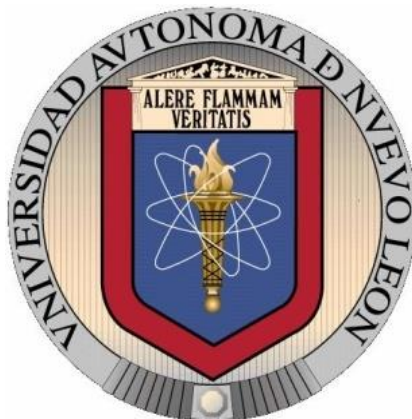


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



TESIS

**“EFECTIVIDAD ANTIBIOFILM INTRACONDUCTO DE UN HIDROGEL
CARGADO CON CLINDAMICINA Y AMFOTERICINA B SOBRE UN
BIOFILM MULTIESPECIE DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*,
STREPTOCOCCUS GORDONII Y *CANDIDA ALBICANS*”**

POR

FRANCISCO JAVIER CASTILLO CANO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA**

JUNIO, 2019

TESIS

**EFFECTIVIDAD ANTIBIOFILM INTRACONDUCTO DE UN HIDROGEL
CARGADO CON CLINDAMICINA Y AMFOTERICINA B SOBRE UN BIOFILM
MULTIESPECIE DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, *STREPTOCOCCUS
GORDONII* Y *CANDIDA ALBICANS***

POR

L.E.E.E. FRANCISCO JAVIER CASTILLO CANO

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el área de Endodoncia

Comité de Examen de Tesis

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
Presidente

DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
Secretario

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTINEZ GONZALEZ
Vocal

TESIS

EFFECTIVIDAD ANTIBIOFILM INTRA EFFECTIVIDAD ANTIBIOFILM
INTRA CONDUCTO DE UN HIDROGEL CARGADO CON CLINDAMICINA Y
AMFOTERICINA B SOBRE UN BIOFILM MULTIESPECIE DE *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS, *STREPTOCOCCUS GORDONII* Y *CANDIDA ALBICANS*

POR

L.E.E.E. FRANCISCO JAVIER CASTILLO CANO

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el área de Endodoncia

Comité de Examen de Tesis

DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
CO-DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera por esta gran oportunidad, Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño por permitirnos formar parte de este gran posgrado de endodoncia, al Dr. Claudio Cabral Romero y al Dr. Rene Hernández Delgadillo por las facilidades, el conocimiento y la ayuda en la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	IV
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
Introducción	8
Planteamiento del problema.....	9
Justificación.....	10
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
Antecedentes.....	13
Material y métodos.....	20
Resultados.....	23
Discusión.....	28
Conclusiones.....	30
Bibliografía.....	31

RESUMEN

El éxito del tratamiento endodóntico radica en la adecuada desinfección del sistema de conductos radiculares. Sin embargo, la irrigación con desinfectantes no elimina por completo el biofilm endodóntico. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un hidrogel cargado con clindamicina y amfotericina B, evaluar su actividad antimicrobiana y antibiofilm intraconducto. La actividad antimicrobiana del hidrogel suplementado con medicamentos se evaluó mediante ensayos de viabilidad celular MTT y la actividad antibiofilm mediante el ensayo FDA y microscopía de fluorescencia. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que el hidrogel compite en eficacia con desinfectantes como hipoclorito de sodio, clorhexidina y CTAB tanto para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* como un cultivo mixto. En la actividad antibiofilm, el hidrogel supero a la clorhexidina y tuvo la misma eficiencia que el hipoclorito de sodio. En conjunto estos resultados muestran el potencial del hidrogel con clindamicina y amfotericina B para erradicar el biofilm endodóntico.

