



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA



DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

**Detección de genes relacionados con resistencia a
nanopartículas de plata en bacterias de infecciones
endodónticas secundarias.**

TESIS QUE PRESENTA
M.C. MARCO FELIPE SALAS OROZCO

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

DIRECTOR DE TESIS
Dra. NEREYDA NINO MARTINEZ

SAN LUIS POTOSI, S.L.P. JULIO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Detección de genes relacionados con resistencia a nanopartículas de plata en bacterias de infecciones endodónticas secundarias.

TESIS QUE PRESENTA

M.C. MARCO FELIPE SALAS OROZCO

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. NEREYDA NINO MARTINEZ

ASESORES DE TESIS

GABRIEL ALEJANDRO MARTINEZ CASTAÑÓN, MSc, PhD.

FERNANDO TORRES MENDEZ, DDS, MSc, PhD.

FACUNDO RUIZ, MSc, PhD.



Detección de genes relacionados con resistencia a nanopartículas de plata en bacterias de infecciones endodónticas secundarias. por Marco Felipe Salas Orozco se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

DEDICATORIA

A mi padre Marcos Salas Camacho, que es mi ejemplo de constancia y dedicación.

A mi madre Ma. Griselda Orozco Torres, que es mi fortaleza e inspiración diaria.

Resumen

Introducción. Las nanopartículas de plata se utilizan en endodoncia por su actividad antimicrobiana, aunque se considera que las bacterias son incapaces de desarrollar resistencia a las nanopartículas de plata. Los genes de resistencia a la plata se han relacionado con la resistencia a nanopartículas y antibióticos. La presencia de estos genes de resistencia no se ha estudiado en bacterias endodónticas. El objetivo de este estudio es informar la prevalencia de genes de resistencia a la plata en bacterias endodónticas.

Métodos. Los dientes seleccionados se aislaron mediante un dique de goma y se eliminó cualquier restauración, poste o caries. Se desinfectó el campo operatorio y se eliminó el material de obturación radicular. Las muestras se obtuvieron utilizando tres puntos de papel estériles para absorber el líquido del conducto radicular. Se extrajo el ADN de las muestras y del organismo de control, y la detección de los genes de resistencia a silCBA se realizó mediante PCR.

Resultados. Los resultados de este estudio muestran una alta prevalencia (73,3%) de genes de resistencia a la plata silCBA. Se utilizó el coeficiente de correlación de rango de Spearman para identificar correlaciones entre la presencia de genes y variables clínicas.

Conclusiones. Este estudio reporta una alta frecuencia de genes de resistencia a la plata relacionados con nanopartículas resistentes a bacterias.

Palabras claves: nanopartículas, bacterias, resistencia, infección endodóntica secundaria

Abstract

Introduction. Silver nanoparticles are used in endodontics due to their antimicrobial activity, although it is considered that bacteria are unable to develop resistance to silver nanoparticles. Silver resistance genes have been related to resistance to nanoparticles and antibiotics. The presence of these resistance genes has not been studied in endodontic bacteria. The objective of this study is to report the prevalence of silver resistance genes in endodontic bacteria.

Methods. The selected teeth were isolated using a rubber dam and any restoration, post, or caries was eliminated. The operative field was disinfected, and the root-filling material was removed. The samples were obtained using three sterile paper points to absorb the fluid of the root canal. The DNA from the samples and the control organism was extracted, and the detection of the *silCBA* resistance genes was carried out by PCR.

Results. The results of this study show a high prevalence (73.3%) of *silCBA* silver resistance genes. The Spearman rank correlation coefficient was utilized to identify correlations between the presence of genes and clinical variables.

Conclusions. This study reports a high frequency of silver resistance genes related to nanoparticle resistant from bacteria.

Keywords: nanoparticles, bacteria, resistance, secondary endodontic infection

INDICE

	Página
1.Producción académica durante el Doctorado en Ciencias Odontológicas	7
1.1 Participación en curso y congresos nacionales e internacionales	8
1.2 Ponencias y memorias	9
1.3 Premios y distinciones	10
1.4 Estancias Académicas	11
1.5 Cursos y certificaciones	12
1.6 Publicación de artículos	15
1.6.1 Artículos publicados en revistas indexadas y con factor de impacto	15
1.6.2 Artículos publicados en revistas indexadas	15
1.6.3 Artículos publicados en revistas de divulgación	15
1.7 Docencia frente a grupo	16
2. Presentación del trabajo de tesis	17
2.1 Introducción	18
2.2 Materiales y Métodos	19
2.3 Resultados	22
2.3 Figura 1	23
2.5 Tabla 1	24
2.6 Tabla 2	25
2.7 Discusión	26
2.8 Conclusión	30
2.9 Referencias	32
3. Agradecimientos personales	36
4. Agradecimientos Académicos	37

**PRODUCCIÓN ACADÉMICA DURANTE EL DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

LISTA DE PRODUCCIÓN ACADÉMICA	<i>Total</i>
<i>Participación en congresos nacionales e internacionales</i>	8
<i>Ponencias y memorias</i>	5
<i>Premios y distinciones</i>	5
<i>Estancias académicas</i>	1
<i>Cursos y certificaciones</i>	40
<i>Publicación de artículos</i>	7
<i>Docencia frente a grupo (materias)</i>	1

Participación en congresos nacionales e internacionales

1. XXXVIII Congreso Internacional AMEAC realizado en la Ciudad de México del 18 al 20 de Octubre 2018.
2. Congreso Internacional de Posgrados celebrado del 09 al 11 de noviembre de 2017.
3. Reconocimiento por la asistencia a la ponencia “Reafirmando los valores Generales y Académicos” organizado por la Secretaría Escolar y el Doctorado en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Estomatología”.
4. Constancia por asistencia a la conferencia “Actualidades de la cirugía periodontal estética y regenerativa”.
5. Constancia por asistencia a las conferencias magistrales del 4to Simposio Potosino de Investigación en Ciencias de Materiales llevado a cabo en las Instalaciones del IPICYT.
6. Constancia de asistencia al XXVIII International Materials Research Congress.
7. Constancia de participación en el 5to Simposio Potosino de Investigación en Ciencia de Materiales.
8. Constancia por Asistencia al XXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología.

Ponencias y memorias

1. Constancia de participación en el curso de Metodología de la Investigación con el tema “Redacción de Artículos Científicos”, los días 14 y 21 de marzo de 2019.
2. Constancia de participación en el curso de Metodología de la Investigación con el tema “Redacción de Artículos Científicos”, el mes de junio de 2018.
3. Reconocimiento por la presentación oral del tema: “Enterococcus Faecalis resistente a nanopartículas de plata”, durante el marco del XXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología.
4. Reconocimiento por participación en el concurso de exhibición de Carteles de Proyectos de Investigación de Estudiantes de Posgrado de la UASLP, con el proyecto “Alta prevalencia de genes de resistencia a plata (silCBA) en bacterias de infección endodóntica secundaria y desarrollo de resistencia a nanopartículas de plata por bacterias endodónticas.
5. Certificado de participación en modalidad cartel, con el tema “Genes relacionados con la resistencia a nanopartículas de en bacterias endodónticas”, en el grupo de Materials for Health Applications: Biomedical Implants, Biomaterials, Therapeutics and Cosmetics Symposium at the XXVIII International Materials Research Congress.

