluciones seriadas disminuyendo a la mitad la dosis en cada pocillo, por lo que se utilizaron 28 pocillos por cada producto, 4 de cada dosis y 4 de control. Se realizó un estudio de dosis respuesta, para evaluar la viabilidad celular cada minuto, 3 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas. Las células fueron incubadas a 37 °C con las diferentes concentraciones el tiempo determinado en cada estudio, posteriormente se preparó MTT con la dosis de .0002gr por cada mililitro de medio de cultivo, se retiró el medio de cultivo de la placa y se colocó 100 µL I de MTT preparado a cada pocillo, se incubó durante 7 horas a 37°, con CO<sub>2</sub> al 5%, y humedad 95%. Se retiró MTT y se coloca 100 µL de solución Dimetil sulfoxido Grado UV, se lee en el espectrofotómetro Multiskan Go a 570Nm de longitud de onda para medir la citotoxicidad. Se calculó el porcentaje de células viables, el promedio y desviación estándar en Excel. Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA y prueba pos-hoc de Tukey fijando un valor de p<0.05. Los ensayos se realizaron por triplicado hasta obtener reproducibilidad en los métodos (n=27).

### **3.4.3. Estrés oxidativo**

Se realizó aislamiento de células pulpaes humanas de terceros molares, cuando se alcanzó la confluencia celular necesaria se realizó un subcultivo celular, se aspiró

medio de cultivo DMEM (suero fetal bovino 10% 4µl, glutamex 1% 440µl, penicilina G con sulfato de estreptomicina 880µl), se lavó con PBS y se colocó 1ml de tripsina-EDTA, se incubó durante 5 minutos a 37°, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Se establece subcultivo para CPH. Se agregan 9.6 ml de medio de cultivo y se inoculan 100 µL utilizando la mitad de un plato de 96 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^5$ . Las células se incubaron 48 horas para lograr una correcta adhesión y proliferación celular. Se preparó dosis máxima con fluoruro diamino de plata al 38% de cada marca, Fluoroplat (NAF Laboratorios , Buenos Aires, Argentina), Fagamin (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) y Saforide (J.Morita Corp., Osaka, Japón) disuelta en 1.5 ml de agua destilada estéril a una concentración de 248 mM. Se cambió medio de cultivo del plato de 96 pocillos, se colocó 100 µL de medio de cultivo utilizando como control la primer fila del plato, Se colocaron 4 µL de peróxido de hidrógeno en el control positivo para estresar las células durante media hora, después se inoculó dosis máxima en la última hilera para realizar diluciones seriadas disminuyendo a la mitad la dosis en cada pocillo en control positivo y negativo. Se realizó un estudio de estrés oxidativo mediante fluorometría intracelular, al reaccionar con un sensor fluorogénico en el citoplasma ocasionando un producto fluorométrico para evaluar la viabilidad celular a los 3 minutos. Las células fueron incubadas a 37 °C con diferentes concentraciones.

Se realiza lectura en espectrofotómetro a 515Nm de longitud de onda para medir la viabilidad celular. Se calculó el porcentaje de células viables, el promedio y desviación estándar en Excel. Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA y prueba pos-hoc de Tukey con un valor de  $p < 0.05$ . Los ensayos se realizaron por triplicado hasta obtener reproducibilidad en los métodos (n=27).

## **Consideraciones éticas**

La información proporcionada será para uso exclusivo del investigador así como el grupo de revisores del proyecto de investigación, los datos permanecerán almacenados en formato electrónico desde el inicio hasta el término del estudio. Concluido el proyecto de investigación los datos obtenidos serán archivados durante cinco años por fines legales y de estudio.

De acuerdo a los parámetros y criterios este protocolo se considera con riesgo menor al mínimo.

# **CAPÍTULO IV**

## Resultados

### 4.1. Ensayo de susceptibilidad Antimicrobiano

#### 4.1.1 Difusión en agar

El ensayo de difusión en agar mostró zonas de inhibición con los siguientes rangos: Fluoroplat® ( NAF Laboratorios , Buenos Aires, Argentina):  $7.6 \pm 0.4$ - $13.4 \pm 2.0$ mm, Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón):  $5.33 \pm 0.6$ - $13.69 \pm 1.8$ mm, Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina):  $7.17 \pm 0.15$ - $12.50 \pm 0.44$ mm, control positivo de penicilina con estreptomocina 10,000/10mg  $30.65 \pm 1.4$ . <sup>Gráfica 1</sup>

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) entre los tres grupos en la dosis de 1.9mM, teniendo mayor zona de inhibición Fluoroplat® ( NAF Laboratorios , Buenos Aires, Argentina) de  $7.6 \pm .4$ , seguido por Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) con  $7.17 \pm 1.5$  y Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón)  $5.3 \pm .6$ . <sup>Fig.3</sup>

En la dosis de 3.8mM, existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) teniendo mayor zona de inhibición, Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón)  $9.13 \pm .4$ , seguido por Fluoroplat® ( NAF Laboratorios , Buenos Aires, Argentina) con  $8.3 \pm 1.1$  y Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina)  $7.4 \pm .09$ . <sup>Fig. 3</sup>

En la dosis de 7.7mM, existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) teniendo mayor zona de inhibición Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón)  $10.39 \pm .5$ , seguido por Fluoroplat® ( NAF Laboratorios , Buenos Aires, Argentina) con  $9.2 \pm .8$  y Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina)  $8.31 \pm .46$ . <sup>Fig.3</sup>

En la dosis de 15.5 mM existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) teniendo mayor zona de inhibición Fluoroplat® ( NAF Laboratorios , Buenos Aires,

Argentina) de  $11.0 \pm 1.6$  que Fagamin® (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) de  $9.58 \pm .09$ .<sup>Fig.4</sup>

