



**Universidad
Andrés Bello®**
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad De Odontología

**DESARROLLO DE UN COPOLÍMERO DE NANOFIBRAS DE
POLICAPROLACTONA/POLIVINIL ALCOHOL
FUNCIONALIZADO CON GENTAMICINA COMO ALTERNATIVA
AL TRATAMIENTO DE RECUBRIMIENTO PULPAR DIRECTO EN
PULPITIS REVERSIBLE**

Tesis de pregrado para optar al título de Cirujano Dentista

Autores:
Lic. Cristian Bravo Báez
Lic. Francisca Mardones Araya
Profesor tutor: Luis Velásquez Cumplido

Santiago de Chile, 2017

Agradecimientos

Queremos agradecer en primer lugar a nuestro tutor el Dr. Luis Velásquez por su buena disposición, por darnos la confianza para poder trabajar en el CIMIS y por habernos introducido en un área en que la odontología recién comienza a crecer.

A la Dra. Alejandra Fernández, quien fue nuestra co-tutora, por orientarnos y entregarnos apoyo durante todo el proceso de confección de nuestra tesis.

Al CIMIS UNAB, en especial al Dr. Yusser Olguín y a Cristian Campos por darse el tiempo de enseñarnos respecto al uso de la máquina de *electrospinning*.

Al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la UNAB, particularmente la Dra. Pamela Machuca, quien nos ayudó en los procedimientos y análisis microbiológicos de nuestra tesis.

Al Laboratorio de Análisis de Sólidos de la UNAB, particularmente a Poldie Oyarzún, por su gestión y ayuda respecto al microscopio electrónico de barrido.

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Indice de tablas y figuras	4
Indice de figuras	4
Indice de Tablas	6
Resumen	6
1. Introducción	8
2. Marco teórico:	11
2.1 Patología pulpar	11
2.1.1 Complejo pulpodentinario.....	11
2.2 Histología del complejo pulpodentinario	12
2.2.1 Dentina:.....	12
2.2.3 Clasificación y definición de las patologías pulpares	16
2.3 Clasificación de patologías pulpares	17
Pulpa clínicamente normal:	17
Pulpitis reversible:	18
Pulpitis irreversible:	18
Necrosis pulpar:	18
2.4 Microbiología de la caries dentinaria profunda	19
2.5 Recubrimientos pulpares	19
Recubrimiento pulpar indirecto.....	19
Recubrimiento pulpar directo	19
2.6 Tratamientos alternativos	20
2.7 Nanotecnología	23
2.7.1 Electrospinning.....	23
2.7.2 Policaprolactona.....	25
2.7.3 Polivinil alcohol.....	25
2.8 Nanotecnología en odontología	26
3.Pregunta de investigación	27
3.1 Hipótesis	27
3.2 Objetivo general	27
3.3 Objetivos específicos :	27
4.Materiales y métodos	28
4.1 Síntesis de nanofibras de PCL con coaxial de polivinil alcohol (PVA) y Gentamicina mediante <i>electrospinning</i>	28
4.2 Microscopía electrónica de Barrido	28
4.3 Ensayo de efecto antimicrobiano	29
4.3.1 Reactivos	29
4.3.2 Bacterias	29
4.4.1 Agar rocosa.....	30
4.4.2 Mitis/Salivarius:	30
4.4.3 BHI líquido:.....	30
4.4.4 BHI sangre:	30
4.4.5 Agar blando.....	31
4.5 Condiciones de cultivo	31
4.5.1 Lactobacillus:	31
4.5.2 Mutans Streptococci:.....	31
4.5.3 Bacterias aeróbicas:.....	31
4.5.4 Mutans streptococci	31
4.6 Ensayo efecto antimicrobiano en agar blando	31

4.6.1 Lactobacillus	31
4.6.2 Mutans Streptococci.....	32
4.7 Efecto antimicrobiano de la matriz polimérica.....	32
5. Resultados.....	33
5.1 Síntesis de una matriz de PCL con coaxial de polivinil alcohol (PVA) y Gentamicina mediante <i>electrospinning</i>.....	33
5.1.1 Fotografía del material en aspecto macroscópico.....	33
5.1.2 Fotografías del material a través de microscopia electrónica de barrido.....	34
5.2 Efecto antimicrobiano de la matriz.....	34
5.2.1 Bacterias aeróbicas.....	34
5.2.2 Bacterias cariogénicas	37
6.Discusión.....	39
7.Referencias bibliográficas.....	44

Indice de tablas y figuras

Indice de figuras

Figura 1. Aspecto macroscópico del material una vez retirado del colector.....	32
--	-----------

Figura 2. Nanofibras de PCL/PVA en escala de 1mm (lado izquierdo) y en escala de 50 um (lado derecho).....	32
Figura 3. Nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina en escala de 50 um (lado izquierdo) y en escala de 10um (lado derecho).....	33
Figura 4. Siembra con agar blando de <i>Pseudomona aeruginosa</i> , en A con 4, 2, 1 mg y en B 0.5, 0.25, y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.....	33
Figura 5. Siembra con agar blando de <i>Staphylococcus aureus</i> , en C con 4, 2, 1 mg y en D con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA +Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.....	34
Figura 6. Siembra con agar blando de <i>Bacillus cereus</i> , en E con 4, 2, 1 mg y en F con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.....	34
Figura 7. Siembra con agar blando de <i>Escherichia coli</i> , en G con 4, 2, 1 mg y en H con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.....	35
Figura 8. Siembra con agar Mitis salivarius de <i>Streptococcus mitis</i> con 1, 0.5 , 0.25 y 0.01 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (izquierda). Siembra en BHI de <i>Streptococcus salivarius</i> con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (derecha)	36
Figura 9. Siembra con agar Mitis Salivarius de <i>Streptococcus mutans</i> con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (izquierda). Siembra en agar Rogosa de <i>Lactobacillus paracasei</i> con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (derecha)	37

Indice de Tablas

Tabla 1. Resultados de los halos en milímetros obtenidos de las diferentes concentraciones del material cargado con Gentamicina y un control en bacterias aeróbicas.....	35
Tabla 2. Resultados de los halos en milímetros obtenidos tras la aplicación de 20uL de sulfato de Gentamicina en cepas cariogénicas.....	36
Tabla 3. Resultados de los halos en milímetros obtenidos de las diferentes concentraciones del material cargado con Gentamicina y un control en cepas cariogénicas.....	37

RESUMEN

OBJETIVOS: Sintetizar y evaluar un copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina para ser utilizado en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo en pulpitis reversible.

MÉTODOS: Se sintetizó un copolímero de policaprolactona/polivinil alcohol (PCL/PVA) funcionalizado con Gentamicina mediante *electrospinning*, además se utilizó microscopía electrónica de barrido para observar la morfología del material, por último, se realizaron pruebas antimicrobianas en las principales cepas bacterianas asociadas a enfermedades nosocomiales y involucradas en la caries dental.

RESULTADOS: El material recolectado del *electrospinning* presentó macroscópicamente un aspecto de polvo, color blanco, sólido, no translúcido e inodoro.

Al microscopio electrónico se observaron estructuras laminares y en forma de hojarasca, correspondiente a conglomerados de polímero, no se observaron diferencias estructurales entre la matriz de PCL/PVA + Gentamicina y el material control (PCL/PVA). Tras realizar el ensayo de efecto antimicrobiano se observó que las nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina presentaban actividad sobre las bacterias asociadas a enfermedades nosocomiales, mientras que las cepas cariogénicas que se mostraron susceptibles fueron *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus oralis*, sin embargo no se observó efecto sobre *Lactobacillus paracasei* ni *Lactobacillus spp.*

CONCLUSIONES: El conjunto de los resultados indica que este copolímero podría tener una aplicación clínica en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo en pulpitis reversible. Es importante recalcar que este estudio representa una etapa inicial en la confección de un material basado en nanotecnología, por lo que recomendamos continuar el estudio para aumentar el N y así darle mayor soporte experimental a este.

1. Introducción

Fejerskov define la caries como una “disolución química localizada de una superficie dental resultante de eventos metabólicos que tienen lugar en un *biofilm* que cubre el área afectada. Estos eventos metabólicos son el proceso carioso. La interacción entre los depósitos microbianos y los tejidos duros de los dientes puede resultar en la lesión de caries que es el signo o síntoma del proceso. La mayoría de los componentes del proceso de caries, tales como *biofilm*, dieta y saliva, pueden ser interferidos. Actúan en la superficie del diente, pero otro conjunto de determinantes actúan a nivel del individuo. Estos incluyen el comportamiento, el conocimiento, las actitudes y la educación de la persona, y pueden ser mucho más difíciles de modificar”.(1)

Entendiendo que la caries dental es una enfermedad multifactorial, sabemos que podemos interferir los distintos componentes causantes de esta, pero es muy difícil lograr modificar el 100% de estos factores para evitar la enfermedad, más aún el factor socioeconómico lo que claramente se manifiesta en la deficiente salud de la población chilena.

El 60% - 90% de los escolares y casi el 100% de los adultos del mundo padecen caries dental. (2) En Chile, la caries dental es considerada uno de los principales problemas de Salud Pública, seguida por las enfermedades gingivales y periodontales y las anomalías dentomaxilares. Según el Ministerio de Salud (MINSAL), un 84.7% de la población entre 6 y 8 años presentan evidencias clínicas de caries y la estadística llega a un 84.3% en la población de 12 años. Sin embargo, en la población adulta y en concordancia con los datos de la OMS la prevalencia de caries puede llegar hasta el 100% ,(3) constituyendo la mayor causa de pérdida de piezas dentarias.(4)

Es sabido que si una lesión de caries no se detiene en su estado inicial, la progresión natural de la misma dará lugar a una extensa destrucción de tejido comprometiendo la pulpa dental (5,6). Lo cual llevara a una pulpitis que puede ser de tipo reversible o irreversible. Cuando la pulpa se ve comprometida, la principal alternativa terapéutica es eliminar el tejido pulpar a través de un

tratamiento endodóntico (3,7). Es por esto que en los últimos años los esfuerzos de los odontólogos han sido enfocados en prevenir la aparición de la enfermedad de caries y en preservar el tejido pulpar mediante diversas técnicas y materiales.

Un 37% de la población chilena mayor de 15 años declara que su salud bucal afecta su calidad de vida siempre o casi siempre (8). Considerando que la mayor parte de la población no tiene acceso a tratamientos de especialidad en odontología como los tratamientos endodónticos, y al extenso tiempo de espera para acceder a estos en el servicio público, se hace necesario contar con una alternativa en el tratamiento de la pulpitis reversible que pueda ser realizada de inmediato en la consulta del odontólogo general, evitando llegar al tratamiento endodóntico, la eventual pérdida del diente durante la espera a ser atendidos por el especialista o simplemente porque los pacientes muchas veces prefieren la exodoncia de la pieza al no poder costear el tratamiento, todo esto generando consecuencias que posteriormente llevan a la pérdida del equilibrio del sistema estomatognático.