Premios y distinciones

- 1. 2do lugar en la categoría de Ciencia Básica en Doctorado, Exposición Virtual.** “ENTEROCOCCUS FAECALIS RESISTENTE A NANO PARTÍCULAS DE PLATA”. Universidad Autónoma del Estado de México, Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología. XXXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología, ENIO 2020. **Marco Felipe Salas Orozco**, Nereyda Niño-Martínez, Gabriel-Alejandro Martínez-Castañón, Fernando Torres Méndez, y Facundo Ruiz.
- 2. 1er lugar en la categoría de Epidemiología. Modalidad Exposición Virtual.** “PRÁCTICA ODONTOLÓGICA Y SUS MODIFICACIONES ANTE EL COVID-19 EN MÉXICO: UN ESTUDIO DE ENCUESTA”. Universidad Autónoma del Estado de México, Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología. XXXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología, ENIO 2020. María Fernanda García Vega, Miguel Ángel Casillas Santana, **Marco Felipe Salas Orozco**, Laura Mónica López Pérez Franco, Nuria Patiño Marín, Alan Martínez Zumaran.
- 3. Asignación beca mixta para estancia de investigación internacional en The University of British Columbia, Vancouver, Canadá.** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 2019.
- 4. 2do Lugar en el Concurso de Carteles.** “Prevalencia de genes de resistencia a plata en bacterias de dientes con infección endodóntica secundaria y resistencia a nanopartículas de plata por bacterias endodónticas”. XXXVIII Congreso Internacional AMEAC.
- 5. Candidato a Investigador Nacional** por parte de CONACYT

Estancias Académicas

1. The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, Jack Bell Research Centre
IIRC Proteomic and Antibody Engineering Facility
Responsable: Horacio Bach, PhD.
Duración: 1ro de septiembre al 31 de noviembre de 2019.

Cursos y certificaciones

- 1) **Curso/Taller:** CERTIFICATE of ACHIEVEMENT to certify that **Marco Felipe Salas Orozco** successfully completed and received a passing grade in **7.28.1x: Molecular Biology – DNA Replication and Repair**. **Institución:** *Massachusetts Institute of Technology*. **Lugar y Fecha:** 1 de junio de 2017.
- 2) **Curso/Taller:** Asistencia a las ponencias “Reafirmando los valores Generales y Académicos”. **Institución:** Secretaría Escolar y Doctorado en Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** 20 de septiembre de 2017.
- 3) **Curso/Taller:** Asistencia al Congreso Internacional de Posgrados. **Institución:** Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** del 09 al 11 de noviembre de 2017.
- 4) **Curso/Taller:** Asistencia al Concurso de Investigación en Estomatología, Modalidad Cartel **Institución:** Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** del 09 al 11 de noviembre de 2017.
- 5) **Curso/Taller:** Colaboración en el Concurso de Investigación en Estomatología, Modalidad Cartel. **Institución:** Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** del 09 al 11 de noviembre de 2017.
- 6) **Curso/Taller:** CERTIFICATE of ACHIEVEMENT to certify that **Marco Felipe Salas Orozco** successfully completed and received a passing grade in **MED101x: Introduction to Applied Biostatistics**. **Institución:** OsakaUx, an online learning initiative of Osaka University through edX. **Lugar y Fecha:** 5 de enero de 2018.
- 7) **Curso/Taller:** Asistencia como compañero tutor de la 1ra. Feria de Posgrados. **Institución:** Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** 18 de mayo de 2018
- 8) **Curso/Taller:** Asistencia a la Conferencia mesa-clínica “Instrumentación con el sistema V-taper”. **Institución:** Maestría en Endodoncia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** 22 de junio de 2018. **Horas:** 4
- 9) **Curso/Taller:** Asistencia a la Conferencia mesa-clínica “Blanqueamiento dental”. **Institución:** Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. **Lugar y Fecha:** 5 de octubre de 2018. **Horas:** 4
- 10) **Curso/Taller:** Asistencia al XXXVIII Congreso Internacional AMEAC. **Institución:** Academia Mexicana de Endodoncia A.C. **Lugar y Fecha:** 18-20 de octubre de 2018. **Horas:** 15
- 11) **Curso/Taller:** Constancia como miembro activo del capítulo estudiantil IPICYT-SMM. **Institución:** La Sociedad Mexicana de Materiales A.C. **Lugar y Fecha:** septiembre de 2017 – agosto de 2018
- 12) **Curso/Taller:** COURSE CERTIFICATE that Marco Felipe Salas Orozco has successfully completed Nanotechnology: A Maker’s Course an online non-credit course. **Institución:** course authorized by Duke University, North Carolina State University and The

University of North Carolina at Chapel Hill and offered through Coursera. **Lugar y Fecha:** 2018

- 13) **Curso/Taller:** COURSE CERTIFICATE that Marco Felipe Salas Orozco has successfully completed Writing in the Sciences an online non-credit course. **Institución:** Course authorized by Stanford University and offered through Coursera. **Lugar y Fecha:** 2018.
- 14) **Curso/Taller:** COURSE CERTIFICATE that Marco Felipe Salas Orozco has successfully completed antimicrobial resistance – theory and methods an online non-credit course. **Institución:** Course authorized by Technical University of Denmark and offered through Coursera. **Lugar y Fecha:** 26 de noviembre de 2018.
- 15) Certificate “Introduction to laboratory safety course”, **Institución:** University of British Columbia, Vancouver, Canada, September 7, 2019.
- 16) **Curso/Taller:** Certificate “Preventing and addressing workplace bullying and harassment”, **Institución:** University of British Columbia, Vancouver, Canada, September 4, 2019.
- 17) **Curso/Taller:** Certificate “Biological safety course”, **Institución:** University of British Columbia, **Lugar y Fecha:** Vancouver, Canadá, September 24, 2019.
- 18) **Curso/Taller:** Certificate “Chemical safety course”, **Institución:** University of British Columbia, **Lugar y Fecha:** Vancouver, Canada, September 26, 2019.
- 19) **Curso/Taller:** Certificate “Work Place Violence Prevention Training”, **Institución:** University of British Columbia, **Lugar y Fecha:** Vancouver, Canada, September 25, 2019.
- 20) **Curso/Taller:** CERTIFICATE of ACHIEVEMENT to certify that **Marco Felipe Salas Orozco** successfully completed and received a passing grade in **ANATOMY403.1X: Anatomy: Musculoskeletal and Integumentary Systems**. **Institución:** University of Michigan. **Lugar y Fecha:** 17 junio de 2019.
- 21) **Curso/Taller:** Todo sobre la prevención del COVID-19. **Institución:** Instituto Mexicano del Seguro Social. **Lugar y Fecha:** 7 de julio del 2020. **Horas:** 3
- 22) **Curso/Taller:** Multidrug-Resistant organisms: Improving time to effective treatment. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 27 de enero de 2020.
- 23) **Curso/Taller:** CERTIFICATE of ACHIEVEMENT to certify that **Marco Felipe Salas Orozco** successfully completed and received a passing grade in **PH125.1X: Data Science: R basics**. **Institución:** HarvardX. **Lugar y Fecha:** 19 de julio 2020.
- 24) **Curso/Taller:** CERTIFICATE of ACHIEVEMENT to certify that **Marco Felipe Salas Orozco** successfully completed and received a passing grade in **PH125.2X: Data Science: Visualization**. **Institución:** HarvardX. **Lugar y Fecha:** 9 de septiembre 2020.