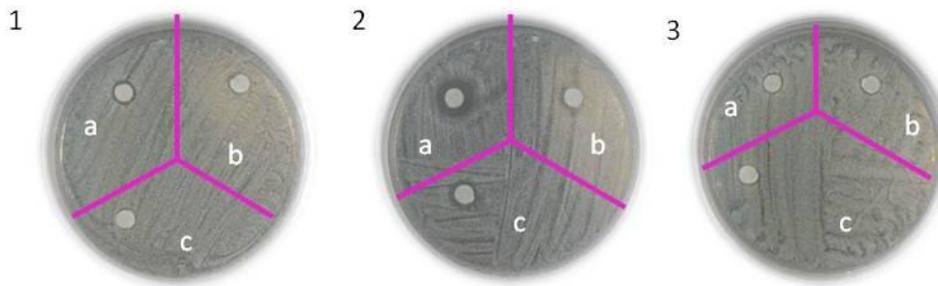


Fig. 3. Discos de: 1 Fluoroplat, 2 Saforide, 3 Fagamin Dosis: a)7.7mM, b)3.8mM, c)1.9mM (fuente propia)

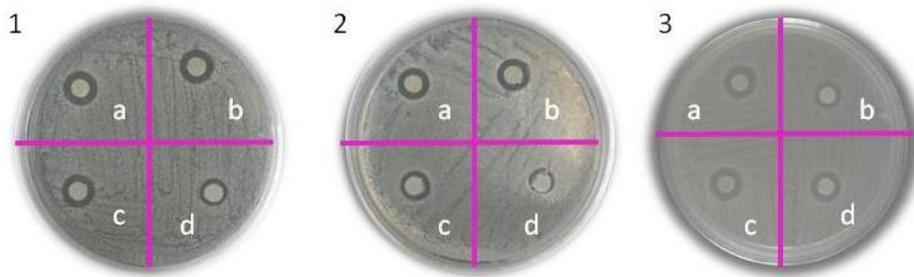
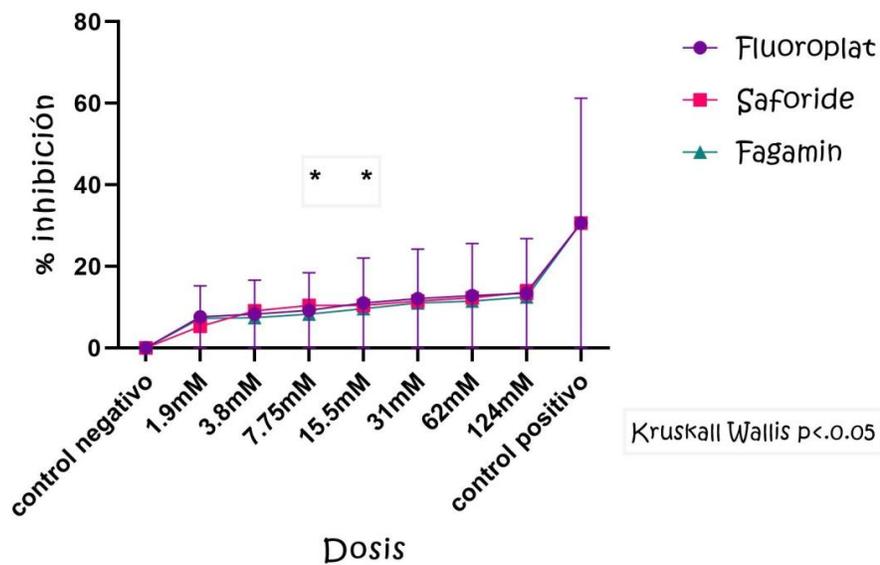


Fig. 4 Discos de: 1 Fluoroplat, 2 Saforide, 3 Fagamin Dosis: a)124mM, b)62mM, c) 31mM, d) 15nM (fuente propia)

### Ensayo de difusión en agar en *S.mutans*



Gráfica 1 Resultado de la prueba de Kruskal Wallis, ensayo de difusión en agar

### 4.1.2 Microdilución

Se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) de 31 mM como dosis bacteriostática y 62 mM de dosis bactericida.<sup>Fig.5</sup>

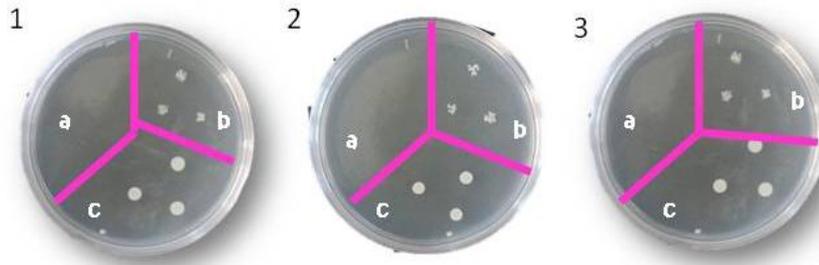


Fig. 5 Dosis bacteriostática y bactericida 1 Fluoroplat, 2 Saforide, 3 Fagamin a)62uM, b)31mM, c)15.5uM (fuente propia)

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) entre los grupos en la dosis de 1.9mM, teniendo mayor crecimiento bacteriano Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) de  $94.39 \pm 1.9\%$

En la dosis de 3.8mM existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) teniendo mayor crecimiento bacteriano Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) de  $99.83 \pm 7.1\%$ ,

En la dosis de 31mM existe diferencia estadísticamente significativa( $p=0.000$ ) teniendo mayor crecimiento bacteriano Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina) de  $67.34 \pm 1.2\%$

En la dosis de 62mM existe diferencia estadísticamente significativa( $p=0.000$ ) teniendo mayor crecimiento bacteriano Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) de  $56.83 \pm 4.0$

Se realizó análisis estadístico con t de student pareada intra grupos, dando como resultado que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ninguna dosis.