ABSTRACT

The successful in endodontic treatment is based on the disinfection of the root canal system. However, irrigation with disinfectants could not eliminate completely all endodontic biofilm. The aim of this work is to determine the antimicrobial and antibiofilm effectiveness of a hydrogel loaded with Clindamycin and Anphotericin B on *E. faecalis* and a multispecies biofilm. The antimicrobial activity of the hydrogel loaded with drugs was evaluated by MTT cell viability assays. Antibiofilm acitivity was analyzed by FDA assays and fluorescence microscopy. Among the obtained results it was found that hydrogel loaded with drugs compete in efficacy with chloride hypochlorite, chlorhexidine, CTAB, to inhibit *E. faecalis* and mixture culture growth. In relation to antibiofilm activity, the hydrogel with clindamycin and anphotericin B lead chlorhexidine and same efficiency than sodium hypochlorite. Altogether these results show the potential of hydrogel supplemented with clindamycin and anphotericin B to detach endodontic biofilm.

1. INTRODUCCIÓN

La principal complicación de la caries dental son las infecciones endodónticas cuyo tratamiento consiste en desinfectar el sistema de conductos radiculares con desinfectantes como hipoclorito de sodio, clorhexidina e hidróxido de calcio, sin embargo, el tiempo de exposición con el hipoclorito o clorhexidina puede ser demasiado corto para eliminar a todos los microorganismos que crecen dentro del biofilm como *E. faecalis*, comprometiendo el tratamiento. En este trabajo se tiene por objetivo evaluar la actividad antibiofilm de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B sobre un biofilm multiespecie de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gordonii* y *Candida albicans*. Para medir la eficacia antibiofilm del hidrogel se empleará un modelo de biofilm fluido intraconducto que simulará las condiciones experimentales que presentan los pacientes con infección endodóntica. En caso de tener resultados favorables se contaría con una opción innovadora para el tratamiento de las infecciones endodónticas optimizando el tiempo de recuperación de los pacientes. En la práctica endodóntica diaria dentro del sistema de conductos radiculares, encontramos algunos problemas que frecuentemente logramos resolver técnicamente. Sin embargo, sabemos que la instrumentación por sí sola, no es capaz de eliminar a todos los microorganismos que se encuentran dentro del sistema de conductos radiculares, en especial el *biofilm* que es muy difícil de erradicar. Así mismo, a pesar de todos los esfuerzos por sacar sistemas de irrigación para limpiar y desinfectar el sistema de conductos radiculares, tampoco se ha podido lograr eficazmente. Esto mismo nos lleva a causas de fracaso endodóntico que frecuentemente terminan en procedimientos quirúrgicos. Nuestra hipótesis es que una exposición prolongada a través de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B añadiéndolo directamente como medicamento intraconducto será capaz de remover el biofilm intraconducto reduciendo las probabilidades de fracaso del tratamiento endodóntico.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del constante esfuerzo de la industria química y medicina moderna, el problema de la multirresistencia entre los microorganismos patógenos es cada vez más frecuente y el área odontológica no está exenta. Aunque existen diferentes opciones para desinfectar el sistema de conductos radiculares, no se ha podido alcanzar totalmente el efecto terapéutico deseado, y a la vez pueden presentar efectos secundarios no deseados cuestionando su empleo. El método tradicional basado en irrigación con hipoclorito de sodio y/o clorhexidina no es suficiente para la erradicación total del biofilm intraconducto. Por otra parte, se conoce que las bacterias han generado alta resistencia a diversos fármacos mediante diversos mecanismos comenzando por su forma de crecer en biofilms y los antibióticos comunes son muy poco útiles contra esta forma de crecer de los microorganismos patógenos. En éste trabajo proponemos analizar la eficacia bactericida, fungicida y anti-biofilm de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B añadiéndolo directamente como medicamento intraconducto el cual será capaz de remover el biofilm intraconducto reduciendo las probabilidades de fracaso del tratamiento endodóntico. En caso de tener éxito se contará con una innovadora alternativa para el tratamiento de infecciones endodónticas.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al gran número de reinfecciones endodónticas es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento intraconducto, incluidas las de origen bacteriano que forman biofilm ya que ha sido un fenómeno poco explorado. De hecho, no existe una presentación comercial que incluya anti fúngico para tratar de erradicar a *C. albicans* presente en este biofilm intraconducto. En este trabajo se propone el uso de un hidrogel biodegradable para la erradicación del biofilm mixto intraconducto (bacterias y hongos). Nuestra hipótesis está basada en que una exposición tópica directa y prolongada de clindamicina y amfotericina B (24-48 hrs) será suficiente para matar a los microorganismos y desintegrar el biofilm intraconducto desinfectando el sistema de conductos radiculares.