Actualmente una de las técnicas más utilizadas como alternativa al tratamiento endodóntico en casos de comunicación con el tejido pulpar, de un tamaño menor a 2 mm, son los recubrimientos pulpares directos. En esta técnica, se deja en contacto la pulpa directamente con un material con el objetivo de que induzca una respuesta reparativa en la zona afectada. Idealmente un material de recubrimiento directo debiese aislar la pulpa de infección y proveer un ambiente biológicamente favorable para la reparación del tejido pulpar (9). El hidróxido de calcio ha sido el *gold standard* en materiales de recubrimiento pulpar directo, sin embargo, tiene sus propias limitaciones tales como inducir necrosis coagulativa y calcificación patológica con la consecuente obliteración de la cámara pulpar (10,11). Por otra parte se encuentra el agregado de trióxido mineral (MTA), el cual eficientemente induciría formación de dentina reparativa sin respuestas inflamatorias en la pulpa, sin embargo, es difícil de manejar, presenta una pobre adhesión al sustrato dentario, genera cambios de coloración dentaria lo cual disminuye su uso clínico y tiene un elevado costo (12,13,14). Además se ha reportado en la literatura una tasa de falla de 31,5%

en recubrimiento pulpar directo con Hidróxido de calcio y un 19,7% en recubrimiento pulpar directo con MTA (15).

Por otra parte, dentro de los últimos años los andamios basados en nanofibras se han vuelto populares. Estos materiales exhiben características increíbles y han sido utilizadas en muchos campos asociados al área de la salud como la ingeniería de tejidos, sistemas de administración de fármacos y el tratamiento de heridas. Estos andamios pueden ser sintetizados por *electrospinning* (7) (técnica para sintetizar fibras poliméricas a través de la aplicación de voltaje sobre los polímeros) o liofilización (técnica para sintetizar fibras poliméricas a través de procesos de deshidratación) (16,17). El *electrospinning* es una de las más prometedoras técnicas en la fabricación de matrices de nanofibras por su eficiencia, simplicidad en la fabricación, versatilidad, bajo costo y potencial de ser llevado a usos industriales. Las propiedades de estas nanofibras pueden ser caracterizadas y funcionalizadas al seleccionar distintos polímeros, drogas, solventes, emulsionantes o variando las condiciones del proceso de *electrospinning* (7). Actualmente esta técnica en odontología se ha utilizado para la creación de diversos biomateriales en áreas como la endodoncia regenerativa, periodoncia, implantología y cirugía.

A pesar de que clásicamente se indica a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* como las bacterias responsables de la caries dental, el universo de microorganismos involucrados en este proceso es mucho más amplio, y varía dependiendo del estado de avance de la enfermedad.

Bajo la premisa de que la pulpa dental repara en un ambiente libre de infección e inflamación es que en el presente estudio nuestro objetivo es crear un material de recubrimiento pulpar directo con capacidad antimicrobiana basado en andamios de nanofibras mediante técnica de *electrospinning* de modo de evitar el tratamiento endodóntico en piezas con comunicación pulpar menor a 2 mm y diagnóstico de pulpitis reversible y así conservar la integridad del complejo pulpo-dentinario, evitando injurias innecesarias a este órgano, que a futuro generen alguna variación en la respuesta de este. Dando así alternativa de tratamiento a la mayoría de la población chilena que no tiene acceso a

tratamientos endodónticos, y evitando que aumente la pérdida de piezas dentarias en estos pacientes.

2. Marco teórico:

2.1 Patología pulpar

2.1.1 Complejo pulpodentinario

La dentina y la pulpa están relacionadas embriológica, histológica y funcionalmente (18) y en su conjunto conforman el complejo pulpodentinario. El complejo pulpodentinario está compuesto por una porción periférica de tejido duro (dentina) y una porción central de tejido conectivo (pulpa). Esta última se encuentra confinada a la cavidad pulpar la que se divide en una porción coronaria (cámara pulpar) y una porción radicular (conducto radicular), la cámara pulpar sigue la forma anatómica de la corona del diente extendiéndose hacia cada cúspide en el caso de molares y premolares, estas prolongaciones cuspidas de la pulpa son llamadas cuernos pulpares. Los cuernos pulpares tienen relevancia clínica al momento eliminar caries muy profundas ya que se debe tener especial cuidado para evitar exponerlos al medio bucal.

El conducto radicular termina en el foramen apical donde la pulpa dental se une al ligamento periodontal y donde entra y sale el paquete vasculo-nervioso al diente. En dientes jóvenes este foramen apical suele ser amplio y céntrico, a medida que el diente envejece el foramen apical se vuelve más estrecho y excéntrico. La anatomía del conducto radicular, o sistema de conductos, es variable pudiendo terminar en uno o varios forámenes apicales, y pudiendo existir conductos laterales que se comuniquen con el ligamento periodontal. Es por esta íntima relación que existe entre la pulpa y el ligamento periodontal que las patologías que afecten a la pulpa pueden producir cambios en el ligamento periodontal, lo que se puede manifestar con síntomas y signos tanto clínicos como radiográficos.

El complejo pulpo dentinario tiene múltiples funciones, destacando entre ellas:

- **Nutritiva** mediante el aporte vascular.
- **Sensibilidad** mediante el aporte nervioso.
- **Defensiva** mediante el aporte de células del sistema inmune.

- **Formativa** existe formación continua formación de dentina por parte de los odontoblastos.

2.2 Histología del complejo pulpodentinario

2.2.1 Dentina:

La dentina madura se compone de aproximadamente 70% de material inorgánico, 20% de material orgánico y 10% de agua (18). El componente inorgánico de la dentina consiste en hidroxapatita. El orgánico está compuesto en un 90% de colágeno principalmente tipo I con pequeñas cantidades de tipo III y V y el 10% restante del material orgánico consiste en diversas proteínas y lípidos. A pesar de que se ha intentado aislar proteínas propias de la dentina y otras propias exclusivamente de huesos hoy en día se sabe que existen proteínas que comparten ambos tejidos. Estas proteínas son las siguientes: fosfoproteína fosforina (DPP), sialoproteína dentinaria (DSP), glicoproteína dentinaria (DGP), proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), osteonectina, osteocalcina, sialoproteína ósea (BSP), osteopontina, fosfoglicoproteína de matriz extracelular, proteoglicanos y algunas proteínas séricas. Estas proteínas tienen como función regular la deposición de minerales y pueden actuar como inhibidores, promotores y/o estabilizadores en el proceso de mineralización. Si existen mutaciones en DSP o DPM1 resultan en alteraciones fenotípicas como la dentinogenesis imperfecta o la displasia dentinaria.

El colágeno tipo I actúa como un andamio para el contenido mineral (hidroxapatita).

La dentina es ligeramente más dura que el hueso y más blanda que el esmalte. Físicamente, la dentina tiene una cualidad elástica que es importante para el correcto funcionamiento del diente debido a que la elasticidad proporciona flexibilidad y previene la fractura del esmalte (18).

Al observar la dentina al microscopio se pueden identificar distintas estructuras: túbulos dentinarios que albergan la prolongación odontoblástica, dentina peritubular e intertubular.

Se ha estimado que en las partes coronales de los dientes premolares y molares jóvenes, el número de túbulos dentinarios oscila entre 59.000 y

76.000 por milímetro cuadrado en la superficie pulpar, con aproximadamente la mitad de túbulos dentinarios por milímetro cuadrado cerca del esmalte (18). Esto se traduce en que en la proximidad del órgano pulpar la dentina es mucho más permeable que en la cercanía del esmalte.

Tipos de dentina:

- **Dentina primaria:** compone la mayor parte del diente, se deposita hasta que el diente entra en oclusión.
- **Dentina secundaria:** también llamada dentina fisiológica, comienza a depositarse después que se ha completado la formación de la raíz del diente y continúa durante toda la vida del diente
- **Dentina terciaria:** se produce en reacción a diversos estímulos, como caries o un procedimiento dental restaurador. A diferencia de la dentina primaria o secundaria que se forma en la periferia de todo el complejo pulpodentinario, la dentina terciaria es producida sólo por las células directamente afectadas por el estímulo. Su histología se observa mucho más desorganizada, no siempre se pueden diferenciar túbulos dentinarios. Se sub-clasifica como :
 - **Reaccionaria:** es depositada por odontoblastos preexistentes.
 - **Reparadora:** es depositada por células madre de la pulpa diferenciadas de tipo odontoblasto.
- **Dentina esclerótica:** se cree que es una respuesta fisiológica, corresponde a túbulos dentinarios calcificados, cuando esto ocurre en muchos túbulos dentinarios contiguos se observa una dentina de aspecto más vítreo y translucido, aumenta con la edad y disminuye la permeabilidad de la dentina.

2.2.2 Pulpa:

La pulpa dental es el tejido conectivo que soporta la dentina. Histológicamente, se distinguen cuatro zonas distintas:

1. La zona odontoblástica en la periferia de la pulpa
2. La zona libre de células de Weil ,debajo de los odontoblastos.

3. Una zona rica en células, como su nombre lo indica, la densidad celular es alta.
4. El núcleo de la pulpa, donde se concentra el aporte vasculo-nervioso.

Las principales células de la pulpa son los odontoblastos, los fibroblastos, las células ectomesenquimáticas no diferenciadas, los macrófagos y células del sistema inmune. La pulpa dental es una importante fuente de células madre multipotenciales.

Células que se encuentran en la pulpa:

Odontoblastos:

Las células encargadas de secretar dentina, tanto primaria, secundaria y terciaria, son los odontoblastos. Se encuentran dispuestas en empalizada en la periferia de la pulpa y poseen un proceso que se extiende hacia la dentina. El número de odontoblastos se corresponde con el número de túbulos dentinarios mencionados anteriormente.

La morfología del odontoblasto depende de su actividad secretora, la que puede estar activa o quiescente. Una célula activa es alargada con un núcleo basal y mucho citoplasma. Una célula en estado quiescente es más achatada y con menos citoplasma.

El odontoblasto posee una prolongación apical llamada proceso odontoblástico, el que se introduce en la dentina a través de los túbulos dentinarios. El túbulo dentinario y su contenido, proceso odontoblástico y fluido dentinario, otorgan a la dentina su vitalidad y capacidad para responder a diversos estímulos.

En ocasiones, cuando el tejido pulpar está expuesto, la reparación puede tener lugar mediante la formación de nueva dentina. Es decir que nuevos odontoblastos deben haberse diferenciado y emigrado al sitio de exposición a partir del tejido pulpar, muy probablemente de la zona subodontoblástica rica en células. La diferenciación de odontoblastos durante el desarrollo de los dientes requiere una cascada de determinantes, incluyendo células del epitelio interno del esmalte o vaina de Hertwig. Las células del epitelio del esmalte, sin embargo, ya no están presentes en el diente desarrollado, y el estímulo para la

diferenciación de nuevos odontoblastos en estas circunstancias es, pues, diferente y no se entiende todavía (18).

El odontoblasto es una célula terminal, incapaz de dividirse o reproducirse, por lo que ante una injuria este puede morir y la posibilidad de que se origine dentina terciaria (reparadora) dependerá de células mesenquimáticas indiferenciadas presentes en la zona celular de la pulpa dental.

Fibroblastos:

Son las células que se encuentran en mayor cantidad en la pulpa, su función es formar y mantener la matriz de la pulpa, que consiste en colágeno y sustancia fundamental. En las pulpas jóvenes los fibroblastos se encuentran sintetizando activamente matriz, pero a medida que la pulpa envejece esta síntesis disminuye.

Células mesenquimales indiferenciadas:

Corresponden al reservorio del cual derivan las células del tejido conectivo de la pulpa. Dependiendo del estímulo estas células se diferencian en odontoblastos o fibroblastos. Se ubican en la zona rica en células y en el núcleo de la pulpa, interrelacionadas con los vasos sanguíneos. A medida que la pulpa envejece disminuye la cantidad de células mesenquimales indiferenciadas, esta reducción, junto con otros factores de envejecimiento, reduce el potencial regenerativo de la pulpa.