## 4.2. Citotoxicidad

Se realizó análisis estadístico con t de student pareada intra grupos, dando como resultado que existe diferencia estadísticamente significativa entre dosis en los experimentos de 1, 3, 5, 15, 30 minutos , 1, 3 6 y 24 horas el análisis estadístico de ANOVA prueba pos-hoc de Tukey con un valor de  $p < 0.05$ , se realizó entre grupos y no existió diferencia estadísticamente significativa en ninguno. Se obtuvieron los siguientes resultados

En las figuras 6 a la 18 se observa como disminuye la viabilidad celular desde el grupo control <sup>Fig6</sup> , hasta la concentración máxima que es de 124mM dónde existe menor viabilidad celular en las tres marcas <sup>Fig 16-18</sup> .

En la tabla 3 se observa la diferencia intragrupos estadísticamente significativa en el minuto 1 en la dosis de 1.9 mM, 3.8 mM, 31 mM y 124 mM, en el minuto 3 en todas las dosis existe diferencia intragrupos estadísticamente significativa y en el minuto 5 en la dosis de 124 mM. <sup>Tabla 3</sup>

1 minuto			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±11.03	100.00±4.9	100.00±5.8
1.9 mM	92.45±10.05**	95.57±6.1	95.40±5.1*
3.8 mM	90.37±9.7**	94.48±8.0	98.66±2.3
7.7 mM	91.87±10.5	95.57±4.4	86.56±15.2
15.5 mM	99.01±7.8	98.16±3.0	85.78±8.9*
31 mM	104.77±4.5	88.43±3.1**	83.91±5.9**
62 mM	103.47±3.1	86.54±14.9	79.02±8.5*
124 mM	48.60±9.7**	46.30±7.1**	48.45±9.7**
3 minutos			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±3.1	100.00±3.4	100.00±2.5
1.9 mM	96.20±2.3	90.35±10.5	86.77±5.5*
3.8 mM	95.85±2.0	91.10±1.9*	88.22±4.5*
7.7 mM	90.28±5.0	88.77±3.1*	85.63±4.8*
15.5 mM	93.67±3.8*	89.78±8.4	87.54±7.7*
31 mM	77.99±6.9*	66.15±7.7**	72.05±5.1**
62 mM	45.84±12.0**	37.66±6.6**	40.83±35.3**

124 mM	13.36±0.6**	12.94±0.7**	13.93±24.1**
<b>5 minutos</b>			
<b>Dosis</b>	<b>Fluoroplat</b>	<b>Saforide</b>	<b>Fagamin</b>
0 mM	100.00±9.2	100.00±7.4	100.00±11.4
1.9 mM	71.18±4.7	74.12±3.4	70.86±7.4
3.8 mM	62.83±5.1	66.92±8.4	77.02±7.7
7.7 mM	44.67±1.9	57.59±7.4	63.83±6.9
15.5 mM	41.69±1.0	58.04±2.5	53.46±1.6
31 mM	39.68±0.5	35.80±0.4	41.22±4.1
62 mM	39.81±1.0	31.70±1.1	35.29±1.2
124 mM	37.01±0.9	29.70±1.1*	33.47±1.7

**Tabla 3 Resultados citotoxicidad 1, 3 y 5 minutos. \*p<0.05, \*\*p<0.01 t student pareada, intra grupos .No se encontró diferencia estadísticamente significativa(p=0.000) en ANOVA post hoc ,Tukey, entre grupos. Resultados triplicados 3 exp dif n=9**

En la tabla 4 se observa que a los 15 minutos y 1 hora existe diferencia estadísticamente significativa intragrupos en todas las dosis, mientras que a los 30 minutos no existe en ninguna dosis diferencia estadísticamente significativa. <sup>Tabla 4</sup>

15 minutos			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±1.6	100.00±4.4	100.00±16.1
1.9 mM	61.46±4.3*	61.47±24.3	70.61±5.3
3.8 mM	40.25±3.2*	46.55±27.7	47.51±0.4
7.7 mM	35.10±0.8*	34.68±1.7	37.72±1.1
15.5 mM	35.73±0.6*	34.35±1.2	38.54±0.4
31 mM	34.55±0.9*	33.81±0.4	39.73±2.9
62 mM	33.77±1.0*	33.66±0.9	39.86±1.5
124 mM	33.11±1.1*	32.70±1.3	38.14±0.9
30 minutos			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±14.5	100.00±4.5	100.00±13.5
1.9 mM	81.66±14.1	49.73±2.2	120.27±20.0
3.8 mM	61.83±1.5	50.24±0.7	96.02±1.3
7.7 mM	61.04±0.5	48.68±0.7	64.61±1.7
15.5 mM	62.18±1.9	49.40±0.2	64.49±0.7
31 mM	62.04±1.0	50.45±1.7	68.21±0.6
62 mM	64.84±2.5	49.40±1.3	66.59±2.1
124 mM	63.32±1.0	47.45±1.5	62.11±1.4
1 hora			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±5.5	100.00±1.9	100.00±1.7
1.9 mM	52.09±0.8*	41.84±0.4*	92.49±9.9**
3.8 mM	50.85±2.0	42.77±0.9*	47.71±1.0*
7.7 mM	48.77±0.4	41.94±1.5*	45.02±1.2*
15.5 mM	51.87±1.6*	44.08±0.7**	46.40±0.5*
31 mM	49.74±1.7*	42.81±1.3*	44.32±0.1*
62 mM	50.93±1.1	43.97±1.5*	49.33±0.3*
124 mM	49.51±1.8*	41.72±2.6*	45.54±1.0*

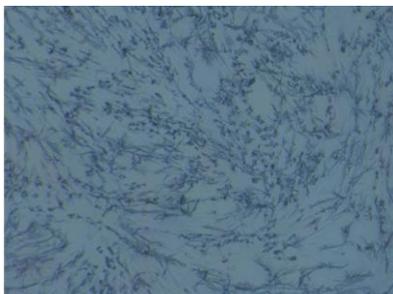
**Tabla 4 Resultados 3, 6 y 24 horas. \*p<0.05, \*\*p<0.01 t student pareada, intra grupos. Resultados 3, 6 y 24 horas. \*p<0.05, \*\*p<0.01 t student pareada, intra grupos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa(p=0.000) en ANOVA post hoc ,Tukey, entre grupos. Resultados triplicados 3 exp dif n=9**