- 25) **Curso/Taller:** Recomendaciones para escribir un artículo científico. **Institución:** CONRICYT. **Lugar y Fecha:** 22 de septiembre del 2020.
- 26) **Curso/Taller:** Pipetting Academy – Best Pipetting Practices in qPCR. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 4 de noviembre del 2020.
- 27) **Curso/Taller:** Multiplex immunostaining: Is it ready for clinical practice. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 4 de noviembre del 2020.
- 28) **Curso/Taller:** Microbiology and stewardship: Understanding AST data as driver of antimicrobial stewardship. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 4 de noviembre del 2020.
- 29) **Curso/Taller:** Grammar and Punctuation. **Institución:** University of California, Irvine. **Lugar y Fecha:** 3 de octubre del 2020.
- 30) **Curso/Taller:** Overcoming Challenges In the Real-time PCR workflow – A practical troubleshooting guide. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 4 de octubre de 2018.
- 31) **Curso/Taller:** A new approach for DNA/RNA sample assessment using nanodrop one. **Institución:** SelectScience. **Lugar y Fecha:** 27 de julio de 2018.
- 32) **Curso/Taller:** Creación de objetos virtuales de aprendizaje. **Institución:** Centro Nacional de actualización docente. **Lugar y Fecha:** 1 al 5 de febrero de 2021. **Horas: 40.**
- 33) **Curso/Taller:** Introducción a Camtasia: Creación de videos educativos. **Institución:** Centro Nacional de actualización docente. **Lugar y Fecha:** 18 al 29 de enero de 2021. **Horas: 40.**
- 34) **Curso/Taller:** Estructura de un CV. **Institución:** Capacitate para el empleo, Fundación Carlos Slim. **Lugar y Fecha:** 27 de febrero de 2021.
- 35) **Curso/Taller:** Habilidades digitales para la docencia. **Institución:** PruebaT, Fundación Carlos Slim. **Lugar y Fecha:** 1 de marzo de 2021.
- 36) **Curso/Taller:** Convivencia escolar desde la perspectiva de los derechos humanos. **Institución:** Comisión Nacional de los derechos humanos. **Lugar y Fecha:** 2 al 29 de marzo de 2020.
- 37) **Curso/Taller:** Convivencia escolar desde la perspectiva de los derechos humanos. **Institución:** Comisión Nacional de los derechos humanos. **Lugar y Fecha:** 2 al 29 de marzo de 2020.
- 38) **Curso/Taller:** Aprenda a construir búsquedas de información más efectivas – nivel básico. **Institución:** CONRICYT. **Lugar y Fecha:** 24 de marzo 2021.
- 39) **Curso/Taller:** How to learn online. **Institución:** Edx. **Lugar y Fecha:** 17 de abril 2020.
- 40) **Curso/Taller:** How to write a scientific article. **Institución:** Adwebinars Springernature. **Lugar y Fecha:** 7 de abril de 2021.

Publicación de Artículos

En revistas indexadas con factor de impacto

1. Salas-Orozco, M. F., Martínez, N. N., Martínez-Castañón, G. A., Méndez, F. T., Patiño-Marín, N., & Ruiz, F. (2019). Detection of Genes Related to Resistance to Silver Nanoparticles in Bacteria from Secondary Endodontic Infections. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
2. Salas-Orozco, M., Niño-Martínez, N., Martínez-Castañón, G. A., Méndez, F. T., Jasso, M. E. C., & Ruiz, F. (2019). Mechanisms of resistance to silver nanoparticles in endodontic bacteria: a literature review. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
3. Niño-Martínez, N., Salas Orozco, M. F., Martínez-Castañón, G. A., Torres Méndez, F., & Ruiz, F. (2019). Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2808.
4. Casillas Santana, M. Á., Martínez Zumarán, A., Patiño Marín, N., Castillo Silva, B. E., Sámano Valencia, C., & Salas Orozco, M. F. (2021). How Dentists Face the COVID-19 in Mexico: A Nationwide Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1750.
5. Casillas Santana, M. A., Dipp Velázquez, F. A., Sámano Valencia, C., Martínez Zumarán, A., Zavala Alonso, N. V., Martínez Rider, R., & Salas Orozco, M. F. (2021). Saliva: What Dental Practitioners Should Know about the Role of This Biofluid in the Transmission and Diagnostic of SARS-CoV-2. *Medicina*, 57(4), 349.

En revistas indexadas

1. González, Ó. L., & Orozco, M. F. S. (2021). Imaging technologies for the detection of sinus pathologies of odontogenic origin. A review. *Revista Científica Odontológica*, 9(1), e049-e049.

En revistas de divulgación

1. OROZCO, M. F. S., GARCÍA, P. R., & MEDRANO, A. G. S. Las nanopartículas. *Revista Universitarios Potosinos*.

Docencia frente a grupo

Profesor de horas clase de la materia de Metodología de la Investigación Clínica de la Especialidad en Ortodoncia y Ortopedia Dentomaxilofacial de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Periodo: enero- diciembre 2020, enero-junio de 2021

Tesis: Detección de genes relacionados con resistencia a nanopartículas de plata en bacterias de infecciones endodónticas secundarias.

1. Introducción

Las nanopartículas (NP) se han utilizado ampliamente en diversas áreas de la odontología, principalmente debido a sus propiedades antibacterianas [1]. En endodoncia, las nanopartículas de plata (AgNP) se utilizan para combatir la presencia de biopelículas [2]. Esto se debe a que las AgNP tienen varias ventajas en comparación con el NaOCl (el estándar de oro de la desinfección en endodoncia). Las AgNP pueden conservar su eficacia antibacteriana en presencia de dentina y tener una mayor biocompatibilidad, especialmente a concentraciones bajas [3].