La trascendencia de los resultados a obtener sería que el uso de un hidrogel biodegradable cargado con clindamicina y amfotericina B facilitaría la remoción del biofilm mixto intraconducto. En caso de tener éxito se contará con una alternativa de tratamiento que deberá ser evaluada para su efectividad en la clínica.

4. HIPÓTESIS

La efectividad antibiofilm intraconducto de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B sobre un biofilm multiespecie de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gordonii* y *Candida albicans* será elevada removiendo el biofilm bacteriano.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la efectividad antibiofilm intraconducto de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B sobre un biofilm multiespecie de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gordonii* y *Candida albicans*.

5.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un modelo *in vitro* de biofilm de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.
- Elaborar el hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B y evaluar su actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* mediante ensayos de viabilidad celular MTT.
- Evaluar la efectividad antibiofilm intraconducto de un hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B sobre el biofilm multiespecie intraconducto

6. ANTECEDENTES

Biofilms: importancia médica y resistencia a los antibióticos

Las bacterias en la mayoría de los diferentes medios ambientes forman comunidades organizadas de células agregadas en una matriz hidratada de sustancias de polisacáridos extracelulares llamados biofilms^{1,2}. La formación de biofilm representa la adaptación de procariontes ancestrales³ y un modo de crecimiento que permite a las bacterias sobrevivir en ambientes hostiles y colonizar nuevos nichos por varios mecanismos dispersos^{4,5,6}. El biofilm bacteriano demuestra un comportamiento coordinado con la formación de estructuras complejas organizadas y funcionalmente comunidades heterogéneas bacterianas^{7,3}. Poblaciones dentro de los biofilms exhiben diferencias en la expresión de moléculas de superficie, utilización de nutrientes y factores de virulencia^{8,9,10,11}. Las bacterias dentro del biofilm también coordinan su comportamiento por comunicación célula-célula empleando señales químicas secretadas. La comunicación celular permite a la célula sensar y responder fenotípicamente a su ambiente, por ejemplo, para asegurar la densidad celular (llamada Quorum sensing, QS). En *Pseudomona aeruginosa* el QS ha sido vinculado a la formación de biofilm y a la producción de factores de virulencia. Esta extraordinaria habilidad para adaptarse a diferentes microambientes permite que los biofilms sean más resistentes, facilitando su sobrevivencia. Las bacterias que forman biofilms son 1000 veces más resistentes al tratamiento con antibióticos. Las infecciones por biofilm son importantes clínicamente debido a que las bacterias en biofilm exhiben una mayor resistencia al tratamiento con antibióticos y persistencia a pesar de las defensas del hospedero. También una población heterogénea metabólicamente hablando permite la existencia de diferentes microcolonias^{3,12}. Zonas dentro del biofilm sin nutrientes, pueden resultar en bacterias en fase estacionaria provocando hibernación dentro del biofilm, contribuyendo así a una mayor resistencia a los antibióticos^{13,14}. Por lo tanto, la limitada penetración de nutrientes, más que restringir la difusión de antibióticos podría contribuir a una resistencia generalizada o tolerancia a los antibióticos^{15, 16, 17, 18}.

Aunque la matriz podría no inhibir la penetración del antibiótico al interior del biofilm, podría si retrasar la entrada y de esta manera permitir la expresión de genes que desarrollen la resistencia¹⁹. También la carga de los polímeros 13 y las enzimas degradadoras de antibióticos sobre la matriz podría contribuir a dicha resistencia. Por lo tanto, encontramos diferentes mecanismos por medio de los cuales el biofilm exhibe una mayor resistencia al tratamiento con antibióticos y esto hace que dependa del tipo de bacteria que forme el biofilm y del tipo de antibiótico.