En la tabla 5 se observa diferencia estadísticamente significativa intragrupos a las 3 horas en la dosis de 3.8 mM, 15.5, 62 y 124, a los 6 y 24 horas en todas las dosis

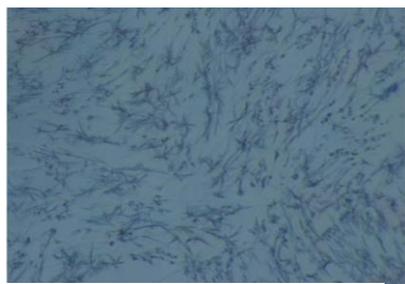
Tabla 3

3 horas			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±6.1	100.00±4.7	100.00±13.6
1.9 mM	59.33±3.4	67.58±0.9	75.46±11.5
3.8 mM	54.31±0.4*	51.20±3.2	57.63±3.0
7.7 mM	53.99±1.4	49.37±1.6	55.95±2.3
15.5 mM	54.41±1.0	54.10±5.9*	55.86±0.3
31 mM	55.36±0.4	51.69±2.5	55.93±1.8
62 mM	55.85±4.2	52.67±1.1*	59.47±1.4
124 mM	55.73±3.5	47.77±0.5*	54.48±2.4
6 horas			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±6.6	100.00±5.1	100.00±1.9
1.9 mM	64.02±6.6*	72.97±15.3	68.80±5.6*
3.8 mM	57.78±4.4	59.62±1.4	54.52±1.4*
7.7 mM	56.67±3.0*	59.82±2.0	52.22±1.4*
15.5 mM	58.13±2.9	61.38±1.1	53.99±0.4*
31 mM	58.20±1.2	61.49±1.7	52.92±1.4*
62 mM	58.73±2.1	63.46±0.7	55.47±0.6*
124 mM	54.49±5.0*	56.19±3.0	53.22±1.3*
24 horas			
Dosis	Fluoroplat	Saforide	Fagamin
0 mM	100.00±5.4	100.00±4.3	100.00±5.8
1.9 mM	83.50±3.7*	84.94±2.2	84.70±3.5
3.8 mM	81.21±2.5*	89.71±2.5	86.62±4.1
7.7 mM	78.51±4.4*	88.89±4.0	82.80±1.4
15.5 mM	77.79±4.1*	86.10±5.4	88.03±11.1
31 mM	75.43±3.7**	86.87±5.3	84.07±9.3*
62 mM	73.06±3.3**	89.29±6.9	80.09±8.1*
124 mM	69.76±2.2**	103.28±12.4*	72.92±2.8**

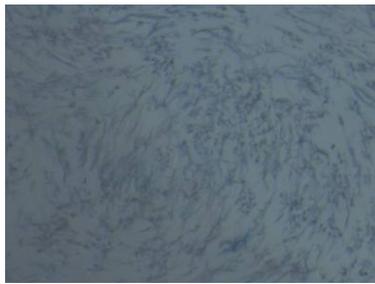
Tabla 5 Resultados 3, 6 y 24 horas. \*p<0.05, \*\*p<0.01 t student pareada, intra grupos. Resultados 3, 6 y 24 horas. \*p<0.05, \*\*p<0.01 t student pareada, intra grupos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa(p=0.000) en ANOVA post hoc ,Tukey, entre grupos. Resultados triplicados 3 exp dif n=9



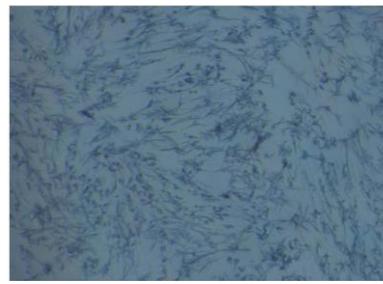
**Fig. 6 minuto 1, control (fuente propia)**



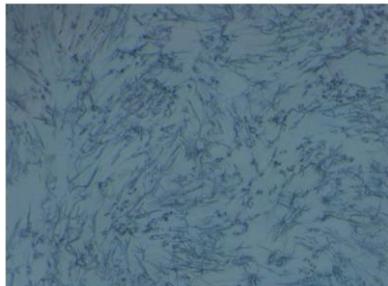
**Fig. 7 minuto 1. Fluoroplat 1.9mM(fuente propia)**



**Fig. 8 Minuto 1, Saforide 1.9mM (fuente propia)**



**Fig. 9 Minuto 1, Fagamin 1.9mM (fuente propia)**



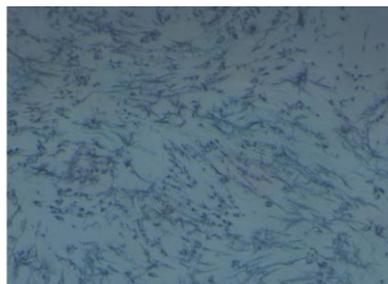
**Fig. 10 Minuto 1, Fluoroplat 31mM (fuente propia)**



**Fig.11 Minuto 1, Saforide 31mM (fuente propia)**



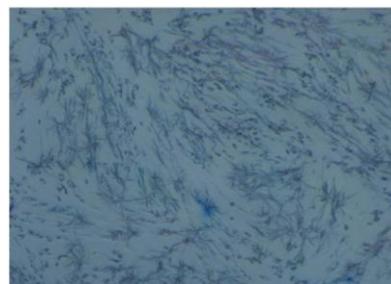
**Fig. 12 Minuto 1, Fagamin 31mM (fuente propia)**