En general, se menciona que las nanopartículas de plata ejercen su acción bactericida a través de dos mecanismos. El primer mecanismo consiste en la penetración directa de la nanopartícula (<10 nm) en la célula bacteriana, y el segundo es la liberación de iones de plata que también pueden ingresar a las células bacterianas y reaccionar con sus componentes provocando la muerte de las bacterias. Aunque se cree que las bacterias no son capaces de desarrollar resistencia a las nanopartículas de plata, esto no ha sido bien estudiado, además, se ha informado de bacterias resistentes a la plata aisladas de entornos clínicos y no clínicos [4, 5]. La primera bacteria clínica con resistencia a la plata descrita fue *Salmonella typhimurium*. El primer plásmido descubierto que codifica la resistencia bacteriana a Ag⁺ se aisló de esta bacteria. El plásmido se denominó pMG101 y confiere resistencia a Ag⁺, Hg⁺ y telurito, así como a antibióticos, como ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y estreptomicina. Este plásmido contiene una región de 14,2 kb (operón sil) con nueve ORF (marcos de lectura abiertos) dispuestos en tres unidades transcripcionales (silCFBAGP, silRS y silE) expresadas cada una a partir de un promotor diferente. Estas subunidades transcripcionales se denominan colectivamente **operón Sil** [6]. La primera unidad transcripcional está compuesta por silCFBAGP. Esta unidad de transcripción codifica un complejo de proteína de membrana interna formado por tres subunidades (silA, silB y silC). Estos tres componentes forman una bomba de flujo que es miembro de la familia de transportadores de resistencia, nodulación y división celular (RND) [7]. SilP es un miembro de la familia ATPasa de resistencia a metales pesados. SilG y silF son chaperones de plata responsables de secuestrar los iones de plata y transportarlos a los complejos silP y silCBA. En la segunda unidad de transcripción y corriente arriba de silE y en la misma orientación de esta, hay un par de genes, silRS, que codifica una proteína reguladora de la respuesta transcripcional y una quinasa sensible a la membrana. La última unidad transcripcional está compuesta por silE, que codifica una

proteína periplásmica que también se une a Ag^+ . Finalmente, entre silA y silP y entre silC y silB, hay dos ORF de 105 y 96 aminoácidos, respectivamente, de función no asignada [8]. Las bombas de eflujo sintetizadas a partir de la expresión de los genes antes mencionados (silCBA y silP) podrían participar como mecanismo de resistencia a las nanopartículas de plata. Este mecanismo funcionaría mediante la expulsión de iones de plata, evitando que estos afecten a los componentes internos de las bacterias.

Las bacterias endodónticas de infecciones secundarias presentan una alta prevalencia de plásmidos portadores de genes de resistencia a los antibióticos [9]. Recientemente, se descubrió que los plásmidos también pueden contener genes de resistencia a metales [10]. Esto se debe a una coestimulación y selección conjunta de genes de resistencia [11]. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de genes de resistencia a la plata (silCBA) en bacterias de dientes con obturación radicular. La detección de este tipo de genes no se ha realizado anteriormente en bacterias de infecciones endodónticas secundarias. La presencia de estos genes en este tipo de infecciones resistentes llevaría a reevaluar el uso a corto y largo plazo de nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos en infecciones resistentes como una infección endodóntica secundaria.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepa bacteriana

La cepa bacteriana *Enterobacter cloacae* 13047 se adquirió de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares de CINVESTAV-IPN. Esta cepa bacteriana se utilizó como control positivo para la detección de genes silCBA, según se informó en estudios anteriores [12]. Se inoculó en una placa de agar de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) utilizando un asa estéril y se incubó durante 24 h a 37 °C. Después del período de incubación, se tomó un inóculo y se colocó en un tubo Eppendorf con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se congeló a -4 °C hasta su posterior procesamiento.

2.2. Selección de pacientes

Todos los procedimientos realizados en los pacientes fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México (CEI-FE-027-018). Los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de ser incluidos en el estudio. Los 30 pacientes tenían un diente tratado

endodónticamente que requirió retratamiento endodóntico. Los dientes incluidos en el estudio tenían tratamiento endodóntico previo, sensibilidad a la percusión, dolor a la palpación, lesión periapical o trayecto fistuloso. Estas características clínicas fueron registradas. Se excluyeron pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico durante los últimos 3 meses o pacientes con dientes que presenten movilidad y/o bolsas periodontales. Se eliminaron del estudio los dientes con fractura radicular o que no pudieron aislarse.

2.3. Procedimiento de muestreo

Este fue un estudio descriptivo transversal con muestreo no probabilístico consecutivo. El estudio se realizó de marzo a noviembre de 2018. Evaluamos a 735 pacientes, de los cuales 30 cumplieron los criterios de inclusión. Los dientes seleccionados se aislaron mediante un dique de hule y se eliminó cualquier restauración, poste o caries. El campo operatorio se desinfectó utilizando peróxido de hidrógeno al 30% seguido de hipoclorito de sodio al 5,25% [13]. Posteriormente, se utilizó tiosulfato de sodio al 10% (LabChem Inc., Pittsburgh, PA) [14] para inactivar el hipoclorito de sodio. El material de obturación se eliminó utilizando limas K, brocas Gates Glidden, limas Hedstrom o limas rotativas sin usar solventes. La longitud de trabajo se determinó con el uso de un localizador de ápice (Raypex 5; VDW, Munich, Alemania) y se tomaron radiografías transoperatorias para asegurar la eliminación completa del material de obturación. Se utilizó una solución salina estéril para eliminar cualquier material de relleno restante y humedecer el conducto radicular antes de tomar la muestra. Las muestras se obtuvieron utilizando tres puntas de papel estériles colocadas en el conducto radicular durante unos 30s para absorber el exudado presente en el conducto radicular [15]. En el caso de dientes multirradiculares, la muestra se tomó del conducto radicular más ancho o del que presentaba alguna lesión o exudado perirradicular. Después de recolectar las muestras, las puntas de papel se transfirieron a un tubo de 1,5 ml con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Todas las muestras se congelaron a -4 °C hasta su posterior procesamiento. Después de tomar la muestra, cada paciente recibió el retratamiento de endodoncia indicado.

2.4. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de la muestra de un organismo de control (*Enterobacter cloacae* 13047) y de todas las muestras clínicas utilizando el siguiente protocolo de extracción de ADN total. Las muestras se centrifugaron y luego se decantó la solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU), luego se agregaron 500 μ L de tampón TES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 50 μ L de Proteinasa K (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 40 μ L de SDS al 10%. Estos reactivos se incubaron a 55 ° C durante 3 h en un termobloque para su activación. Después de la incubación, la suspensión se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial de 1,5 mL. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 578 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Y se dejó incubar durante toda la noche. Después de la incubación con isopropanol, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 μ L de tampón TE.

2.5. Primers y protocolo de PCR

Las reacciones de PCR para cada una de las muestras y el control positivo se prepararon utilizando 1 μ L de ADN total, para un total de 25 μ L de reacción. En el control negativo, se utilizó 1 μ L de agua milliQ como plantilla. Los primers utilizados para la detección de los genes silCBA fueron los reportados por Woods et al. [5]. Los primers se adquirieron en T4oligo Company (Guanajuato, México). Las secuencias de los primers del gen SilCBA fueron las siguientes: silCBA forward cgggaaacgctgaaaatta y silCBA reverse gtacgtcccagcaccagt. Las PCR se llevaron a cabo utilizando el siguiente protocolo de PCR: la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C durante 3 min seguida de 45 ciclos que consisten en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 40s; la temperatura de alineación fue de 56 °C durante 40s y una temperatura de extensión de 72 °C durante 40s. Se realizó un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. Todas las amplificaciones se realizaron en un ciclador térmico C1000 Touch TM (Bio-Rad, California, EE. UU.). Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel; con un gel de agarosa al 2% teñido con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio y TAE (Tris-acetato-EDTA) como tampón de funcionamiento. En cada gel de agarosa, se cargó una escalera de ADN de 50 pb (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) para definir los tamaños de los fragmentos de PCR junto con el control positivo, el control negativo y las muestras. La electroforesis consistió en 1h a 70 V/cm. Los geles de agarosa se revelaron en un sistema de documentación de gel ENDURO TM GDS (Labnet International).