Células madre de pulpa dental

Se han aislado células madre mesenquimales de la pulpa dental de dientes adultos y deciduos. Estas células madre de pulpa dental posnatal tienen una capacidad de auto-renovación y, bajo condiciones ambientales apropiadas, pueden diferenciarse en odontoblastos, condrocitos, adipocitos, neuronas y osteoblastos, por lo que podría ser una herramienta para la regeneración ósea.

Células del sistema inmune

En el centro de la pulpa pueden encontrarse macrófagos. Además podemos encontrar linfocitos T, linfocitos B que serán escasos en pulpas en condiciones normales, neutrófilos y eosinófilos que aumentan en presencia de infección. Podemos encontrar también células dentríticas presentadoras de antígeno ubicadas bajo la capa odontoblástica, las que también aumentan en número en presencia de infección.

Cambios en la pulpa con la edad

Como todos los tejidos del cuerpo el complejo pulpodentinario sufre una serie de cambios con la edad, entre ellos destaca la notoria disminución del tamaño de la cámara pulpar y del conducto radicular producido por la deposición de dentina lo que se traduce en una menor cantidad de pulpa y por ende menor irrigación e inervación del diente. La menor inervación disminuye la sensibilidad lo que se ve potenciado por la presencia de dentina reparadora y reaccionaria. La continua deposición de dentina disminuye el diámetro de los túbulos dentinarios. A partir de los 20 y hasta los 70 años las células disminuyen en número casi a la mitad. También aumenta la cantidad de dentina esclerótica, sobre todo en el tercio apical de la raíz, lo que se traduce en una disminución de la permeabilidad dentinaria.

2.2.3 Clasificación y definición de las patologías pulpares

Como ya sabemos, la pulpa dental se encuentra rodeada de tejido duro e inextensible ante la inflamación de esta, por lo que la inflamación pulpar (pulpitis) tiene algunos aspectos particulares que se mencionaran a continuación. En caso de existir una caries penetrante que exponga la pulpa al medio oral se puede producir la propagación de la infección pulpar hacia el hueso lo que puede provocar complicaciones graves, como trombosis del seno cavernoso, angina de Ludwig o sepsis sistémica con complicaciones potencialmente mortales (19). El dolor relacionado con la pulpitis actúa como un mecanismo de defensa que puede conducir a una intervención terapéutica previa a complicaciones graves.

La inflamación pulpar se puede producir producto de distintas injurias, principalmente cuatro:

1. Daño mecánico: accidentes traumáticos, daño iatrogénico de procedimientos dentales, desgaste, abrasión y cambios barométricos.
2. Injurias térmicas: estímulos térmicos severos pueden transmitirse a través de grandes restauraciones metálicas o producto de procedimientos dentales como la incorrecta irrigación durante la preparación de una cavidad, el pulido y las reacciones químicas exotérmicas de los materiales dentales.
3. Irritación química: Los daños químicos pueden ser causados por la erosión al consumir alimentos ácidos en piezas con lesiones cariosas profundas o por el uso inapropiado de materiales dentales ácidos.
4. Efectos bacterianos: Las bacterias pueden dañar la pulpa a través de las toxinas o directamente después de la extensión de la caries o el transporte a través de los vasos sanguíneos (vía anacorética).

2.3 Clasificación de patologías pulpares

Neville realiza una clasificación de pulpitis, basándose en un examen clínico que evalúa el dolor pulpar (pulpalgia) mediante una combinación de la clínica y la respuesta del diente a distintas pruebas de sensibilidad, que guiara al tratamiento adecuado para cada patología. Sin embargo esto no deja de ser subjetivo y con un bajo valor predictivo. En los casos en que la pulpa está libre de patología los resultados son altamente confiables, por el contrario cuando este examen indica que existe una pulpitis irreversible, se ha observado que no siempre se condice con el examen histopatológico.

- **Pulpa clínicamente normal:** Clínicamente, una pulpa normal no presenta signos o síntomas que sugieran pulpitis. Estos dientes responden al frío con dolor leve que se resuelve en 1 a 2 segundos, mientras el calor no produce malestar pulpar. No presenta dolor a la percusión, y el examen radiográfico del hueso perirradicular estará dentro de los límites normales.

- **Pulpitis reversible:** el diente presenta dolor agudo al aplicar un estímulo frío o dulce, incluso a veces calor, pero este se resuelve segundos después eliminado el estímulo. A la prueba eléctrica responde a niveles más bajos de corriente respecto al diente control. No presenta movilidad ni dolor a la percusión. Si se deja que progrese, la pulpa puede verse afectada de manera irreversible. Su etiología pueden ser caries, fracturas dentales y restauraciones defectuosas.

No debe confundirse con sensibilidad dentinaria, que dará una sintomatología similar. Histológicamente en pulpitis reversible, la pulpa suele presentar hiperemia, edema y algunas células inflamatorias subyacentes al área de los túbulos dentinarios afectados. Puede observarse dentina terciaria en la pared dentinaria adyacente, y ocasionalmente células inflamatorias agudas dispersas (20,21,22) .

- **Pulpitis irreversible:** el diente presenta dolor agudo y severo al aplicar estímulos fríos, dulces o calientes y este continúa durante un período largo de tiempo una vez eliminado. El dolor puede presentarse de manera espontánea y puede aumentar al estar el paciente acostado. A la prueba eléctrica responde a niveles más bajos de corriente respecto al diente control. El paciente es incapaz de localizar específicamente el diente comprometido. No presenta movilidad ni dolor a la percusión. En caso de existir drenaje pulpar debido a fractura coronaria la sintomatología puede ceder. Histológicamente a menudo demuestra congestión de las vénulas que resulta en necrosis focal. Esta zona necrótica contiene leucocitos polimorfonucleares e histiocitos. El tejido pulpar circundante exhibe habitualmente fibrosis y una mezcla de células plasmáticas, linfocitos e histiocitos (19).
- **Necrosis pulpar:** el diente no responde a las pruebas de sensibilidad eléctrica o térmica. La necrosis pulpar parcial (necrobiosis pulpar) ocurre a menudo y puede ser aislada a la porción coronal o a un canal de un diente multiradicular, es por esto que dientes con pulpas necróticas presentan síntomas que pueden variar de ninguno a dolor agudo con o sin sensibilidad a la percusión.

2.4 Microbiología de la caries dentinaria profunda

Específicamente cuando la caries se encuentra en dentina profunda, las bacterias identificadas en el proceso son las siguientes: *Veillonella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus anginosus*, *Atopobium genomospecies*. Una combinación de bacterias Gram positivo y Gram negativo y en su mayoría anaerobias facultativas o estrictas. Es por esto que el agente antimicrobiano necesario para combatir una posible recolonización debe ser de amplio espectro (23). Investigaciones in vitro han concluido que el uso de antibióticos es muy efectivo para esterilizar lesiones de caries, pulpas necróticas y dentina radicular (24,25).

2.5 Recubrimientos pulpaes

Según la asociación americana de endodoncia el recubrimiento pulpar se define como el tratamiento de una pulpa vital expuesta al sellar la lesión pulpar con un material dental como el hidróxido de calcio o el MTA para facilitar la formación de dentina reparativa y mantener la pulpa vital (26). Esta exposición pulpar puede ser de origen mecánica, traumática o por caries.

Recubrimiento pulpar indirecto

La asociación americana de endodoncia lo define como el procedimiento en el que un material es colocado sobre una delgada porción de caries remanente que en caso de ser removida provocará la exposición pulpar en dientes permanentes jóvenes (26). Sin embargo, otros autores señalan que la indicación de este procedimiento se puede realizar en piezas permanentes con apice cerrado, pero en pulpas que por la edad tengan capacidad de responder ante los distintos agentes (27).

Recubrimiento pulpar directo

La asociación americana de endodoncia lo define como la aplicación directa de un material dental sobre una exposición mecánica o traumática de la pulpa , sin embargo, otros autores al igual que con el recubrimiento pulpar indirecto señalan la factibilidad de realizar el tratamiento en caso de exposiciones por caries (27).

Hidróxido de calcio

Es un material de pH básico, comúnmente su presentación es la de un polvo blanco que frecuentemente se ocupa como material en recubrimientos pulpaes y medicación intraconducto en procedimientos endodónticos no quirúrgicos, además diferentes preparaciones pueden ser utilizadas en pulpotomías, apexogénesis y apexificación. Se ha sugerido que su mecanismo de acción, sería la disminución de la reabsorción inflamatoria y además, se ha demostrado que tiene capacidad antimicrobiana. No obstante, este material tiene limitaciones tales como inducir necrosis coagulativa y calcificación patológica, lo que se resulta en la obliteración de la cámara pulpar (10,11,26).

Agregado de trióxido mineral (MTA)

El MTA se define como un material tipo cemento, utilizado en los rellenos apicales, para reparar perforaciones, para recubrimiento pulpar y como barrera apical en diente con ápice abierto. Este material induciría formación de dentina reparativa sin respuesta inflamatoria en la pulpa. Sin embargo, su manipulación es dificultosa, presenta una pobre adhesión al sustrato dentario, genera cambios de coloración dentaria lo cual disminuye su uso clínico y tiene un elevado costo (12,13,14, 26).

2.6 Tratamientos alternativos

En una búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, en el año 2011 Marshall y cols. (3) realizaron un tratamiento farmacológico tópico directamente sobre la pulpa en piezas dentarias con diagnóstico de pulpitis reversible y caries dentinaria profunda, en donde tras remover la caries y generar una comunicación pulpar menor a 2 mm, estos controlaron la inflamación e infección aplicando un antibiótico (Gentamicina) y un antiinflamatorio esteroideal (Betametasona) en algodón, previo a la aplicación de hidróxido de calcio, obteniendo buenos resultados. Otro estudio intento realizar una crema de gentamicina y betametasona en conjunto con MTA, obteniendo resultados favorables, pero menores en comparación con solo la aplicación de MTA (28).

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido, fármacos bactericidas que son transportados de forma activa a través de la pared bacteriana, se unen irreversiblemente a una o más proteínas receptoras específicas de la subunidad 30 S de los ribosomas bacterianos e interfieren con el complejo de iniciación entre el RNA mensajero y la subunidad 30 S. El RNA puede leerse de forma errónea, lo que da lugar a la síntesis de proteínas no funcionales, los polirribosomas se separan y no son capaces de sintetizar proteínas. La gentamicina por vía local tópica se puede absorber en cantidades significativas. Se distribuye principalmente en el líquido extracelular con acumulación en las células de la corteza renal. Atraviesa la placenta. No se metaboliza. Se describen efectos adversos como ototoxicidad y nefrotoxicidad pero con administraciones intramusculares o intravenosas. Tiene indicaciones para tratamiento de infecciones óseas, óticas, oftálmicas entre otras, y en odontología se ha indicado como profilaxis antibiótica para prevenir endocarditis bacteriana, para tratamiento de infecciones dentales e incluso en implantología (28,29,30,31).