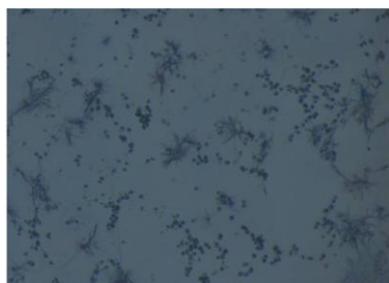
**Fig. 13 Minuto 1, Fluoroplat 62mM (fuente propia)**



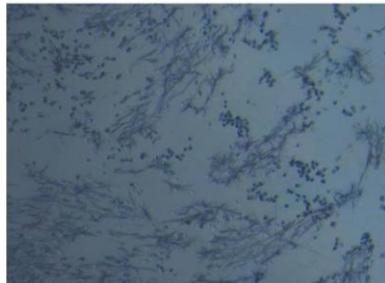
**Fig. 14 Minuto 1, Saforide 62mM (fuente propia)**



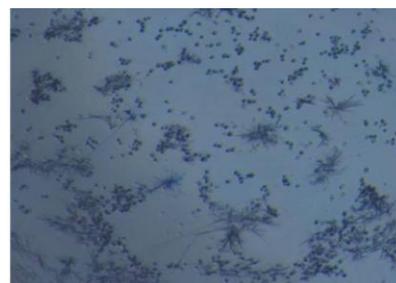
**Fig. 15 Minuto 1, Fagamin 62mM (fuente propia)**



**Fig. 16 Minuto 1,Fluoroplat 124mM (fuente propia)**



**Fig.17 Minuto 1, Saforide 124mM (fuente propia)**



**Fig. 18 Minuto 1, Fagamin 124mM (fuente propia)**

La concentración citotóxica media (cc50) es la dosis exacta que reduce al 50% la viabilidad celular al aplicar una sustancia a las células, por lo que no en todas las dosis se puede obtener la concentración al no reducir a la mitad la viabilidad celular como en el experimento de 30 minutos, 6 horas y 24 horas no se obtuvo esta concentración. <sup>Tabla 6</sup>

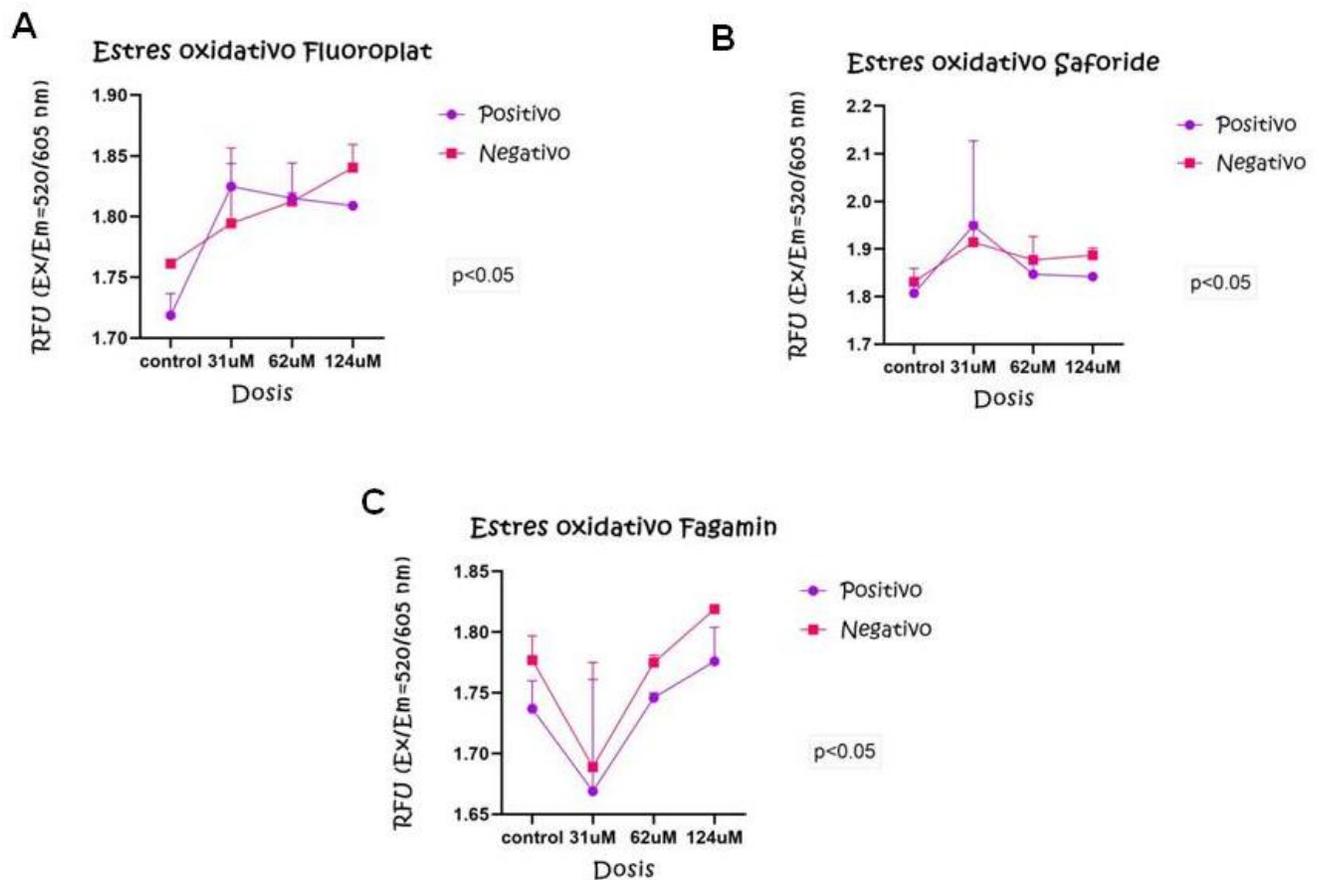
<b>Tiempo</b>	<b>Dosis Fluoroplat</b>	<b>Dosis Saforide</b>	<b>Dosis Fagamin</b>
<b>1 minuto</b>	122.42mM	118.30 mM	120.86 mM
<b>3 minutos</b>	57.99 mM	48.57 mM	52.89 mM
<b>5 minutos</b>	12.88 mM± 15.9	12.10 mM± 13	25.37 mM±25.3
<b>15 minutos</b>	2.25 mM± 1.4	2,90 mM± 1.3	3.60 mM±3.6
<b>30 minutos</b>	ND	1.83 mM	3.69 mM
<b>1 hora</b>	3.09 mM	1.64 mM	3.41 mM
<b>3 horas</b>	5.20 mM	3.65 mM	ND
<b>6 horas</b>	6.83 mM	ND	5.78 mM
<b>24 horas</b>	ND	ND	ND