2.6. Características clínicas

Los datos de las características clínicas y los genes detectados se ingresaron en una hoja de cálculo y se analizaron.

2.7. Análisis estadístico

Las variables categóricas se reportaron con frecuencias y porcentajes, mientras que las continuas se reportaron con medias y desviaciones estándar (DE). Las variables categóricas se analizaron como ausente= 0 y presente= 1 para calcular correlaciones. Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y Brown Forsythe para determinar la distribución de las variables. Se utilizó el coeficiente de correlación de rango de Spearman para identificar todas las correlaciones. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP ver. 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.) Y Stata ver. 11.0 (Stata Corp LP, College Station, TX, EE. UU.).

3. Resultados

La edad media de los pacientes fue de 46.43 años (rango, 11-76). Hubo más pacientes mujeres (21=70%) que hombres (9=30%) (Tabla 1). Los dientes de los que se tomaron las muestras fueron 2 incisivos, 1 canino, 4 premolares y 23 molares. De los molares, 14 eran mandibulares y 5 maxilares. De todas las muestras analizadas, 22 (73,34%) muestras fueron positivas para los genes de resistencia silCBA. Las muestras que resultaron negativas para los genes de resistencia analizados fueron 8 (22,6%) (Cuadro 2). A pesar de la diferencia entre hombres y mujeres, la frecuencia de genes silCBA en ambos grupos fue muy similar, 76,1% para mujeres y 77,77% para hombres. Las muestras positivas con lesión fueron 9 (40,9%). Las muestras positivas con sintomatología fueron 15 (68,1%). Las muestras positivas que presentaron lesión y sintomatología fueron 5 (22,72%). Algunas bandas de ADN son apenas visibles en los geles de agarosa (Figura 1), lo que sugiere que los genes están presentes en un número de copias relativamente bajo en algunas muestras.

Figura 1.

Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de muestras de bacterias extraídas de dientes con infección endodóntica secundaria. En el primer pozo, se cargó el marcador de pares de bases (50 pb). En los siguientes pozos, se cargaron el control negativo (agua milliQ) y positivo (Enterobacter cloacae 13047). Los productos de amplificación de cada muestra se cargaron por triplicado a partir de reacciones individuales.

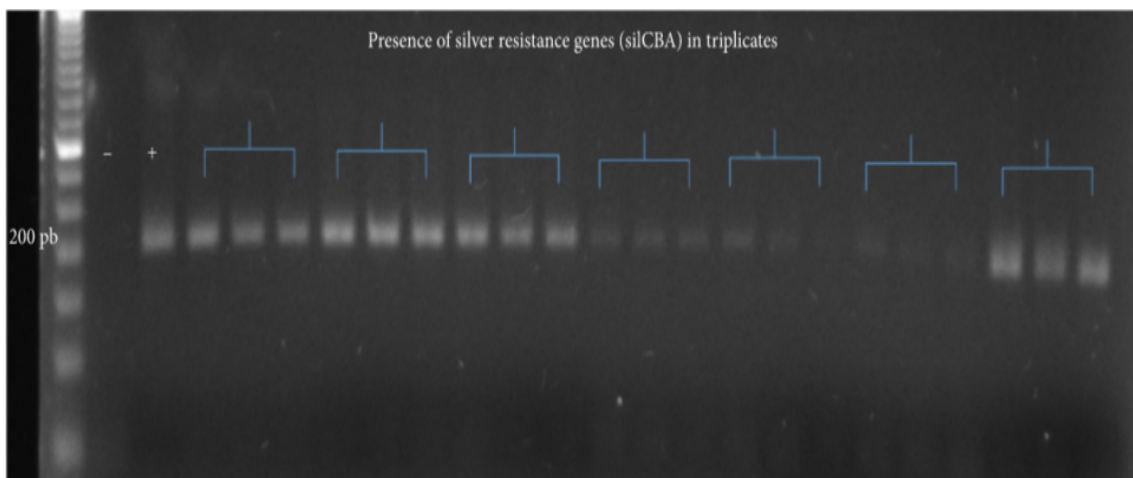


Tabla 1. Detección de genes de resistencia a plata en bacterias de infecciones endodónticas secundarias

Pacientes	Sexo	Edad(años)	Lesión	Sintomatología	Dientes	Genes
1	Mujer	38	Si	Si	44	Si
2	Mujer	53	Si	No	14	Si
3	Hombre	66	No	Si	22	No
4	Mujer	14	No	No	26	No
5	Hombre	42	No	No	36	Si
6	Mujer	44	No	No	45	No
7	Mujer	45	Si	Si	26	Si
8	Hombre	40	Si	Si	26	No
9	Mujer	49	Si	Si	46	Si
10	Mujer	30	Si	No	46	Si
11	Mujer	76	No	No	14	No
12	Hombre	59	No	Si	47	Si
13	Mujer	67	No	Si	34	Si
14	Hombre	41	Si	Si	37	No
15	Mujer	26	Si	No	47	Si
16	Mujer	39	Si	Si	36	No
17	Mujer	70	Si	Si	47	No
18	Hombre	25	No	Si	11	Si
19	Hombre	58	No	Si	16	Si
20	Mujer	18	Si	Si	46	Si
21	Mujer	11	Si	Si	36	Si
22	Mujer	55	No	Si	16	Si
23	Mujer	68	No	Si	37	Si
24	Hombre	36	No	No	37	Si
25	Mujer	63	No	Si	37	Si
26	Mujer	62	No	Si	17	Si
27	Mujer	48	No	Si	47	Si
28	Hombre	36	No	No	25	Si
29	Mujer	68	No	Si	15	Si
30	Mujer	46	Si	No	24	Si

Tabla 2. Resumen de frecuencias reportadas.

Variables	Frecuencia(%)
Sexo	
Mujer	21 (70)
Hombre	9 (30)
Tipo de Diente	
Anterior	3 (10)
Posterior	27 (90)
Genes de resistencia	
Ausente	08 (26.66)
Presente	22 (73.34)
Sintomatología	
Ausente	10 (33.33)
Presente	20 (66.66)
Lesión Periapical	
Ausente	17 (56.66)
Presente	13 (43.34)
	Promedio \pm desviación estándar
Edad (años)	46.43 \pm 17.42