Con un amplio espectro antibacteriano que incluye Gram negativos y Gram positivos es capaz de eliminar infección residual tras la remoción mecánica de caries , para facilitar así la reparación de la pulpa y el tejido dentinario. (3)

Hoy en día la nanotecnología ha tenido grandes avances y en la actualidad es factible crear matrices, a partir de polímeros, que poseen la capacidad de

liberar fármacos. Se han descrito aplicaciones biomédicas como algodones funcionalizados con nanopartículas de plata por sus propiedades antibacterianas y antimicóticas (32) y también en la ingeniería de tejidos, sistemas de administración de fármacos y el tratamiento de heridas (8), por lo que este tipo de tecnología ha comenzado a ser utilizada en odontología. Gracias a esto hoy los materiales de recubrimiento pulpar directo podrían ser reemplazados por polímeros biodegradables y biocompatibles que pueden ser funcionalizados con antibióticos, antiinflamatorios o agentes remineralizantes. (33,34,35,36)

Li y cols. en el año 2014 fabricaron una membrana de doble capa de quitosan que contenía micro esferas cargadas con el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), para su liberación sostenida al ser utilizado como material de recubrimiento pulpar directo y así mejorar la función celular de los odontoblastos in vitro e investigar la formación de pulpa y de dentina reparativa in vivo (en un modelo de perro). Se compararon 4 grupos: sin recubrimiento pulpar, recubrimiento pulpar directo con Dycal comercial, membrana de quitosan con y sin TGF- β 1. Se observó que en el modelo de quitosan con TGF- β 1 la proliferación de odontoblastos fue mucho mayor, disminuyó completamente la inflamación de la pulpa y se generó un puente dentinario 3 a 6 veces mayor que en los otros modelos de control (33).

Kamocki y cols. en el año 2015 evaluaron la respuesta de células madre humanas de la pulpa dental a andamios de polidioxanona (PDS), fabricados mediante *electrospinning*, que contenían antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino) para desinfectar el conducto radicular previo a la endodoncia regenerativa. Se observó que el aumento de la concentración de ciprofloxacino dio como resultado una proliferación y viabilidad celular reducida. A diferencia de los grupos expuestos solo a metronidazol o a andamios de PDS puro, donde no se observaron cambios en la proliferación ni en la viabilidad celular (34).

Tao y cols. en el año 2015 investigaron el efecto curativo de andamios de seda, fabricados mediante *electrospinning*, que contenían proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) en la pulpa dental de ratas inflamadas por lipopolisacárido

(LPS). Se comparó: recubrimiento pulpar directo con hidróxido de calcio, recubrimiento pulpar directo con andamios de seda con y sin BMP-2, se observó que en el grupo de andamios de seda con BMP-2 la inflamación de la pulpa fue menor, lo que estimuló la formación de dentina reparativa. (35)

Cvikl y cols. en el año 2017 realizaron un estudio en el que sintetizaron una matriz polimérica de PLGA, mediante *electrospinning*, funcionalizada con plata y observaron su potencial antibacteriano y regenerativo como material de recubrimiento pulpar, obteniendo como resultados que PLGA/Ag-TCP inicialmente disminuyó la viabilidad y proliferación celular mientras que incrementó la capacidad proinflamatoria y la expresión de fosfatasa alcalina (36).

2.7 Nanotecnología

Recientemente las matrices poliméricas de nanofibras han sido estudiadas por sus posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos dentales. Los estudios previos in vitro e in vivo han demostrado que las matrices de nanofibras promueven la expresión de fenotipos odontoblásticos y la biomineralización en células madres de pulpa dental y han confirmado el potencial de estas en la regeneración dentinaria (37). Considerando que las matrices poliméricas de nanofibras son capaces de liberar drogas y proteínas recombinantes, la aplicación de estas puede extenderse al tratamiento de enfermedades pulpares complejas para controlar las infecciones bacterianas y modular el potencial regenerativo de los individuos (37). El CIMIS de la UNAB (*Center for Integrative Medicine and Innovative Science*) tiene amplia experiencia utilizando nanopartículas y este tipo de polímeros (38,39 y 40).

2.7.1 Electrospinning

El *electrospinning* ha sido conocido como el método más útil para la creación de fibras ultrafinas continuas con diámetros ajustables las cuales han sido

utilizadas en biomedicina en ingeniería de tejidos, para la creación de materiales para el tratamiento de heridas y sistemas de liberación de fármacos entre otros (7). Esto debido a que una de sus principales ventajas es que estas nanofibras pueden cargarse con agentes terapéuticos y liberarlos de forma continua por periodos de tiempo determinado (41). Normalmente un equipo de *electrospinning* cuenta con un contenedor para los polímeros, conectados a través de una aguja o sondas, una fuente de poder de alto voltaje y un colector metálico. En el proceso del *electrospinning*, la fuente de alto voltaje se utiliza para crear un fuerte campo electrostático sobre una aguja conductora conectada a un contenedor que almacena la solución polimérica y que se ubica sobre el colector metálico. Cuando la fuerza del campo electrostático alcanza un valor crítico, las cargas en la superficie de las gotas de polímero desestabilizan la forma de esta, de una hemiesfera a una forma cónica llamada cono de Taylor. Cuando el valor crítico del campo electrostático se sobrepone a la tensión del polímero, una hebra de polímero cargado sale eyectado de la punta del cono. Esta hebra pasa por un proceso de inestabilidad y elongación que lo llevan a formar fibras delgadas y alargadas. Durante el trayecto hacia el colector metálico el solvente se evapora y estas hebras se solidifican para finalmente formar fibras ultrafinas en el colector metálico (42, 43, 44).

Existen varios parámetros que pueden afectar la formación de las fibras y su estructura , dentro de los cuales encontramos:

1. Parámetros del sistema: Concentración del polímero, peso molecular del polímero , conductividad de la solución y volatilidad de solvente.
2. Parámetros del proceso: Variaciones en el voltaje de trabajo, el flujo del polímero y la distancia entre el colector y la aguja.
3. Parámetros ambientales: Como la temperatura ambiente y la humedad

La morfología, diámetro y propiedades de las fibras fabricadas mediante *electrospinning* pueden modificarse o variar al ajustar alguno de estos tres parámetros (41, 42).

Si bien la técnica del *electrospinning* es relativamente simple, pueden ocurrir dificultades metodológicas en los aspectos de la carga de agentes terapéuticos a las nanofibras. Para ello existen dos técnicas, el *electrospinning* con coaxial y de emulsión, para ambos las nanofibras generadas consisten de una capa externa y un núcleo interno de diferente composición. La diferencia entre ellos radica en que el *electrospinning* con coaxial genera una separación física entre las dos soluciones a través de dos agujas, mientras que el segundo genera una separación química a través de la creación de una emulsión con una solución simple y su subsecuente organización en dos diferentes fases a medida que el solvente se evapora de las fibras (41, 44).

2.7.2 Policaprolactona

Entre los polímeros más utilizados nos encontramos con la policaprolactona (PCL), la cual es un poliéster alifático, hidrofóbico y biodegradable que a temperatura ambiente puede ser solubilizado en cloroformo, diclorometano, benceno, tolueno entre otros. Está aprobado por la FDA para su uso en humanos y es uno de los polímeros sintéticos más utilizado en aplicaciones biomédicas por su biocompatibilidad y lenta biodegradabilidad (42). La PCL es degradada por hidrólisis de sus enlaces éster en condiciones fisiológicas y esta degradación al ser lenta comparada con otros polímeros la hacen encajar en aplicaciones que requieran una liberación de compuestos bioactivos sostenida en el tiempo (37). Además la PCL puede utilizarse para sintetizar fibras ultrafinas mediante *electrospinning*, las cuales presentan excelentes propiedades como alta porosidad y gran área de contacto. Las matrices de fibra de PCL actúan como sustratos temporales promoviendo adhesión, proliferación y diferenciación de varios tipos de cultivos celulares, transportadores de agentes bioactivos y materiales para tratamiento de heridas (42).

2.7.3 Polivinil alcohol

El polivinil alcohol (PVA) es un polímero sintético soluble en agua, biocompatible y se biodegrada lentamente. Se ha utilizado en la industria del papel, industrias textiles y en una variedad de recubrimientos. Es blanco (inoloro) e inodoro. Dentro de sus propiedades destacan excelente formación

de películas, buen emulsificante y adhesivo (45). Por otra parte en odontología sus usos han sido escasos, principalmente se ha utilizado entorno a la formación de matrices para encapsular hidroxapatita (46,47)

La PCL ha sido funcionalizada con antibióticos, sin embargo, hasta nuestro conocimiento esto no se ha realizado con Gentamicina para uso odontológico.

A mediano plazo buscamos conseguir que la matriz de PCL funcionalizada con Gentamicina inhiba la colonización bacteriana por períodos de tiempo sobre una semana.

A largo plazo el objetivo es ocupar esta matriz de PCL funcionalizada con Gentamicina como material de recubrimiento pulpar directo y demostrar su efectividad en estudios clínicos. Cabe señalar que este estudio corresponde a la primera etapa de generación del producto.

2.8 Nanotecnología en odontología

Esta área de investigación ha sido definida como Nano odontología "*Ciencia y tecnología de diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades orales y dentales, aliviar el dolor, preservar y mejorar la salud dental utilizando materiales nanoestructurados*" (48).

A medida que avanza la investigación en nanotecnología, la odontología también ha ido evolucionando y ha ido aplicando esta nanotecnología en sus tratamientos y en la fabricación de materiales.

Actualmente se han incorporado una gran cantidad de nanopartículas en materiales dentales (como cuarzo, sílice coloidal, zirconia, óxido de zinc) lo que le otorga mejores propiedades químicas y físicas a estos materiales.

Las nanopartículas también pueden ser utilizadas para el suministro selectivo y controlado de fármacos en distintas células y tejidos, pudiendo mantener una concentración uniforme de fármaco en el sitio de la lesión.

Esta característica de suministrar fármacos ha sido utilizada para el tratamiento del carcinoma espino celular (CEC) cargando nanopartículas con cisplatino, reduciendo su toxicidad renal al compararlo con el cisplatino solo.

También se han funcionalizado nanopartículas con triclosán disminuyendo la inflamación periodontal.

Otra aplicación ha sido en endodoncia donde se han utilizado nanopartículas con antibióticos mejorando la desinfección del conducto radicular contra *Enterococcus faecalis*.

La propiedad antimicrobiana de las nanopartículas puede ser incorporada en distintos biomateriales como adhesivos, composites, cementos e implantes. (48).

3. Pregunta de investigación:

¿Puede un copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina ser utilizado como material en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo ?

3.1 Hipótesis

Un copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina, es capaz de inhibir la colonización bacteriana al ocuparlo como material en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo.

3.2 Objetivo general

Evaluar un copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina para ser utilizado en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo en pulpitis reversible.

3.3 Objetivos específicos :

- 1.- Sintetizar un copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina mediante *electrospinning*.
- 2.- Caracterizar morfológicamente la apariencia microscópica del copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina mediante microscopía electrónica.
- 3.- Caracterizar el copolímero de nanofibras de policaprolactona/polivinil alcohol funcionalizado con Gentamicina con acción antibacteriana mediante ensayos de efecto antimicrobiano.

4. Materiales y métodos

4.1 Síntesis de nanofibras de PCL con coaxial de polivinil alcohol (PVA) y Gentamicina mediante *electrospinning*

Para la fabricación del material se utilizó policaprolactona comprada a Sigma Aldrich Alemania con un peso molecular de 10.000-14.000 kDA, polivinil alcohol 87-90% con un peso molecular de 30.000-70.000 kDA comprado a Sigma Aldrich Alemania y una solución de sulfato de Gentamicina de 10 mg/ml suministrada por US Biological. Cada solución polimérica se preparó al 10% (p/v), el PCL y el PVA se masaron en balanza analítica y por tanto se tomaron 2 g de PCL se solubilizaron en 20 mL de una solución cloroformo:metanol en relación 3:1 y 2 g de PVA se solubilizaron en 20 mL de solución de Gentamicina aumentando levemente la temperatura cercano a los 50°C , ambas se disolvieron mediante agitación magnética durante 5 minutos a 500 rpm.