Tabla 6 Resultados de cc50. ND: no determinada

### 4.3. Estrés oxidativo

Se observó aumento de viabilidad celular en control negativo en las tres marcas al no existir estrés celular ocasionado por el peróxido de hidrógeno, en el control positivo existe menor viabilidad celular ya que el peróxido de hidrógeno estimula la muerte celular.

Al comparar las tres marcas se obtuvo que Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) es el producto que produjo mayor cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno por lo que existe menor viabilidad celular. Gráfica 2



Gráfica 2. A) Fluoroplat, B) Saforide, C) Fagamin. Cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas. No existe diferencia estadísticamente significativa intragrupos.

## Discusión

Diversos estudios como el de Lansdown- colaboradores, y el de Kim- colaboradores coinciden que los iones de plata cargados positivamente son esenciales para la actividad antimicrobiana y la interacción electrostática con la carga negativa de las membranas de la bacteria para conseguir el efecto bactericida<sup>53 y 54</sup> coincidiendo con el estudio realizado al obtener un efecto bactericida y bacteriostático con los tres productos.

De acuerdo a Almeida-colaboradores el fluoruro diamino de plata tiene efecto antimicrobiano, y entre mayor es la concentración utilizada mayor es el efecto que se obtiene concordando con el estudio realizado, en el que se obtuvieron mejores resultados con dosis más alta comparado con bajas dosis.<sup>45</sup>

Alves- colaboradores realizaron un estudio comparando el efecto antimicrobiano entre fluoruro diamino de plata y flúor de fosfato acidulado, en el cual demuestra que ambos tienen efecto antimicrobiano en *S. mutans* y *S. oralis* pero el flúor de fosfato acidulado tiene que ser en presentación de gel porque en espuma no tiene ningún efecto.<sup>46</sup>

Coincidiendo con García -colaboradores las células pulpares humanas son sensibles al fluoruro diamino de plata.<sup>15</sup> En lo que respecta a las células normales se ha reportado que la plata produce oxígeno reactivo y daño mitocondrial.<sup>55-58</sup>

Lansdown -colaboradores y Carison -colaboradores observaron muerte celular por apoptosis inducida por plata en macrófagos de la línea celular RAW264.721 y en fibroblastos de ratón de la línea celular NIH3T3.<sup>22<sup>53,55</sup></sup>

Por el contrario durante esta investigación no se encontró ningún estudio que refute el efecto bactericida del fluoruro diamino de plata al 38%, ni se ha relacionado el uso de este producto con posibles efectos carcinogénicos.

El fluoruro diamino de plata es un material que requiere una técnica de aplicación a bajo costo, maximizando su efecto anticariogénico permitiendo así ser muy útil en cuanto a costo beneficio se refiere.

Cuando aplicamos este producto evitamos destruir tejido sano para colocar una restauración preservando mayor cantidad de tejido.

### **Perspectiva a futuro**

Se sugiere realizar los mismos experimentos en diferentes líneas celulares y pruebas complementarias de tipo de muerte celular, así como ensayos clínicos para conocer efectos a largo plazo.

### **Limitantes**

Solo se realizó en una línea celular y también se tienen que evaluar células de tejidos adyacentes para complementar los resultados.

### **Relevancia clínica**

Se sugiere aplicar menos de una gota por diente siempre quitando el excedente y en órganos dentarios que no presenten cavidad para disminuir contacto con cámara pulpar por la toxicidad que presenta. Utilizar siempre barreras de protección para evitar contacto con tejidos blandos.

## Conclusiones

Se acepta parcialmente la hipótesis, ya que existió diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) en ensayo de difusión en agar y estrés oxidativo pero en citotoxicidad y microdilución no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ )

El fluoruro diamino de plata al 38% tiene efecto bactericida, bacteriostático, y una citotoxicidad moderada.

Disminuye la viabilidad celular en las tres marcas, y aumenta en mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno en Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) comparado con Fluoroplat®(NAF Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) y Fagamin®(Tedequim SRL, Córdoba, Argentina).

El efecto antimicrobiano en las tres marcas es el mismo.

Se debe valorar función y beneficios del fluoruro diamino de plata al elegir la mejor opción de tratamiento para el paciente.

En relación a nuestra pregunta de investigación las tres marcas comerciales tienen efecto antimicrobiano en *S. mutans* y citotoxicidad moderada, por lo que utilizar cualquiera de las tres marcas nos va a dar el mismo efecto, la única diferencia que se encontró es que el Saforide® (J.Morita Corp., Osaka, Japón) produce mayor cantidad de radicales libres comparado con las otras marcas.

Su uso en la práctica clínica en odontopediatría deberá considerarse ya que disminuye ansiedad y miedo en pacientes al no requerir anestesia, mejorando la cooperación del niño al ser corto el tiempo de trabajo y obteniendo buenos resultados al detener el proceso cariogénico sin destruir tejido dental.

Debe ser utilizado en casos de lesiones cariosas que no involucren pulpa, dentina profunda ni en lesiones cavitadas, valorando siempre el riesgo en cada paciente.