Biofilms como agentes etiológicos de enfermedades infecciosas en humanos

Los biofilms están asociados con la generación de diferentes enfermedades tales como: caries, periodontitis, neumonía, gastroenteritis, infecciones del tracto urinario, otitis, conjuntivitis, etc. Como cualquier otra enfermedad infecciosa los biofilms reflejan la interacción de un agente patógeno con su hospedero. Muchas infecciones asociadas a biofilm comienzan con la interacción de la bacteria con tejido epitelial, favoreciendo la adhesión y colonización. Las infecciones por biofilm están asociadas a bacterias patógenas u oportunistas con padecimientos crónicos. Microorganismos tales como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, y *S. aureus* podrían ser encontrados en pacientes asintomáticos ya que pueden colonizar, pero no precisamente generar infección. Normalmente una colonización (presencia del microorganismo) es diferenciada de una infección por evidencia de un proceso patológico en el hospedero, tal como inflamación. Por lo tanto, un problema para la asociación de enfermedad con un biofilm, es diferenciar si este último realmente es el agente causal de la patología o si solo es un comensal.

Los biofilms también constituyen un gran problema para su diagnóstico. Podría presentarse un resultado negativo de laboratorio indicando una etiología infecciosa negativa, se podrían manifestar signos y síntomas de infección. La dificultad para identificar infecciones de biofilm in vivo ha conducido al establecimiento de criterios para diagnosticar infecciones de biofilm de especímenes clínicos por Parsek y Singh y otros^{20,21}. El criterio 1) asociado a superficie, 2) agregados microbiológicos, 3) infecciones

localizadas y 4) resistentes al tratamiento con antibióticos. Fux sugirió que no se puede basar el diagnóstico solamente en resultados de laboratorio, ya que el biofilm se puede perder en el momento de toma de muestra sanguínea o aspirado. Se ha demostrado que la detección de biofilm en implantes ortopédicos es más adecuado si se realiza la toma de muestra directamente de la superficie de la prótesis.²² Hall-Stoodley ha propuesto seis criterios para establecer infecciones asociadas a biofilm. Falta de efectividad del huésped para eliminar el biofilm, acumulación de células pro-inflamatorias en el área de lesión, evidencia de células polimorfonucleares y macrófagos en el área de formación de biofilm, marcador específico de biofilm y en su ausencia, tratar de cumplir los postulados de Koch.²³

Sin duda las bacterias han aprendido a lo largo de cientos de años a sobrevivir, constituyendo desde su forma de crecer una forma de resistencia a las condiciones adversas y, por lo tanto, resistentes al tratamiento con antibióticos. Es fundamental entender su forma de operar en estas micro comunidades y diseñar mejores antimicrobianos que eliminen eficazmente los biofilms asociados a las patologías en el ser humano.

Biofilm endodóntico

El biofilm dentro del sistema de conductos radiculares es una entidad muy compleja y organizada, la complejidad no sólo está relacionada con la naturaleza del biofilm, sino también con la anatomía.^{24,42} Existe una comunidad bacteriana caracterizada por comunidades bacterianas multiespecíficas.²⁵ La infección endodóntica comúnmente es causada por el crecimiento de microorganismos asociados a la dentina. Es importante conocer el concepto de biofilm a la endodoncia microbiológica para comprender el potencial patogénico del biofilm del conducto radicular, así como para formar la base para nuevos enfoques de desinfección. Por otro lado, es primordial entender cómo el biofilm formado dentro del sistema de conductos radiculares resiste a las medidas de tratamiento endodóntico.^{26,43,44}

La etiología de las infecciones endodónticas es heterogénea y probablemente polimicrobiana.²⁷ El fracaso del tratamiento endodóntico puede ocurrir cuando la infección persiste tras el tratamiento, o cuando se les permite a los nuevos microorganismos entrar en el sistema de conductos radiculares. La acción de bacterias en las infecciones endodónticas persistentes puede ser secundaria en comparación con el papel de un poli microbiano capaz de adaptarse a los cambios en el ambiente del conducto radicular. La capacidad de formar biofilms, utilizada por los microorganismos, es un mecanismo de tolerancia y adaptación para sobrevivir en respuesta a condiciones ambientales alteradas.²⁸ La infección del conducto radicular no es un evento aleatorio. Los tipos y mezcla de la flora microbiana se desarrollan en respuesta al ambiente circundante.²⁹