El proceso de *electrospinning* se realizó alimentando el sistema con una bomba de presión a flujo constante. Las puntas usadas fueron de 20G y 15G. La velocidad de alimentación se fijó en 4 mL/hr para la PCL y 1 mL/hr para el coaxial de PVA y Gentamicina. Se aplicó un voltaje de 22 kV a las puntas de las agujas. Se formó un campo eléctrico entorno a la gota que electropolimerizó la mezcla dirigiendo las fibras en el sentido del arco eléctrico hacia el tubo de recolección giratorio, el cual tiene un diámetro de 10 centímetros, con velocidad de rotación de 577 rpm. La distancia entre la punta de la aguja y el tubo de recogida se mantuvo a 11 cm. Las nanopartículas controles se realizaron bajo el mismo protocolo con la salvedad de que 2 g de PVA se solubilizaron en 20 mL de agua destilada. Finalmente se deja el material en refrigeración a 4°C para evitar inactivación del antibiótico.

4.2 Microscopía electrónica de Barrido

Las nanofibras de PCL con coaxial de polivinil alcohol (PVA) y Gentamicina se observaron en el microscopio de Barrido de la Facultad de Geología,

Universidad Andrés Bello. Microscopio Electrónico de Barrido TESCAN Vega 3 LMU.

4.3 Ensayo de efecto antimicrobiano

4.3.1 Reactivos

Bacitracina 75 mg/mL

Telurito de potasio 1%

Agar Mitis Salivarius MERC™

Caldo BHI MERC™

Agar-Agar Winkler

Sulfato de gentamicina US universal sulfato de 10 mg/mL

4.3.2 Bacterias

Bacterias aeróbicas

Nombre	Origen
<i>Escherichia coli</i>	Aislado clínico*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico*
<i>Bacillus cereus</i>	Aislado clínico*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aislado clínico*

Bacterias cariogénicas

Nombre	Origen
<i>Streptococcus mitis</i>	Aislado clínico*
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC
<i>Streptococcus salivarius</i>	Aislado clínico*
<i>Streptococcus oralis</i>	Aislado clínico*
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Aislado clínico*
<i>Lactobacillus spp.</i>	Aislado clínico*

Control negativo

Nombre	Origen
Candida albicans	Aislado clínico*

* Obtenidas de laboratorio de microbiología oral UNAB.

4.4 Preparación de medios de cultivos

4.4.1 Agar rocosa

Se pesaron 6 g y se agregó 100 mL de agua destilada. Se prepararon 100 mL según instrucciones del fabricante. Se autoclava a 121°C por 20 minutos.

4.4.2 Mitis/Salivarius:

Se prepararon 100 mL según instrucciones del fabricante (MERC™). Se autoclava a 121°C por 20 minutos. Luego se lleva a baño termostático a 50°C por 5 minutos. El medio se suplementa con 100 µL de Bacitracina 75 mg/mL y 100 µL de Telurito de potasio 1% (p/v).

4.4.3 BHI líquido:

Se preparan 100 mL según instrucciones del fabricante (MERC™). Se autoclava a 121°C por 20 minutos.

4.4.4 BHI sangre:

Se agregó 3,6 g de BHI más 1,5 gr de agar agar a 95 mL de agua destilada. Se autoclava a 121 °C por 20 minutos. Luego de bajar la temperatura a aproximadamente 50°C, el medio se suplementa con 5 mL de sangre.

4.4.5 Agar blando

Se preparan 100 mL con 0,8 g de Agar-Agar (Winkler™). Se autoclava a 121°C por 20 minutos.

4.5 Condiciones de cultivo

4.5.1 Lactobacillus:

Se cultivó en medio selectivo agar rogosa, en capnofilia (5% de CO₂) a 37°C por 3 días y en medio líquido BHI en capnofilia a 37°C por 2 días.

4.5.2 Mutans Streptococci:

Se cultivaron en medio selectivo Mitis Salivarius o BHI en capnofilia a 37°C por 3 días y en medio líquido BHI en capnofilia a 37°C por 2 días.

4.5.3 Bacterias aeróbicas:

Se cultivaron en medio básico nutritivo en condición aeróbica por 18-24 horas a 37°C.

Una vez estas crecen se toman azadas del cultivo y se resuspenden en 200 µL de BHI. Se agregan 7 mL de agar blando y se depositan sobre una placa de agar rogosa.

4.5.4 Mutans streptococci

El agar BHI se deja enfriar y se toman 5mL del medio líquido y se lleva a tubos de ensayo de 15 mL, a este tubo se le agregan 5 µL de las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*. Se lleva a capnofilia en estufa a 37°C. Se deja crecer por 3 días. Se toman 200 µL que se agregan a un tubo de ensayo de 15 mL y a ese mismo tubo se le agregan 7 mL de agar blando y esto se lleva a placa para posteriormente sembrar con *Streptococcus mutans* , *Streptococcus mitis* , *Streptococcus oralis* y *Streptococcus salivarius*.

4.6 Ensayo efecto antimicrobiano en agar blando

4.6.1 Lactobacillus

Se realizó una suspensión bacteriana en suero fisiológico desde cultivo sólido con un Mc Farland 3. Se agregó 700 µL de esta suspensión a 7 mL de agar blando. Esta mezcla se superpuso sobre una placa de agar rogosa. Sobre este

agar se realizó un primer ensayo para evaluar la sensibilidad al sulfato de gentamicina, en donde se aplicaron 20 μ L de sulfato de gentamicina, correspondientes a 1 mg del material y un segundo ensayo en donde se añaden las diferentes concentraciones de nanofibras (descritas en el punto 4.7) y se deja incubar por 2 días a 37°C en condición de capnofilia. Luego del periodo de incubación, se realizó la medición de los halos de inhibición.

4.6.2 Mutans Streptococci

Se realizó una suspensión bacteriana en suero fisiológico desde cultivo sólido con un Mc Farland 3. Se agregó 700 μ L de esta suspensión a 7 mL de agar blando. Esta mezcla se superpuso sobre una placa de agar mitis salivarius o en agar BHI-Sangre. Sobre este agar se realizó un primer ensayo para evaluar la sensibilidad al sulfato de Gentamicina, en donde se aplicaron 20 μ L de sulfato de Gentamicina correspondiente a 1 mg del material y un segundo ensayo en donde se añaden las diferentes concentraciones de nanofibras (descritas en el punto 4.7) y se deja incubar por 2 días a 37°C en condición de capnofilia. Luego del periodo de incubación, se realizó la medición de los halos de inhibición.

4.7 Efecto antimicrobiano de la matriz polimérica

Las cepas bacterianas se probaron en concentraciones sucesivas de nanofibras funcionalizadas con gentamicina más un control de nanofibras de PCL/PVA vacías a través de un método de difusión en agar blando. Se realizarán suspensiones del material de 4 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg, 0.25 mg y 0.1 mg del material más un control negativo con las nanofibras vacía, los cuales se dispensaran sobre las distintas placas con cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus spp.* Posteriormente se almacenaron en capnofilia a 37°C. Después de 48 y 72 horas se miden los halos de inhibición obtenidos con una regla numerada en milímetros.

5. Resultados

5.1 Síntesis de una matriz de PCL con coaxial de polivinil alcohol (PVA) y Gentamicina mediante *electrospinning*.

El material recolectado del *electrospinning* macroscópicamente presentaba un aspecto de polvo, de color blanco, sólido, no translúcido e inodoro (Figura 1).

Se utilizó microscopio electrónico para determinar la morfología de las nanofibras, a menor magnificación se observan estructuras laminares y en forma de hojarasca, lo que correspondería a conglomerados de polímero. Estos cuerpos presentan en sus terminaciones formas filamentosas (Figura 2). A medida que se aumento la magnificación se logran apreciar entramados de aspecto fibrilar (Figura 3), lo que se correlaciona con la estructura macroscópica. Cabe destacar que no se observan diferencias estructurales entre la matriz de PCL/PVA + Gentamicina y el material control de PCL/PVA.

5.1.1 Fotografía del material en aspecto macroscópico



Figura 1. Aspecto macroscópico del material una vez retirado del colector.

5.1.2 Fotografías del material a través de microscopía electrónica de barrido

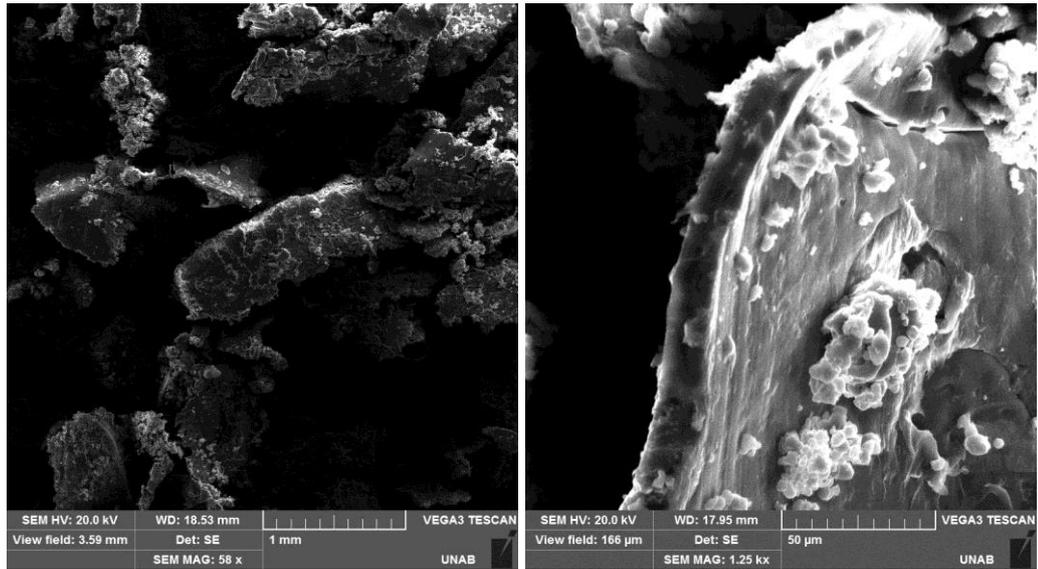


Figura 2. Nanofibras de PCL/PVA en escala de 1 mm (lado izquierdo) y en escala de 50 µm (lado derecho).

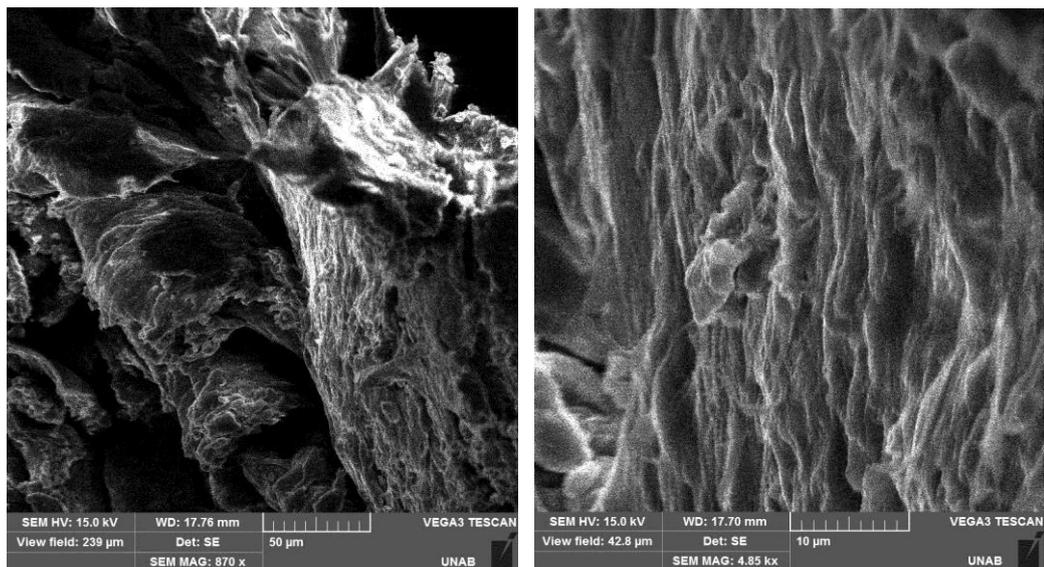


Figura 3. Nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina en escala de 50 µm (lado izquierdo) y en escala de 10 µm (lado derecho) .