4. Discusión

El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de genes silCBA en un grupo de bacterias de dientes con infección endodóntica secundaria. Durante la revisión de la literatura, no se encontraron estudios similares al nuestro en bacterias endodónticas. Los resultados de este estudio muestran una alta presencia de genes de resistencia a la plata silCBA. De todas las muestras analizadas, el 73,3% de las muestras fueron positivas para los genes deseados. Esta es la primera vez que se identifican genes de resistencia a la plata en bacterias de dientes con infección endodóntica secundaria. Solo hay un informe anterior en el que fue posible aislar dos cepas de *Enterobacter cloacae* resistente a la plata a partir de muestras de dientes extraídos. En ese estudio, solo se identificó la presencia del gen de resistencia a la plata silE en el ADN genómico y plasmídico de las dos cepas de *Enterobacter cloacae* resistente a la plata. El gen, silE, solo codifica una proteína transportadora de iones de plata y no siempre está presente junto con los otros genes que constituyen el operón sil. En nuestro estudio analizamos la presencia de genes silCBA, ya que estos son los que codifican la bomba de eflujo de iones de plata, que es el principal mecanismo de resistencia [16]. Consideramos que la presencia de los genes silCBA reportados en este estudio es alta en comparación con lo reportado anteriormente. Por ejemplo, Davis et al. aislaron 97 bacterias, de las cuales solo 2 fueron resistentes a AgNO₃. Estas dos bacterias (*Enterobacter cloacae* Ag703 y *Enterobacter cloacae* Ag1157) también fueron positivas para la presencia de los genes silE que representan el 2% del total de bacterias aisladas [16]. Finley y col. analizaron la presencia de los 8 genes del operón sil en 859 cepas bacterianas aisladas de pacientes en un centro de atención terciaria. Encontraron que estos genes estaban presentes en 32 de las 859 bacterias aisladas, lo que representa el 3,7% del total de muestras [12]. Woods y col. reportaron la presencia de genes sil en 6 de 172 (3,4%) bacterias aisladas de heridas crónicas en humanos y caballos. Sütterlin y col. analizaron la presencia de genes de resistencia a la plata (silE, silS y silP) en 839 cepas bacterianas aisladas durante un período de 10 años. Al menos uno de los tres genes de resistencia a la plata analizados estaba presente en 176 (21%) cepas de las 839 cepas analizadas [17]. En un estudio, encontramos una prevalencia de genes sil similar a la informada por nosotros. Andrade y col. analizaron la presencia de silA en 27 bacterias de la especie *Enterobacter cloacae* Complex (EcC) y 8 de *Enterobacter aerogenes*. Encontraron el gen silA en 21 de 27 (78%) aislados de EcC, mientras que el gen silA se encontró sólo en un aislado de *E. cloacae* [18].

La diferencia de los resultados mencionados con los de nuestro estudio puede deberse a que en los estudios mencionados se realizó una preselección de bacterias capaces de crecer en agar suplementado con AgNO_3 [5]. Esta preselección de cepas bacterianas pudo haber causado una reducción considerablemente en el número de cepas a partir de las cuales se llevó a cabo la detección de genes de resistencia. Además, es posible que algunas bacterias tengan genes de resistencia, pero no los expresen en cantidades suficientes para permitirles crecer en agar suplementado con AgNO_3 . Esto pudo haber provocado su eliminación incorrecta del total de cepas bacterianas estudiadas. Estos factores podrían ser la causa de la prevalencia extremadamente baja reportada en estudios previos en comparación con la alta prevalencia reportada en este estudio. Otra diferencia entre nuestro estudio y los estudios anteriores es que hicimos la detección de genes en muestras bacterianas mixtas, mientras que la mayoría de los informes anteriores hicieron la detección de genes a partir de cultivos puros de cepas bacterianas.

La alta prevalencia de los genes de resistencia *silCBA* en bacterias endodónticas de dientes con infección endodóntica secundaria reportada en este estudio puede deberse al hecho de que estos genes se informaron previamente en bacterias como *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* [12]. Algunas de estas bacterias también se han informado en dientes con infecciones endodónticas persistentes. Por ejemplo, Murad et al. reportaron la presencia de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Staphylococcus aureus* en diferentes porcentajes usando hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez [19]. Sunde y col. detectaron *Staphylococcus aureus* en lesiones perirradiculares persistentes después del tratamiento de endodoncia [20]. Peciulienė et al. aislaron *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. faecalis* de dientes con tratamiento endodóntico y con periodontitis apical crónica [21]. Aunque los genes del operón *sil* sólo se expresan en bacterias gram negativas, algunos estudios también informan de la presencia de estos genes en bacterias gram positivas [12]. Esto podría deberse al hecho de que estos genes se mueven junto con genes de resistencia a antibióticos en plásmidos que podrían estar presentes en ambos tipos de bacterias.

Aunque los genes del operón *sil* no se pueden expresar en bacterias gram positivas, su presencia en este tipo de bacterias es importante. En condiciones de estrés, estos genes

podrían transmitirse a cepas bacterianas con la capacidad de expresarlas [22, 23] debido a la transferencia horizontal de genes, la cual aumenta en las biopelículas que son la principal forma de crecimiento bacteriano en los conductos radiculares infectados [24, 25].

La presencia de genes de resistencia a la plata en las bacterias endodónticas podría deberse al hecho de que estos genes se mueven junto con los genes de resistencia a los antibióticos que se encuentran en los plásmidos, y las cepas clínicas de especies de bacterias asociadas con infecciones del conducto radicular (como *Enterococcus faecalis*) pueden portar una gran variedad de plásmidos [9]. Por ejemplo, Pal et al. analizó la secuencia genómica de plásmidos de la base de datos del genoma bacteriano NCBI. Informaron que con frecuencia en el mismo plásmido se podían encontrar genes de resistencia a antibióticos y metales [26]. Incluso las bacterias no patógenas como *E. coli* tienen una gran presencia de plásmidos con ambos tipos de genes de resistencia [10]. El hallazgo de estos genes en bacterias endodónticas es importante ya que las bombas de eflujo que expresan se han relacionado con el desarrollo de resistencia a nanopartículas y antibióticos; y hasta la fecha, este tipo de resistencia no se ha estudiado en bacterias endodónticas. Por ejemplo, Jianhua et al. expuso *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a diferentes concentraciones (1, 10 y 50 mg/ml) de nanopartículas de cobre. Descubrieron que esto provocaba una regulación positiva de los genes de resistencia que codifican los transportadores facilitadores de la difusión de cationes, la bomba de eflujo ATPasa de tipo P y las bombas de eflujo de cobre de la familia RND [27]. Yang y col. también expuso a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a una concentración baja (160 nM) de puntos cuánticos (QD) intactos y degradados (7.4 ± 1.1 nm). Después de la exposición subletal a los QD, el análisis transcriptómico reveló una regulación positiva en la unidad transcripcional *czcABC* que codifica tres proteínas (CzcA, CzcB y CzcC) que juntas forman una bomba de eflujo de la familia RND. Un efecto secundario de la exposición subletal fue el aumento de la resistencia antibiótica a diferentes antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina) debido al aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias (hasta el 100% en algunos casos) [28]. Los genes de resistencia (*silCBA*) que estudiamos en este estudio también codifican para bombas de eflujo de la familia RND (*silCBA*). Además, el operón *sil* contiene el gen *silP* que codifica una bomba de eflujo de la familia ATPasa, aunque esta bomba de salida no se ha caracterizado bien [29]. Hay informes en los que las bacterias gram negativas y positivas generan resistencia a las nanopartículas

de plata después de la exposición a dosis subletales, pero ninguno de estos estudios evalúa la participación de los genes de resistencia a la plata que codifican las bombas de eflujo de la familia RND [30, 31]. Por ejemplo, Kaweeteerawat et al. expusieron bacterias gram negativas (*E. coli*) y gram positivas (*S. aureus*) a dosis subletales de nanopartículas de plata y observaron un aumento en las concentraciones mínimas inhibitorias después de solo cuatro rondas de subcultivo. Los autores de este artículo no investigaron la participación de las bombas de eflujo de iones de plata de la familia RND en este tipo de resistencia [32]. Mishra y col. analizaron un *Enterobacter cloacae* 13047 tratado y un *Enterobacter cloacae* multirresistente, expuestos a una concentración subletal de AgNP (6 mg / ml) y nanopartículas de plata-metal-carbohidrato (Ag-MCNP) (0,75 mg / ml) por 0, 30, 60, 120 y 180 min. No encontraron un aumento significativo en la expresión de la bomba de eflujo de AcrAB-TolC. En este estudio, los autores tampoco analizaron la participación de las bombas de eflujo de iones de plata en el desarrollo de resistencia. Los autores solo analizaron la participación de la bomba de eflujo AcrAB-TolC, que no participa en el eflujo de iones de plata. La bomba de salida AcrAB-TolC solo participa en la expulsión de fármacos antibacterianos [33].