Infección endodóntica

El éxito de la terapia del tratamiento endodóntico depende de qué tan bien eliminemos la microflora patógena del sistema de conductos radiculares y este sigue siendo nuestro objetivo final. Aunque varios hongos, virus y arqueas contribuyen a la diversidad microbiana en infecciones endodónticas, el microorganismo más común que se produce en estas infecciones son las bacterias.³⁰ Algunos microorganismos son resistentes al tratamiento antimicrobiano, incluyendo varillas anaeróbicas Gram negativas como *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Prevotella* y bacterias gram positivas como *Streptococcus gordonii*, *Enterococcus faecalis*, especies de *Actinomyces*, etc.³¹ Nuestro entendimiento actual enfatiza el hecho de que la enfermedad endodóntica es un medio infectado por biofilm, y la eliminación del biofilm bacteriano del sistema de conductos radiculares sigue siendo el foco principal de la enfermedad endodóntica. Desafortunadamente, el medio ambiente del sistema de conductos radiculares es un desafío local para eliminar bacterias adherentes a la superficie del biofilm. Por lo tanto, diferentes antimicrobianos que van desde irrigantes a métodos avanzados tales como láseres, desinfección fotoactivada y nanopartículas se emplean en el manejo de la infección de este sistema de conductos radiculares.³² La nanotecnología es una disciplina con un nuevo enfoque en los campos de la medicina, odontología, investigación, sanidad

e ingeniería.³³ el tratamiento antibacteriano basado en nanopartículas tiene mucho potencial y distintas ventajas cuando se aplica en odontología y endodoncia.³⁴

Tratamiento de las infecciones endodónticas

Existen varios irrigantes y medicamentos los cuales se utilizan dentro del sistema de conductos radiculares disponibles para combatir los patógenos endodónticos. Sin embargo, la evidencia de eliminación completa de estos patógenos mediante el uso de estas soluciones no está registrada en la literatura. El posible desarrollo de especies bacterianas resistentes es uno de los problemas relacionados con la eficacia de los métodos actualmente disponibles en irrigantes y medicamentos. Además, la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares permite que los patógenos endodónticos se oculten en áreas inaccesibles a la acción de los irrigantes. Las nanopartículas antimicrobianas muestran un efecto prometedor a patógenos resistentes en la ciencia farmacéutica como un resultado de sus propiedades fisicoquímicas únicas diferentes a los agentes antimicrobianos usados tradicionalmente, estas nanopartículas destruyen las células bacterianas a través de múltiples mecanismos.

Los antibióticos son fármacos que pueden destruir a las células bacterianas o detener su multiplicación en concentraciones relativamente inocuas para los tejidos huésped y por consiguiente se pueden usar para tratar infecciones causadas por bacterias. Los antibióticos suelen usarse con 2 finalidades: 1) para aprovechar su acción antiinfecciosa o quimioprolifáctica y 2) por su acción curativa o terapéutica sobre las enfermedades infecciosas. En la selección del antimicrobiano será muy útil tener en cuenta sus parámetros farmacocinéticos. Conocer su absorción oral, biodisponibilidad, volumen de distribución tisular, unión a proteínas, semivida, capacidad de llegada al foco de infección, concentración de fármaco en plasma y tejidos (en el flujo crevicular tendrá mayor interés que en la saliva). También conocer su espectro de acción sobre bacterias odontopatógenas. Para que el fármaco sea eficaz no solo debe llegar a la totalidad de la zona afectada por la enfermedad, sino que también debe permanecer allí en la concentración local suficiente durante cierto tiempo hasta neutralizar al agente infeccioso.

El tratamiento local puede permitir concentraciones que no pueden alcanzarse por vía sistémica y puede ser adecuado para agentes demasiado tóxicos. Esta forma de aplicación parece ser especialmente promisorio si la presencia de microorganismos diana se limita a lesiones visibles clínicamente. Para que el fármaco sea eficaz no solo debe llegar a la totalidad de la zona afectada por la enfermedad, sino que también debe permanecer allí en la concentración local suficiente durante cierto tiempo. Los ensayos clínicos revelan la eficacia del tratamiento con antibióticos locales con estas condiciones.