5.2 Efecto antimicrobiano de la matriz

5.2.1 Bacterias aeróbicas

Tras realizar el ensayo de efecto antimicrobiano se puede observar que la matriz de PCL con coaxial de PVA y Gentamicina es activa sobre las cepas

aeróbicas, mientras que el material control de PCL/PVA se presenta inactivo sobre estas (Figuras 4, 5, 6 y 7). El efecto antimicrobiano de la matriz se evidencia a través del tamaño de los halos de inhibición los cuales fueron medidos y señalados en la Tabla 1.

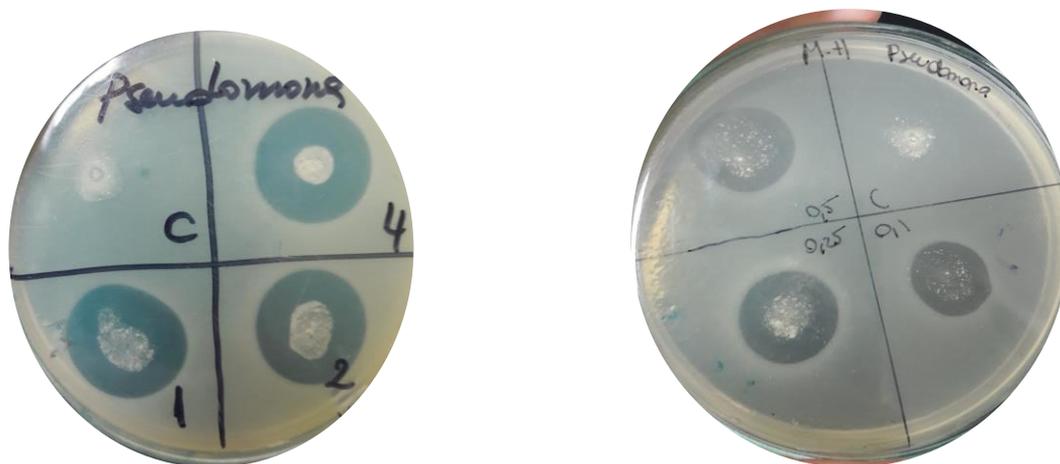


Figura 4. Siembra con agar blando de *Pseudomonas aeruginosa*, en A con 4, 2, 1 mg y en B 0.5, 0.25, y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.

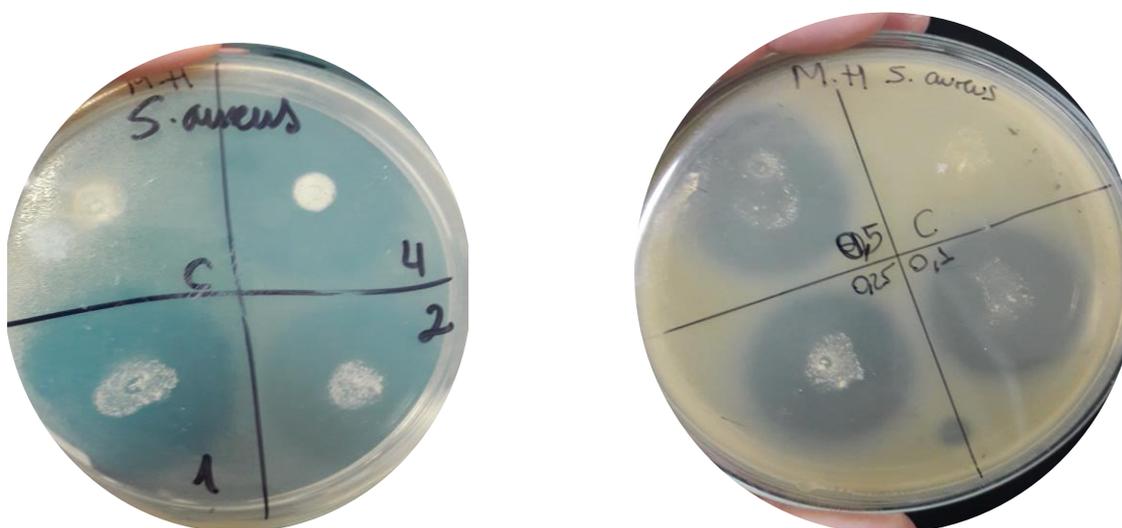


Figura 5. Siembra con agar blando de *Staphylococcus aureus*, en C con 4, 2, 1 mg y en D con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.

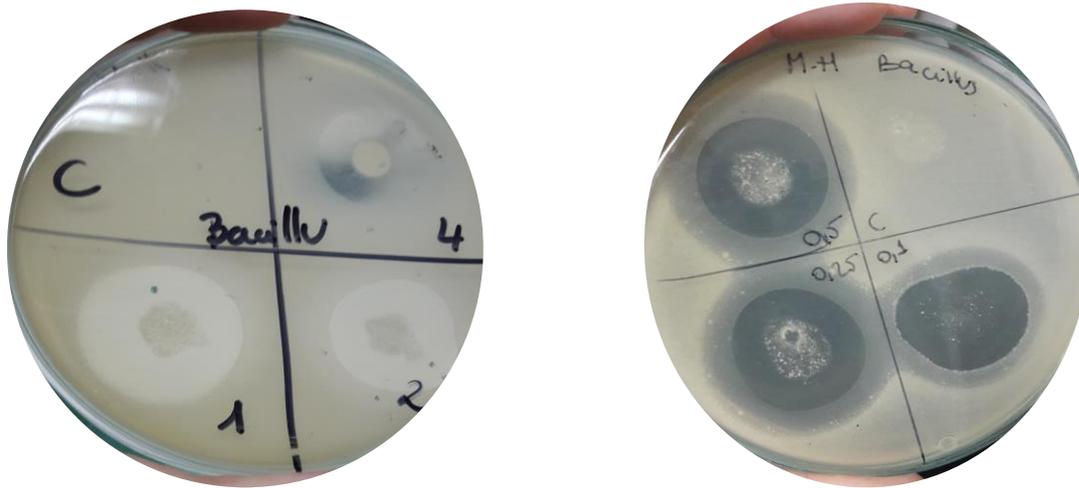


Figura 6. Siembra con agar blando de *Bacillus cereus*, en E con 4, 2, 1 mg y en F con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.

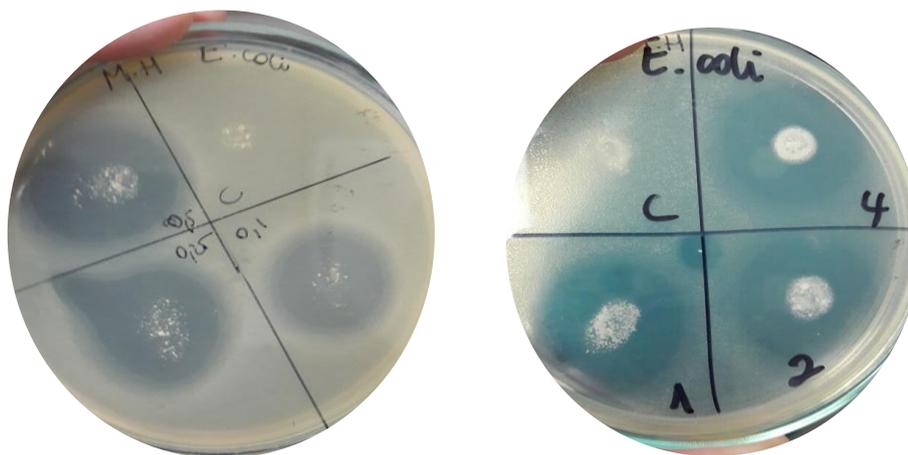


Figura 7. Siembra con agar blando de *Escherichia coli*, en G con 4, 2, 1 mg y en H con 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina. “C” corresponde al control PCL/PVA.

Tabla 1. Resultados de los halos en milímetros obtenidos de las diferentes concentraciones del material cargado con Gentamicina y un control en bacterias aeróbicas.

Bacteria	4mg	2mg	1mg	0.5mg	0.25 mg	0.1 mg
<i>P. aeruginosa</i>	25	24	22	19	20	16
<i>S. aureus</i>	35	34	36	26	27	26
<i>B. cereus</i>	20	25	27	25	24	23
<i>E.coli</i>	30	27	27	23	24	21

5.2.2 Bacterias cariogénicas

Tras realizar el ensayo de susceptibilidad al sulfato de Gentamicina, corroboramos lo esperado, que acorde a los halos de inhibición obtenidos y registrados en la tabla 2 , las bacterias cariogénicas eran sensibles a esta solución antibiótica.

Tabla 2. Resultados de los halos en milímetros obtenidos tras la aplicación de 20 µL de sulfato de Gentamicina en cepas cariogénicas.

Bacteria	Halos de inhibicion (mm)
<i>Streptococcus mutans</i>	19
<i>Streptococcus mitis</i>	16
<i>Streptococcus oralis</i>	27
<i>Streptococcus salivarius</i>	21
<i>Lactobacillus spp.</i>	26
<i>Lactobacillus paracasei</i>	24

Tras realizar el ensayo de efecto antimicrobiano se puede observar que la matriz de PCL con coaxial de PVA y Gentamicina es activa sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius* (Figuras 8 y 9) , sin embargo no presenta efecto sobre *Lactobacillus paracasei* (Figura 9). El efecto antimicrobiano de la matriz se evidencia a través del tamaño de halos de inhibición los cuales se registraron en la tabla 3.

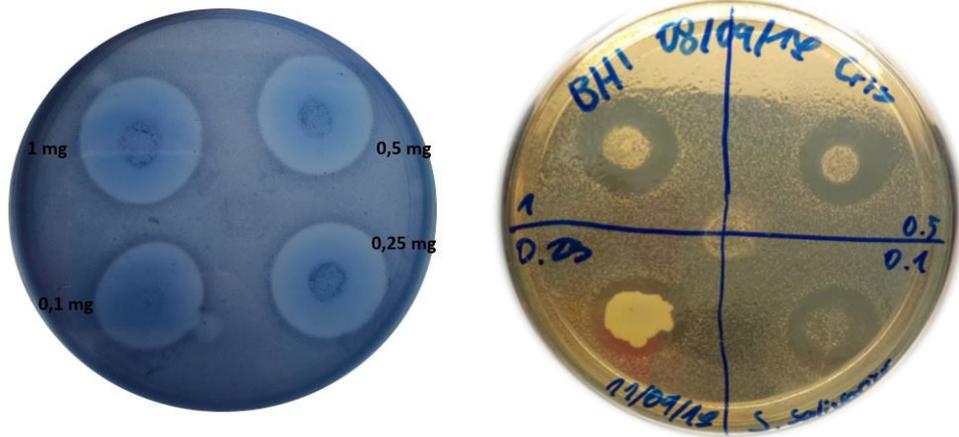


Figura 8. Siembra con agar Mitis salivarius de *Streptococcus mitis* con 1, 0.5, 0.25 y 0.01 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (izquierda). Siembra en BHI de *Streptococcus salivarius* con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (derecha).