Recientemente, se ha planteado la hipótesis de que la presencia de este tipo de genes en bacterias se debe no solo a la presencia de metales en el medio, sino que son el resultado del desarrollo de defensas frente a organismos depredadores de bacterias como los protozoos o como defensa frente a otras bacterias o a células del sistema inmunológico como los macrófagos. Por ejemplo, tanto los protozoos como los macrófagos emplean Zn^{+} y Cu^{+} para atacar grupos de Fe-S (esencial para la supervivencia bacteriana) durante la fagocitosis de bacterias. Por lo tanto, la resistencia a la plata puede ser un subproducto de la resistencia al cobre y al zinc desarrollada por bacterias para sobrevivir a la fagocitosis por protozoos y macrófagos. Esta hipótesis se debe a que la mayoría de los denominados determinantes sil son parte de una isla genómica más grande (recientemente denominada “isla de patogenicidad del cobre”) que confiere resistencia al cobre y la plata [34].

Después de una revisión de la literatura, hasta donde sabemos, no existen estudios en la literatura de endodoncia en los que la presencia de genes de resistencia se correlacione con los diferentes síntomas clínicos de infecciones resistentes (endodoncia secundaria infección). Muchos estudios se han centrado únicamente en detectar la presencia de genes

de resistencia en diferentes entornos orales, incluyendo bacterias aisladas de diferentes tipos de endodoncia infecciones [35, 36]. Otros estudios solo se han dedicado a asociar la presencia de ciertas especies bacterianas con la presencia de síntomas clínicos [37]. El único estudio similar al nuestro que encontramos durante la revisión de la literatura es el de De Lima et al. En este estudio, los autores solo analizaron la asociación entre la presencia genes de resistencia lactámica (blaTEM) y parámetros clínicos (diagnóstico pulpar, tracto sinusal, dolor e hinchazón); pero no encontraron asociación entre estas variables [38]. La correlación de la presencia de genes de resistencia con los síntomas clínicos de la infección endodóntica podría proporcionar información sobre por qué ciertas bacterias están presentes en ciertos tipos de infección y cómo influyen en su sintomatología. En nuestro estudio, considerando las tres variables, la correlación más alta identificada fue entre la presencia de genes de resistencia a la plata con dientes posteriores. Esto se debe a que este tipo de dientes es el primero en estar presente en la cavidad bucal y, por lo tanto, es el primero en desarrollar caries profunda y presentar infección endodóntica. Además, la anatomía interna de este tipo de dientes es más compleja, por lo que tienden a tener una mayor diversidad de microorganismos [39].

5. Conclusión

Este estudio demuestra una alta prevalencia de genes de resistencia a la plata en bacterias endodónticas. Esto podría indicar que las bacterias endodónticas pueden desarrollar resistencia a nanopartículas de plata a largo plazo. Esto también nos invita a reevaluar el uso de nanopartículas (especialmente plata nanopartículas) como agentes antimicrobianos en endodoncia, ya que el aumento de este tipo de resistencias podría traer efectos secundarios graves como la coestimulación y aumento de resistencia a antibióticos y otros agentes antimicrobianos, lo que haría que el manejo de infecciones resistentes (como infecciones endodónticas secundarias) sea aún más difícil.

5.1. Perspectivas futuras.

A pesar de la gran variedad de estudios evaluando la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas, pocos estudios se han dedicado a estudiar los mecanismos de defensa de las bacterias frente a las nanopartículas. Es necesaria una mejor comprensión de las interacciones a largo plazo entre nanopartículas y microbios. Es importante determinar todos los posibles mecanismos de resistencia bacteriana no solo a las nanopartículas de plata sino también a la amplia variedad de nanopartículas metálicas y de óxido de metales.

Se necesitan más estudios para determinar qué bacterias tienen mecanismos de resistencia a las nanopartículas, la capacidad de las bacterias para mantener los mecanismos de resistencia y transmitirlos a otras especies, y cómo se podría mejorar el manejo de las infecciones resistentes. Esto nos ayudará a evitar en el futuro la aparición de este tipo de resistencia y sus posibles efectos secundarios, que, como ya se mencionó, puede ser la coestimulación de la resistencia a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos, que ya es un grave problema de salud mundial.

REFERENCIAS

1. M. L. Cohen, "Nanotubes, nanoscience, and nanotechnology," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 15, no. 1-2, pp. 1–11, 2001.
2. M. Samiei, A. Farjami, S. M. Dizaj, and F. Lotfipour, "Nanoparticles for antimicrobial purposes in endodontics: a systematic review of in vitro studies," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 58, pp. 1269–1278, 2016.
3. J. E. Gomes-Filho, F. O. Silva, S. Watanabe et al., "Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution," *Journal of Endodontia*, vol. 36, no. 10, pp. 1698–1702, 2010.
4. S. Vasileiadis, E. Puglisi, M. Trevisan et al., "Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 91, no. 10, 2015.
5. E. J. Woods, C. A. Cochrane, and S. L. Percival, "Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds," *Veterinary Microbiology*, vol. 138, no. 3-4, pp. 325–329, 2009.
6. A. Gupta, K. Matsui, J.-F. Lo, and S. Silver, "Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella," *Nature Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 183–188, 1999.
7. M. H. Saier, R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer, "Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport," *Molecular Microbiology*, vol. 11, no. 5, pp. 841–847, 1994.
8. C. P. Randall, A. Gupta, N. Jackson, D. Busse, and A. J. O'Neill, "Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, no. 4, pp. 1037–1046, 2015.
9. C. Sedgley and D. B. Clewell, "Bacterial plasmids in the oral and endodontic microflora," *Endodontic Topics*, vol. 9, no. 1, pp. 37–51, 2004.
10. L. Fang, X. Li, L. Li et al., "Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from E. coli isolates of food-producing animals," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, 2016.
11. C. Pal, K. Asiani, S. Arya et al., "Metal resistance and its association with antibiotic resistance," in *Microbiology of Metal Ions*, pp. 261–313, Elsevier, 2017.
12. P. J. Finley, R. Norton, C. Austin, A. Mitchell, S. Zank, and P. Durham, "Unprecedented silver-resistance in clinically isolated Enterobacteriaceae: major implications for burn and wound management," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 8, pp. 4734–4741, 2015.
13. A. Al-Ahmad, H. Ameen, K. Pelz et al., "Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections

- associated with root-filled teeth,” *Journal of Endodontics*, vol. 40, no. 2, pp. 223–230, 2014.
14. J. Cook, R. Nandakumar, and A. F. Fouad, “Molecular-and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules,” *Journal of Endodontics*, vol. 33, no. 6, pp. 690–692, 2007.
 15. I. Rocas, I. Jung, C. Lee, and J. Siqueira jr, “Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population,” *Journal of Endodontics*, vol. 30, no. 7, pp. 504–508, 2004.
 16. I. J. Davis, H. Richards, and P. Mullany, “Isolation of silver-and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth,” *Molecular Oral Microbiology*, vol. 20, no. 3, pp. 191–194, 2005.
 17. S. Sütterlin, M. Dahlö, C. Tellgren-Roth, W. Schaal, and Å. Melhus, “High frequency of silver resistance genes in invasive isolates of *Enterobacter* and *Klebsiella* species,” *Journal of Hospital Infection*, vol. 96, no. 3, pp. 256–261, 2017.
 18. L. N. Andrade, T. E. S. Siqueira, R. Martinez, and A. L. C. Darini, “Multidrug-resistant CTX-M-(15, 9, 2)-and KPC-2-producing *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter asburiae* isolates possessed a set of acquired heavy metal tolerance genes including a chromosomal *sil* operon (for acquired silver resistance),” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
 19. C. F. Murad, L. M. Sassone, M. Faveri, R. Hirata Jr., L. Figueiredo, and M. Feres, “Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization,” *Journal of Endodontics*, vol. 40, no. 7, pp. 899–906, 2014.
 20. P. Sunde, I. Olsen, G. Debelian, and L. Tronstad, “Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy,” *Journal of Endodontics*, vol. 28, no. 4, pp. 304–310, 2002.
 21. V. Peciuliene, A. H. Reynaud, I. Balciuniene, and M. Haapasalo, “Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis,” *International Endodontic Journal*, vol. 34, no. 6, pp. 429–434, 2001.
 22. K. L. Wyres and K. E. Holt, “*Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 45, pp. 131–139, 2018.
 23. K. L. Palmer, V. N. Kos, and M. S. Gilmore, “Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 5, pp. 632–639, 2010.

24. J. S. Madsen, M. Burmølle, L. H. Hansen, and S. J. Sørensen, “The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer,” *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 65, no. 2, pp. 183–195, 2012.
25. G. Svensäter and G. Bergenholtz, “Biofilms in endodontic infections,” *Endodontic Topics*, vol. 9, no. 1, pp. 27–36, 2004.
26. C. Pal, J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson, and D. G. J. Larsson, “Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential,” *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, 2015.
27. J. Guo, S. H. Gao, J. Lu, P. L. Bond, W. Verstraete, and Z. Yuan, “Copper oxide nanoparticles induce lysogenic bacteriophage and metal-resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 27, pp. 22298–22307, 2017.
28. Y. Yang, J. M. Mathieu, S. Chattopadhyay et al., “Defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 against quantum dots and their released heavy metals,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 7, pp. 6091–6098, 2012.
29. M. Blanco Massani, J. Klumpp, M. Widmer et al., “Chromosomal Sil system contributes to silver resistance in *E. coli* ATCC 8739,” *Biometals*, vol. 31, no. 6, pp. 1101–1114, 2018.
30. A. Panáček, L. Kvítek, M. Smékalová et al., “Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it,” *Nature Nanotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 65–71, 2018.
31. J. L. Graves, M. Tajkarimi, Q. Cunningham et al., “Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*,” *Frontiers in Genetics*, vol. 6, 2015.
32. C. Kaweeteerawat, P. Na Ubol, S. Sangmuang, S. Aueviriyavit, and R. Maniratanachote, “Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles,” *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 80, no. 23-24, pp. 1276–1289, 2017.
33. M. Mishra, S. Kumar, R. K. Majhi, L. Goswami, C. Goswami, and H. Mohapatra, “Antibacterial efficacy of polysaccharide capped silver nanoparticles is not compromised by AcrAB-TolC efflux pump,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
34. X. Hao, F. L. Lühje, Y. Qin et al., “Survival in amoeba—a major selection pressure on the presence of bacterial copper and zinc resistance determinants? Identification of a “copper pathogenicity island”,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 14, pp. 5817–5824, 2015.
35. P. M. Lang, R. C. Jacinto, T. S. Dal Pizzol, M. B. C. Ferreira, and F. Montagner, “Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 48, no. 5, pp. 467–474, 2016.

36. L. C. Moraes, M. V. R. Só, T. S. Dal Pizzol, M. B. C. Ferreira, and F. Montagner, "Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review," *Journal of Endodontia*, vol. 41, no. 4, pp. 434–441, 2015.
37. N. Zargar, M. A. Marashi, H. Ashraf, R. Hakopian, and P. Beigi, "Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection," *Iranian Journal of Microbiology*, vol. 11, no. 2, pp. 120–128, 2019.
38. B. R. de Lima, G. F. Nicoloso, C. C. Fatturi-Parolo, M. B. C. Ferreira, F. Montagner, and L. Casagrande, "Prevotella strains and lactamic resistance gene distribution in different oral environments of children with pulp necrosis," *International Endodontic Journal*, vol. 51, no. 11, pp. 1196–1204, 2018.
39. I. Prada, P. Mico-Munoz, T. Giner-Lluesma, P. Mico-Martinez, N. Collado-Castellano, and A. Manzano-Saiz, "Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review," *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, vol. 24, no. 3, pp. e364–e372, 2019.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Marcos Salas Camacho y Ma. Griselda Orozco Torres por siempre apoyarme en todos mis proyectos y por ser mi fortaleza durante estos cuatro años de doctorado.

A mi tía Rosalba Orozco Torres que es como una segunda madre para mi, y que siempre ha estado cuidándome y procurándome.

A mi abuelita Soledad Camacho de Salas y a mi tía Josefina Salas Camacho que igualmente siempre me apoyaron y que ahora estoy seguro que lo siguen haciendo desde el cielo.

A mis compañeros de generación, Pedro y Gaby también por su apoyo, convivencia y alegrías durante los 4 años de doctorado.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi directora de tesis, la Dra. Nereyda Niño Martínez por haber confiado y aceptado el proyecto de investigación que propuse al momento de ingresar al doctorado. Por permitirme trabajar en su laboratorio y formar parte de su equipo de trabajo, siempre le estaré agradecido.

A mis asesores Dr. Gabriel Alejandro Martínez Castañón, Dr. Fernando Torres Méndez y el Dr. Facundo Ruiz, por compartir su conocimiento, por el apoyo brindado durante los 4 años de doctorado, por sus consejos y motivación. Al doctor Horacio Bach por permitirme vivir la experiencia de la estancia académica internacional, por su apoyo y por todo el aprendizaje durante el tiempo que trabajamos juntos.

A la coordinadora del Doctorado en Ciencias Odontológicas, la Dra. Nuria Patiño Marín por sus consejos, motivación, colaboración y por integrarme a su equipo de trabajo.