Clindamicina

Se trata de un antibiótico especialmente activo frente a organismos aerobios y anaerobios grampositivos, incluyendo los productores de betalactamasas. Sigue siendo el tratamiento de elección en pacientes alérgicos a los betalactámicos. Las concentraciones bajas del fármaco son bacteriostáticas, pero adquiere poder bactericida a concentraciones terapéuticas con las dosis recomendadas en la clínica. Con este antibiótico se obtienen concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) muy bajas frente a bacterias anaerobias de las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*, mientras que *A. actinomycetemcomitans* se muestra resistente. Diversos ensayos clínicos han demostrado que clindamicina es un fármaco eficaz en el tratamiento de las infecciones odontogénicas.³⁵ Recientemente, se han propuesto su uso en combinación con ciprofloxacino y metronidazol, incluyendo amoxicilina, cefaclor y doxiciclina.^{36,37,38}

Por otra parte, existe una solución de irrigación diferente: Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggio`, Italia) es una mezcla de doxiciclina (50 mg por 5 ml), ácido cítrico y polipropilenglicol.³⁹ Tetraclean, se usa como un enjuague final durante la preparación del conducto radicular; es capaz de eliminar los microorganismos y la capa de lodillo dentinario en los túbulos dentinarios de los conductos radiculares infectados con un enjuague final de 4 minutos.^{39,40,41.}

El gluconato de clorhexidina (CHX) se ha sugerido como un irrigante endodóntico con sus ventajas incluyendo efectos antibacterianos, menor citotoxicidad que NaOCl, existencia de sustantividad y rendimiento clínico eficiente.^{42,43} La clorhexidina es efectiva contra microorganismos grampositivos y gramnegativos ya que es un agente antimicrobiano de amplio espectro.⁴⁴ La clorhexidina se utiliza como el estándar de oro antimicrobiano con actividad quimioterapéutica más potente contra muchos microbios.^{45,46} Es bacteriostático en baja concentración y bactericida en alta concentración.⁴⁷

Amfotericina B

La amfotericina B deoxicolato es un compuesto poliénico cuyo efecto antifúngico se logra mediante la interacción directa con el ergosterol de la membrana celular fúngica. Amfotericina B no interfiere con la síntesis de la membrana, sino que la desestabiliza, facilitando la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares. Inhibe una bomba de protones en *Candida albicans* e induce la peroxidación de los lípidos de membranas. Este compuesto tiene el mayor espectro de acción antifúngico conocido, incluyendo levaduras como *Candida* y *Cryptococcus* y hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Rhizopus* spp y *Fusarium* spp. Amfotericina B ejerce al igual que caspofungina un efecto postantifúngico mayor a 12 horas de duración contra *Candida* spp⁶.

Amfotericina B es una herramienta terapéutica de demostrada utilidad en el manejo de diferentes infecciones fúngicas o en el tratamiento empírico de pacientes con una infección probable, como: candidiasis sistémica, aspergilosis invasora pulmonar o extrapulmonar, criptococosis meníngea, mucormicosis y en el manejo de pacientes neutropénicos febriles sin respuesta al tratamiento antibacteriano. En este último grupo, los resultados de un meta-análisis sugieren que amfotericina B podría ser el único preparado asociado a una disminución de la mortalidad de esta condición, a diferencia de otros compuestos antifúngicos.¹

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Activación y crecimiento de microorganismos

Los microorganismos empleados en este estudio fueron adquiridos en la American Type Culture Collection (ATCC). La activación y crecimiento de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (ATCC; 33478, 10558, BAA-308, 33592, 11420 y 90029) se realizó en medio tripticaseína de soya (TSB) (BD Difco™, Sparks MD, USA) a 37°C en condiciones aeróbicas. Los microorganismos fueron contados empleando una cámara de Neubauer para el desarrollo de los ensayos antimicrobianos y antibiofilm.