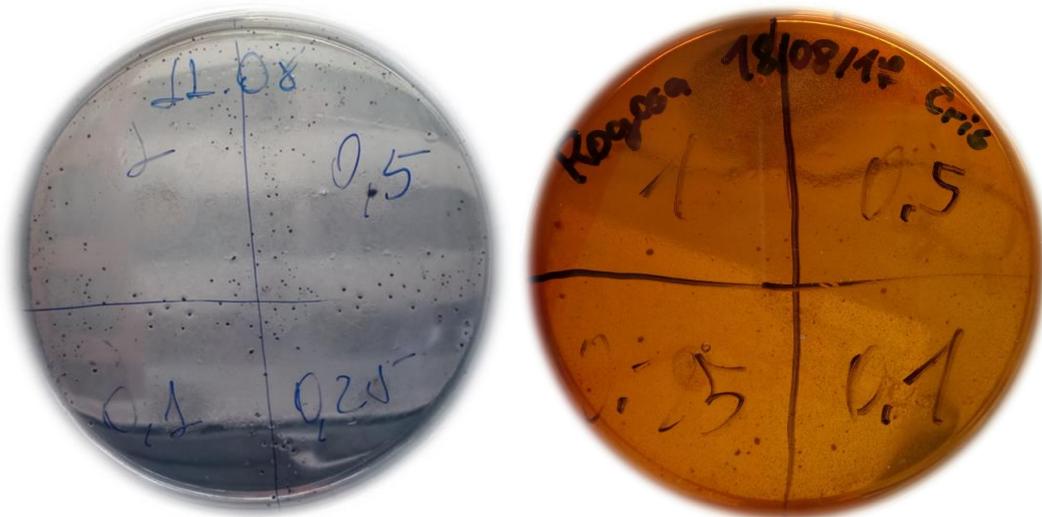


Figura 9. Siembra con agar Mitis Salivarius de *Streptococcus mutans* con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mg de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (izquierda). Siembra en agar Rogosa de *Lactobacillus paracasei* con 1, 0.5, 0.25 y 0.1 de nanofibras de PCL/PVA + Gentamicina (derecha).

Tabla 3. Resultados de los halos en milímetros obtenidos de las diferentes concentraciones del material cargado con Gentamicina y un control en cepas cariogénicas.

Bacteria	1mg	0,5mg	0,25 mg	0,1mg
<i>Streptococcus mutans</i>	36	34	31	28
<i>Streptococcus mitis</i>	25	25	24	23
<i>Streptococcus oralis</i>	20	18	18	17
<i>Streptococcus salivarius</i>	20	18	18	17
<i>Lactobacillus spp.</i>	0	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	0	0

6. Discusión

Dentro de las principales características que se buscan en los actuales materiales dentales encontramos la biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mecánicas favorables como elasticidad, resistencia a la compresión y flexibilidad. Estas características deseables se encuentran en un grupo de moléculas que genéricamente se denominan polímeros. Algunos de ellos pueden ser biocompatibles, biodegradables, etc. Además existen técnicas para la confección de matrices basadas en nanofibras que han sido de gran impacto, ya que son de fácil fabricación, presentan excelentes propiedades mecánicas y además pueden utilizarse en sistemas de liberación de biomoléculas terapéuticas de forma controlada. (47)

Algunos de los polímeros utilizados son el polietilenglicol (PEG) y una serie de poliésteres tales como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), la policaprolactona y sus copolímeros. Todos estos han demostrado tener buenos resultados en estudios respecto a regeneración periodontal, ósea y del complejo pulpodentinario. (37, 42, 47, 49)

Particularmente respecto a la policaprolactona se han descrito propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad térmica, estabilidad química y buenas propiedades mecánicas. Por otra parte permite que se puedan crear nanofibras de esta a través de *electrospinning* (técnica que describimos anteriormente) y estas han sido utilizada en estudios relacionados a regeneración de tejido óseo y pulpar. (37,42,49).

Los materiales de recubrimiento pulpar buscan actuar como una barrera protectora del órgano pulpar y además otorgar un efecto terapéutico. En virtud de esto decidimos inclinarnos por la policaprolactona como el polímero que haría el recubrimiento externo del material debido a que presenta una mejor resistencia mecánica y mayor rigidez en comparación a otros polímeros como PLGA o PHBV. Por otra parte buscamos que la liberación de la Gentamicina fuera sostenida en el tiempo, de modo de prolongar el efecto terapéutico(50). Esta cualidad nuevamente la encontramos en este polímero, ya que la degradación que sufre la PCL es lenta, permitiendo la liberación gradual del antibiótico. Además las fibras ultrafinas de este material al sintetizarse mediante *electrospinning* presentan excelentes propiedades como alta porosidad y gran área de contacto, lo cual conllevaría una distribución y difusión óptima entorno a la pulpa expuesta al material. (42)

Dado esto es que en esta tesis se planteó que un copolímero de policaprolactona/polivinilalcohol funcionalizado con Gentamicina podría tener futuras aplicaciones en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo, dadas las propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad de la PCL sumado al efecto antimicrobiano de la Gentamicina en cepas bacterianas cariogénicas se obtendría un material que liberaría fármacos en forma prolongada y en una concentración constante. Este material se sintetizo a través de *electrospinning* con coaxial en donde la aguja de menor calibre contenía la solución polimérica PVA/ Gentamicina y la aguja de mayor calibre contenía la PCL esto debido a que esta es insoluble, por lo que era imposible incorporar la Gentamicina en ella.

El material recolectado del *electrospinning* macroscópicamente presentaba un aspecto de polvo, de color blanco, sólido, no translúcido e inodoro.

Estas propiedades podrían ser ventajosas en su futuro uso clínico, además su síntesis es sencilla y se puede fraccionar fácilmente, esto hace pensar que se puede utilizar para la indicación clínica. Al reconstruirlo con agua el material toma un aspecto viscoso lo que lo haría ideal para el tratamiento de recubrimiento pulpar directo en pulpitis reversible.

Al utilizar el microscopio electrónico de barrido se observaron estructuras laminares y de entramado fibrilar las cuales corresponderían a conglomerados de polímero. Esta estructura se no se correlaciona con otras observadas al utilizar PCL como polímero base. Al comparar la foto obtenida por nosotros respecto a las obtenidas por Colmenares, Kalwar y Zhang (51,52,53) no se observan las mismas estructuras, a diferencia de nosotros, ellos observaron estructuras columnares separadas. Esto se debe a que el microscopio al cual tuvimos acceso no permitía llegar a magnificaciones sobre x 2000 como en el caso de los autores previamente citados. Además el aspecto de entramado fibrilar puede asociarse a la deshidratación que presenta el material en el tiempo, lo cual generaría que las fibras se fuesen juntando unas con otras.

Además, pudimos observar que el material no presentó diferencias estructurales entre la matriz de PCL/PVA + Gentamicina y el material control de PCL/PVA , lo cual indica que el antibiótico no es capaz de modificar la morfología del copolímero, a diferencia del estudio de Kamoki y cols. (34) en donde describieron que las nanofibras poliméricas funcionalizadas con antibiótico se observaban más pequeñas que las nanofibras control.

Se ha observado en la literatura que los sistemas de transporte de fármacos en base a nanotecnología son más eficaces que los sistemas convencionales (38, 39, 40) , especialmente los descritos en odontología (49).

Uno de los aspectos más importantes de las técnicas que generan nanofibras es que el polímero cargue el compuesto, pero además que mantenga su bioactividad. Para ello es necesario hacer ensayos para demostrar que la actividad antimicrobiana de la Gentamicina se mantenga.

Cabe destacar que, en general, en medicina se realizan ensayos en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureu*. En la literatura se ha descrito la presencia de *Escherichia coli* en el biofilm dental de forma circunstancial, sin

embargo, algunos estudios recientes de tipo metagenómicos han indicado la presencia de esta bacteria en la placa subgingival de pacientes con periodontitis. No obstante en situaciones in vivo, el sistema inmune del hospedero controla y previene el ciclo de colonización en los distintos sitios de la cavidad oral (54,55). Dicho esto, es que no es realmente útil basar el estudio en pruebas realizadas con *Escherichia coli* y por ende tiene mucha más significancia realizar las pruebas antimicrobianas en bacterias relacionadas directamente en la caries dental, como lo realizado en nuestro estudio, gracias a la colaboración del laboratorio de microbiología oral UNAB.

Cvikl y cols. (36) apostaron a la eficacia de la plata como agente antimicrobiano al funcionalizar andamios nanofabricados de PLGA (co-polymerpoly(lactic-co-glycolic acid) / ACP (Fosfato de calcio amorfo) con plata para posteriormente ser utilizado en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo y además que este material tenga la capacidad de regenerar las células de la pulpa, lamentablemente el material que ellos fabricaron resulto ser tóxico debido a que ocuparon altas concentraciones de plata. Con respecto al efecto antimicrobiano se apostó a que la plata tenía un efecto bactericida pero no se realizó un estudio previo solamente con plata para demostrar esta teoría. A diferencia de nuestro estudio en donde si se tomó la precaución de realizar un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con sulfato de Gentamicina, para evaluar en primera instancia si efectivamente este antibiótico tenía efecto sobre las principales bacterias involucradas en la caries dental.

Otra alternativa es directamente la utilización de antibióticos como agente antimicrobiano, Kamocki y cols. (34) utilizaron antibióticos al igual que nosotros, pues al utilizarlos su efecto y su uso es más controlado, reconocido y estable en el tiempo. Aunque pueden presentar limitaciones respecto a la dosis y el tiempo de liberación, lo que en nuestro caso fue exitoso.

Al correlacionar el halo con Gentamicina sola podemos concluir que no se inactivo el fármaco y que hay encapsulación y la liberación de Gentamicina bioactiva, ya que a muy bajas concentraciones tenía efecto antimicrobiano, a diferencia del material control (PCL/PVA) que según lo esperado no presentó efecto.

Dentro de los ensayos realizados se ocupó una batería de bacterias involucradas en infecciones nosocomiales (Fig. 4 a 7), donde todas las bacterias se mostraron sensibles al material acorde a los halos de inhibición registrados en la Tabla 1. Este resultado es relevante ya que este material podría tener un posible uso en otras aplicaciones en el área de la salud.

Además se probó en una batería de bacterias involucradas en la caries dental, en donde la mayoría de las bacterias se presentaron sensibles al material (Fig. 8 a 9) esto basado en los halos de inhibición registrados en la tabla 2 , excepto en *Lactobacillus spp.* y *Lactobacillus paracasei* , bacterias protagonistas en la caries dentinaria profunda donde el material no presentó efecto alguno, creemos que esto se puede atribuir a un error experimental.

Posibles usos futuros del material

El conjunto de los resultados indica que este copolímero podría tener una aplicación clínica en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo en pulpitis reversible.

Considerando que en la literatura disponible existe poca evidencia respecto a la confección de materiales de recubrimiento pulpar directo mediante nanotecnología y la dificultad asociada a la obtención de recursos para desarrollar investigación en ello, es que creemos que este estudio sienta un precedente en esta innovadora línea de investigación.