Al utilizar poco tiempo el sillón dental, y no requerir equipo especial puede ser una buena opción en lugares de difícil acceso o en el sector salud, ya que se podría atender una mayor cantidad de pacientes con el mismo presupuesto que se tiene y en poco tiempo. Al no tener que dar tantas citas por paciente se puede favorecer a más personas y obtener un mayor control de procesos cariosos por el efecto antimicrobiano que tiene.

## Bibliografía

1. Mei M, Ito L, Cao Y, Li Q, Lo E, Chu C. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralization and collagen degradation. *Journal of Dentistry*. 2013; 41(9):809-817.
2. Elizondo, L. M., Lucas, Q. G., & Rosa, G.. Estudio preliminar del efecto del Hidróxido de Calcio y del Fluoruro Diamino de Plata al 38% en el tratamiento de las caries dentinarias profundas en molares temporarios. *Facultad de Odontología UNNE*. 2004.
3. Cubero Santos, A., Lorigo Cano, I., González Huéscar, A., Ferrer García, M., Zapata Carrasco, M., & Ambel Sánchez, J. L. Prevalencia de caries dental en escolares de educación infantil de una zona de salud con nivel socioeconómico bajo. *Pediatría Atención Primaria*. 2019;21(82):e47-e59.
4. OMS Salud bucodental. (2019). Recuperado 7 agosto 2019, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
5. Lugo Angulo, E., García Cabrera, L., Gross Fernández, C., Casas Gross, S., & Sotomayor Lugo, F. La cultura en salud bucal como problema actual de la sociedad. *Medisan*. 2013;17(4):677-685.
6. Petersen, P. E.. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and oral epidemiology*. 2003;31:3-24.
7. Enrique, E., Abril, S., & Guadalupe, M. Estado actual de la odontopediatría en la República Mexicana. *Revista de Odontopediatría Latinoamericana*. 2020.

8. Leal, S. C. Minimal intervention dentistry in the management of the paediatric patient. *British dental journal*.2014;216(11):623.
9. Torres Arellano, M. E. Eficacia del fluoruro diamínico de plata al 38% en lesiones cariosas incipientes en pacientes de 6-10 años de edad: estudio a 24 meses. Universidad de Granada; 2008.
10. Hescot, P. El desafío de las enfermedades bucodentales—Una llamada a la acción global. *Atlas de Salud Bucodental*.2015;2(1):12-88.
11. Bedoya-Correa, C.M, Rincón Rodríguez R.J. & Parada-Sánchez M.T. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Biosciences*.2019; 61:22-31.
12. Lucas, G. Q., Elizondo, M. L., & Rosa, G. M. Remineralización dentinaria en molares primarios: Evaluación radiográfica. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*.2008; 65(2):81-87.
13. Aguilera, M. C., Romano, E., Ramos, N., & Rojas, L. Sensibilidad del *Streptococcus mutans* a tres enjuagues bucales comerciales (Estudio in vitro). *Odous científica*, 2011;12(1): 7-12.
14. Núñez, D. P., & García Bacallao, L. Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2010;9(2):156-166.
15. Yue, J., Yang, H., Liu, S., Song, F., Guo, J., & Huang, C. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Journal of dentistry*.2018;76:24-31.

16. ATCC Streptococcus mutans Clarke ATCC ® 35668™. (2019). Recuperado 9 septiembre 2019, de <https://www.atcc.org/products/all/35668.aspx>
17. Orellana-Centeno, J. E., Morales-Castillo, V., & González-Osorio, M. Fluoruro diamino de plata: Su utilidad en la odontología pediátrica. *Avan C Salud Med.*2019;7 (2): 57-60.
18. Guerrero Hurtado, J. D. C., Ortiz Rubio, Z. M., Peralta Berrospi, L. F., & Pérez Azahuanche, F. R. Actividad antibacteriana de Pelargonium peltatum (L.) L'Hér. sobre Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis y Streptococcus mitis frente a clorhexidina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*2013;18(2): 224-236.
19. Soria-Hernández, M. A. Pasado y presente de la caries dental. *Acta Pediátrica de México.*2010; 31(5):195-196.
20. García-Contreras, R., Scougall-Vilchis, R. J., Contreras-Bulnes, R., Sakagami, H., Baeza-Robledo, J. S., Flores-Chávez, R. I., & Nakajima, H. Impacto citotóxico de la plata y flúor diamino de plata en un cultivo de seis células orales. *Revista ADM.*2013; 70(3):134-139.
21. Lou, Y., Darvell, B. W., & Botelho, M. G. Antibacterial Effect of Silver Diammine Fluoride on Cariogenic Organisms. *The journal of contemporary dental practice.*2018;19(5):591-598.
22. Rosenblatt, A., Stamford, T. C. M., & Niederman, R. Silver diamine fluoride: a caries “silver-fluoride bullet”. *Journal of dental research.*2009; 88(2):116-125.
23. Yu, O. Y., Mei, M. L., Zhao, I. S., Li, Q. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dental Materials.*2018; 34(12): e344-e352.

24. Rossi, G., Squassi, A., Mandalunis, P., & Kaplan, A. Effect of silver diamine fluoride (SDF) on the dentin-pulp complex: ex vivo histological analysis on human primary teeth and rat molars. *Acta Odontol Latinoam*.2017; 30(1): 5-12.
25. Mattos-Silveira, J., Ferreira, F.R., Viganó, M.E., Frizzo, M.A., Reyes, A., & Mendes, F.M. New proposal of silver diamine fluoride use in arresting approximal caries: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014; 15(1):448.
26. Castellanos, J. E., Gallón, L. M. M., Vacca, M. V. Ú., Rubio, G. A. C., & Biermann, S. M. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental/Enamel Remineralization under the Current Caries Understanding. *Universitas Odontológica*.2013; 32(69): 49-59.
27. Hilaire, T. S. Efecto remineralizante del flúor y del fosfopéptido de caseína-fosfato cálcico amorfo en la inhibición de erosión producida por bebidas deportivas sobre el esmalte de dientes permanentes. Estudio in vitro. *Revista KIRU*. 2015; 12(2).
28. Mei, M. L., Chu, C. H., Lo, E. C. M., & Samaranayake, L. P. Fluoride and silver concentrations of silver diammine fluoride solutions for dental use. *International journal of paediatric dentistry*.2013;23(4):279-285.
29. Chu, C. H., Mei, L. E. I., Seneviratne, C. J., & Lo, E. C. M. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. *International journal of paediatric dentistry*.2012;22(1):2-10.