Dada la naturaleza del trabajo, el estudio se debe continuar para aumentar el N y con ello darle mayor soporte experimental al estudio, y así realizar ensayos de liberación (UPLC), pruebas de toxicidad en células pulpares y posteriormente ensayos clínicos.

Para finalizar cabe destacar que el presente estudio se realizó con un número limitado de muestras de material, por lo que en un futuro, se replicara el estudio aumentando la muestra, en busca de resultados más representativos de esta, es importante recalcar que este estudio corresponde a una etapa inicial en la confección de un material en base a nanotecnología para ser utilizado en el tratamiento de recubrimiento pulpar directo.

7.Referencias bibliográficas

- 1.- Fejerskov, O., Nyvad, B. and Kidd, E. (2008). *Dental caries*. 2nd ed. UK: Blackwell Munksgaard.
- 2.-OMS. Nota Informativa No. 318 febrero. 2007
- 3.- Marshall M. Short-term effectiveness of topical application of gentamicin and betamethasone in direct pulp capping in teeth with reversible pulpitis with clinically penetrating decay. *Revista dental de Chile* 2011; 102 (3): 17-23
- 4.- MINSAL. Análisis de situación dental. 2010
- 5.-González Christian, Garrocho Arturo. “Eficacia de tres tratamientos para la remineralización de la lesión incipiente de caries o mancha blanca en pacientes con ortodoncia”. *Revista mexicana de odontología clínica* .Año 2 nº 12. (2009).
- 6.- Tiznado G., Reyes – Gasga J “Análisis estructural del esmalte y dentina cariados” Facultad de odontología UNAM, México DF. 2012
- 7.- Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of a novel scaffold of clotrimazole-microemulsion-containing nanofibers using an electrospinning process for oral candidiasis applications. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces* [serial on the Internet]. (2015, Feb 1);; 12618-25. Available from: ScienceDirect.
- 8.- MINSAL. II Encuesta de calidad de vida y salud. Chile 2006
- 9.- Swarup SJ, Rao A, Boaz K, Srikant N, Shenoy R. Pulpal response to nano hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide when used as a direct pulp capping agent: an in vivo study. *J Clin Pediatr Dent*. 2014; 38(3):201–6. PMID: 25095313

10.- Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent*. 2009; 34 (5):615–25. doi: 10.2341/09-132-0 PMID: 19830978

11.- Foreman PC, Barnes IE. Review of calcium hydroxide. *International endodontic journal*. 1990; 23 (6):283–97. PMID: 2098345

12.- Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010; 36(3):400–13. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.009 PMID: 20171353

13.- Briso AL, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan E Junior. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res*. 2006; 20(3) 219–25. PMID: 17119704

14.- Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod*. 2006; 32(3):193–7. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.043 PMID: 16500224

15.-Hilton T, Ferracane J, Mancl L. Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *Journal Of Dental Research* (2013, July), 92(7 Suppl): 16S-22S. Available from: MEDLINE Complete.

16.- Sultana N, Wang M. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation. *Biofabrication* [serial on the Internet]. (2012, Mar), 4(1): 015003. Available from: MEDLINE Complete.

17.- Sultana N, Wang M. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. *Journal Of Materials Science. Materials In Medicine* [serial on the Internet]. (2008, July), 19(7): 2555-2561. Available from: MEDLINE Complete.

- 18.- Ten Cate , Oral Histology , 8TH edition USA; Elsevier , 2008
- 19.- Neville. Oral and Maxillofacial Pathology. 4th ed. USA: Elsevier; 2016.
- 20.- Dabuleanu M. Pulpitis (Reversible/Irreversible). Journal Of The Canadian Dental Association [serial on the Internet]. (2013, Sep),79(4): 1. Available from: Supplemental Index.
- 21.- Ricucci D, Loghin S, Siqueira J. Clinical Research: Correlation between Clinical and Histologic Pulp Diagnoses. Journal Of Endodontics [serial on the Internet]. (2014, Dec 1),401932-1939. Available from: ScienceDirect.
- 22.- Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. Journal Of Clinical Microbiology JCM [serial on the Internet]. (2008) (4): Available from: AGRIS.
- 23.- Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. Oral Microbiol Immunol. 1993; 8: 172–6.
- 24.- Hoshino E, Kurihara-Ando N. In vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocyclina. Int Endod J. 1996; 29: 125-30.
- 25.- Gomes-Filho JE, Duarte PC, De Oliveira CB, Watanabe S, Simonetti Lodi C, Ângelo Cintra L, Estrada Bernabé PF. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of non vital immature permanent teeth. J Endod. 2012; 38: 91-4.
- 26.- American association of endodontists glossary Ninth Edition. 2016

27.- Aguilar P, Linsuwanont P. Review Article: Vital Pulp Therapy in Vital Permanent Teeth with Cariously Exposed Pulp: A Systematic Review. Journal Of Endodontics [serial on the Internet]. (2011, Jan 1); 37581-587. Available from: ScienceDirect.

28.- AlShwaimi E, Majeed A, Ali A. Pulpal response to direct capping with Betamethasone/Gentamicin Cream and Mineral Trioxide Aggregate: Histologic and Micro-Computed Tomography Assessments. Journal Of Endodontics (2016,Jan),42(1): 30

29.- Poveda-Roda R, Bagan JV, Sanchis-Bielsa JM, Carbonell-Pastor E. Antibiotic use in dental practice. A review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2007;12E186-92

30.- Thomas M, Metoki N, Mandler D, Eliaz N. In Situ Potentiostatic Deposition of Calcium Phosphate with Gentamicin-Loaded Chitosan Nanoparticles on Titanium Alloy Surface. Electrochimica Acta (2016,Dec 20),222355-360. Available from: ScienceDirect

31.- Lee D, Yun Y, Park K, Kim S. Original Full Length Article: Gentamicin and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-delivering heparinized-titanium implant with enhanced antibacterial activity and osteointegration. Bone (2012, Apr 1), 50974-982. Available from: ScienceDirect.

32.- Kang C, Kim S, Kim S, Lee J, Lee J, Lee J, et al. Antibacterial cotton fibers treated with silver nanoparticles and quaternary ammonium salts. Carbohydrate Polymers [serial on the Internet]. (2016, Oct 20),1511012-1018. Available from: ScienceDirect.

33.- Li F, Liu X, Zhao S, Wu H, Xu H. Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- β 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. Dental Materials: Official Publication Of The Academy Of Dental Materials [serial on the Internet]. (2014, Feb),30(2): 172-181. Available from: MEDLINE Complete.

34.-Kamocki K, Nör J, Bottino M. Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. *International Endodontic Journal* [serial on the Internet]. (2015, Dec),48(12): 1147-1156. Available from: MEDLINE Complete.

35.-Yu T, Jiang T, Wei Q, Li Y, Kaplan D. [Wound healing effects of silk fibroin-bone morphogenetic protein-2 scaffolds on inflammatory pulp in rats]. *Beijing Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal Of Peking University. Health Sciences* [serial on the Internet]. (2015, Oct 18), 47(5): 814-819. Available from: MEDLINE Complete.

36.-Cvikl B, Hess S, Miron R, Agis H, Bosshardt D, Lussi A, et al. Response of human dental pulp cells to a silver-containing PLGA/TCP-nanofabric as a potential antibacterial regenerative pulp-capping material. *BMC Oral Health* [serial on the Internet]. (2017, Feb 27),17(1): 57. Available from: MEDLINE Complete.

37.- Lee W, Oh J, Park J, Shin H, Baek J , Woo K, et al. Performance of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fiber meshes used with mineral trioxide aggregates in a pulp capping procedure. *Acta Biomaterialia* (2012, Aug 1), 82986-2995. Available from: ScienceDirect.

38.- Vilos C, Gutiérrez M, Escobar R, Morales F, Denardin J, Altbir D, et al. Superparamagnetic Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) nanoparticles for biomedical applications. *Electronic Journal Of Biotechnology* [serial on the Internet]. (2013, Sep); 16(5): 1-10. Available from: Academic Search Ultimate.

39.- Vilos C, Morales F, Solar P, Herrera N, Gonzalez-Nilo F, Velasquez L, et al. Paclitaxel-PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells. *Biomaterials* [serial on the Internet]. (2013, May 1), 344098-4108. Available from: ScienceDirect.

40.- Vilos C, Constandil L, Rodas P, Cantin M, Zepeda K, Velasquez L, et al. Evaluation of ceftiofur-PHBV microparticles in rats. *Drug Design, Development And Therapy* [serial on the Internet]. (2014, May 29), 8651-666. Available from: MEDLINE Complete.

41.- McClellan P, Landis WJ. Recent applications of coaxial and emulsion electrospinning methods in the field of tissue engineering *BioResearch Open Access* 5:1, 212-227, DOI: 10.1089/biores.2016.0022.

42.-Suwantong O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polymers For Advanced Technologies*. (2016, Oct);27(10):1264.Available from:Complementary Index.

43.-Seo S, Kim H, Lee J. Electrospun Nanofibers Applications in Dentistry. *Journal of Nanomaterials* (2016, May 8); 1-7. Available from: Academic Search Ultimate.

44.- Qu H, Guo Z, Wei S. Coaxial electrospun nanostructures and their applications. *Journal Of Materials Chemistry A* [serial on the Internet]. (2013, Oct 14); 1(38): 11513-11528. Available from: Scopus®.

45.- Manfred L. Hallensleben "Polyvinyl Compounds, Others" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000, Wiley-VCH, Weinheim.

46.- Hussain R, Tabassum S, Gilani M, Ahmed E, Sharif A, Siddiqi S, et al. In situ synthesis of mesoporous polyvinyl alcohol/hydroxyapatite composites for better biomedical coating adhesion. *Applied Surface Science* [serial on the Internet]. (2016, Feb 28); 364117-123. Available from: ScienceDirect.

47.- Swain S, Bhattacharyya S, Sarkar D. Fabrication of porous hydroxyapatite scaffold via polyethylene glycol-polyvinyl alcohol hydrogel state. *Materials Research Bulletin* [serial on the Internet]. (2015, Apr 1); 64257-261. Available from: ScienceDirect.

48.- Padovani G, Feitosa V, Sauro S, Tay F, Durán G, Paula A et al. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. Trends in Biotechnology. 2015;33(11):621-636.

49.- In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds.

50.-Saéz V. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS. Revista iberoamericana de polímeros. 2002;3:11.

51.-Colmenares-Roldán G, Quintero-Martínez Y, Agudelo-Gómez L, Rodríguez-Vinasco L, Hoyos-Palacio L. Influence of the molecular weight of polymer, solvents and operational condition in the electrospinning of polycaprolactone. Revista Facultad De Ingenieria Universidad De Antioquia [serial on the Internet]. (2017, Sep); (84): 33-45. Available from: Fuente Académica Plus.

52.-Kalwar K, Sun W, Li D, Zhang X, Shan D. Coaxial electrospinning of polycaprolactone/chitosan: Characterization and silver nanoparticles incorporation for antibacterial activity. Reactive And Functional Polymers [serial on the Internet]. (2016, Oct 1); 10787-92. Available from: ScienceDirect.

53.-Zhang Q, Lv S, Lu J, Jiang S, Lin L. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. International Journal Of Biological Macromolecules [serial on the Internet]. (2015, May 1); 7694-101. Available from: ScienceDirect.

54.- Thurnheer T, Belibasakis G. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. Virulence (2015)

55.- Pérez-Chaparro P, Gonçalves C, Figueiredo L, Favari M, Lobão E, Feres M, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *Journal Of Dental Research* (2014, Sep), 93(9): 846-858. Available from: MEDLINE Complete.