30. Crystal, Y. O., Rabieh, S., Janal, M. N., Rasamimari, S., & Bromage, T. G. Silver and fluoride content and short-term stability of 38% silver diamine fluoride. *The Journal of the American Dental Association*.2019; 150(2):140-146.
31. Horst, J. A., Ellenikiotis, H., Milgrom, P. M., & UCSF Silver Caries Arrest Committee. UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications, and consent. *Journal of the California Dental Association*.2016; 44(1):16.
32. Ollie, Y. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C., & Chu, C. H. Caries-arresting effects of silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *Journal of dentistry*.2018; 78:65-71.
33. PAC, A. Use of Silver Diamine Fluoride for Dental Caries Management in Children and Adolescents, Including Those with Special Health Care Needs. *Pediatric Dentistry*.2017;39(5):135-145.
34. Llodra, J. C., Rodriguez, A., Ferrer, B., Menardia, V., Ramos, T., & Morato, M. Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *Journal of dental research*. 2005;84(8):721-724.
35. Shah, S., Bhaskar, V., Venkataraghavan, K., Choudhary, P., Ganesh, M., & Trivedi, K. Efficacy of silver diamine fluoride as an antibacterial as well as antiplaque agent compared to fluoride varnish and acidulated phosphate fluoride gel: An in vivo study. *Indian Journal of Dental Research*.2013; 24(5):575.
36. Gao, S. S., Zhang, S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2016). Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment—a systematic review. *BMC Oral Health*.2016; 16(1):12.

37. Crystal, Y. O., Janal, M. N., Hamilton, D. S., & Niederman, R. Parental perceptions and acceptance of silver diamine fluoride staining. *The Journal of the American Dental Association*. 2017; 148(7):510-518.
38. de la Luz Campos-Torres, M., Navarrete-Ramales, J. J. A., & Pérez-López, J. Efecto bactericida del fluoruro diamino de plata sobre microorganismos anaerobios facultativos y estrictos, aislados de conductos radiculares necróticos de dientes deciduos (in-vitro). *Revista de Sanidad Militar*. 2008; 62(5):229-234.
39. Fluoroplat - Medicamento - PR Vademecum. (2019). Recuperado 11 julio 2019, de: <https://ar.prvademecum.com/medicamento/fluoroplat-5004/>
40. Fagamin. Recuperado 10 julio 2019, de: <http://www.tedequim.com/wpcontent/uploads/Instrucciones-FAgamin.pdf>
41. Elias, P., & de Plata, F. D. Técnica de Pincel y Vaselina. *Gaceta Odontológica*. 1999.
42. Knight, G. M., McIntyre, J. M., Craig, G. G., Zilm, P. S., & Gully, N. J. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *Australian dental journal*. 2005; 50(4):242-245.
43. Horst, J. A., Ellenikiotis, H., Milgrom, P. M., & UCSF Silver Caries Arrest Committee. UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications, and consent. *Journal of the California Dental Association*. 2016; 44 (1), 16.
44. Scarpelli, B. B., Punhagui, M. F., Hoepfner, M. G., Almeida, R. S. C. D., Juliani, F. A., Guiraldo, R. D., & Berger, S. B. In vitro evaluation of the

remineralizing potential and antimicrobial activity of a cariostatic agent with silver nanoparticles. *Brazilian dental journal*. 2017;28(6):738-743.

45. de Almeida, L. D. F., Cavalcanti, Y. W., & Valença, A. M. In vitro antibacterial activity of silver diamine fluoride in different concentrations. *Acta Odontológica Latinoamericana*. 2011; 24(2):127-131.
46. Alves, T. M. S., Silva, C. A., da Silva, N. B., de Medeiros, E. B., & Valencia, A. M. G. Antimicrobial activity of fluoridated products on biofilm-forming bacteria: an in vitro study. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2010; 10(2):209-216.
47. Contreras, R. G., Sakagami, H., Nakajima, H., & Shimada, J. Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In vivo*. 2010; 24(4):513-517.
48. Márquez-Rodríguez, J. A., Navarro-Lizaranzu, M., Cruz-Rodríguez, D., & Gil-Flores, J. ¿Por qué se le tiene miedo al dentista?: Estudio descriptivo de la posición de los pacientes de la Sanidad Pública en relación a diferentes factores subyacentes a los miedos dentales. *RCOE*. 2004; 9(2):165-174.
49. tiempo | Diccionario de la lengua española (2001) [Internet]. «Diccionario esencial de la lengua española». 2020 [citado 14 Enero 2020]. Disponible en: <https://www.rae.es/drae2001/tiempo>.
50. dosis | Diccionario de la lengua española (2001) [Internet]. «Diccionario esencial de la lengua española». 2020 [citado 14 Enero 2020]. Disponible en: <https://www.rae.es/drae2001/dosis>.
51. Arrebola, D. F. A., Fernández, L., & Sánchez, D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista toxicológica en línea*. 2003. 40-53.

52. Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., Marrero, C., & Reyna, I. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*.2017. 21(1), 171-186.
53. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol*. 2006; 33: 17-34.
54. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2007; 3: 95-101
55. Carison C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, HessKL, Jones RL et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *JPhysChem B*. 2008; 112: 1360-1619.
56. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol In Vitro*.2010; 24: 872-878.
57. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS –and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett*. 2008; 179: 130-139.
58. AshaRani PV, Low KahMunG, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*.2009; 3: 279-290.