Síntesis del hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B

Para obtener el hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B; 50 mL de agua destilada estéril fue calentada a 70°C y lentamente se adicionaron 0.5g de carbopol (Sigma Aldrich, MO, USA) y fueron mezclados mediante agitación magnética. Luego se agregaron 2 ml de la solución con Clindamicina y Amfotericina B para obtener una concentración final de 1% y se continuó mezclando por agitación magnética. A continuación, se agregaron 500 µL de trietanolamina (TEA; Sigma Aldrich, MO, USA) y empleando más agua estéril se aforo a 100 de volumen final de la solución. Bajo estas condiciones experimentales el gel final posee una concentración final de 1% de Clindamicina y Amfotericina B y se almacenará a 4°C durante 3 meses para evaluar su estabilidad.

Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B

La actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con clindamicina y amfotericina B fue determinada utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro] (Biotium, Hayward, CA) (Mosmann 1983; Liu et al. 1997). 1×10^4 células fueron inoculadas en 100 μ l de medio TSB en placas de poliestireno de 96 pozos. Como control de crecimiento se emplearon microorganismos cultivados en medio TSB sin ninguno inhibidor. Clorhexidina al 0.12% (Ultradent, South Jordan, UT), CTAB 1% e hipoclorito de sodio 2.5% fueron utilizados como inhibidores positivos. El hidrogel con clindamicina y amfotericina B al 1% se empleó para interferir con el crecimiento microbiano. La placa de 96 pozos fue incubada a 37 °C durante 18 horas. 10 μ l de MTT fueron añadidos a cada pozo, la placa se protegió contra la luz y se incubó a 37 °C, por 2 hrs. 200 μ l de Dimetilsulfoxido (DMSO) fue añadido para disolver el MTT reducido. El número de células vivas fue determinado por un lector de absorbancia de microplaca (Biorad, Philadelphia, PA) a 595nm. El experimento fue repetido tres veces y la densidad óptica medidas fue analizada por estadística descriptiva.

Actividad antibiofilm del hidrogel cargado con Clindamicina y Amfotericina B sobre biofilm multiespecie intraconducto

La actividad antibiofilm del hidrogel con medicamentos se analizó empleando el ensayo con diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). FDA fue disuelta en DMSO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) y mantenida a -20°C en una solución stock (10 mg/ml). Para evaluar la capacidad del hidrogel cargado con 1% de Clindamicina y Amfotericina B para remover el biofilm formado por *E. faecalis* solo o cultivo mixto siguiendo el protocolo anteriormente descrito con una ligera modificación. Se siguió la siguiente estrategia: se hizo crecer el biofilm de *E. faecalis* o multiespecie en placas de poliestireno de 96 pozos durante 24hrs y luego se agregó el hidrogel cargado con medicamentos y clorhexidina, CTAB, e hipoclorito de sodio como controles positivos. Se dejó actuar por 24h y FDA fue diluida a 10 μ g/ml 200 μ L fueron añadidos a cada pozo. Se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se analizó el

biofilm remanente mediante una lectora de placas de 96 pozos GloMax® Multi + Microplate Multimode (Promega, Madison, WI) a 495 nm y los datos obtenidos fueron analizados para obtener el porcentaje de viabilidad celular post-tratamiento.

Análisis estadístico

Prueba D'Agostino-Pearson K2 utilizada para evaluar la normalidad de los datos. Análisis de varianza (ANOVA) y pruebas d t de Student fueron utilizadas para evaluar los efectos de los tratamientos, y la prueba de Dunnett para las diferencias entre los tratamientos y los grupos de control. Se consideraron todas las pruebas estadísticas, nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

8. RESULTADOS

Evaluación de la estabilidad del hidrogel con clindamicina y anfotericina B

Para analizar la estabilidad y durabilidad del hidrogel desarrollado con clindamicina y anfotericina B, se midió la pérdida de peso a lo largo del periodo de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados muestran que a los 8 días se pierde el 50% del peso del hidrogel (Figura 1). A los 3 días de su elaboración, se conserva poco más del 80% del peso del hidrogel.

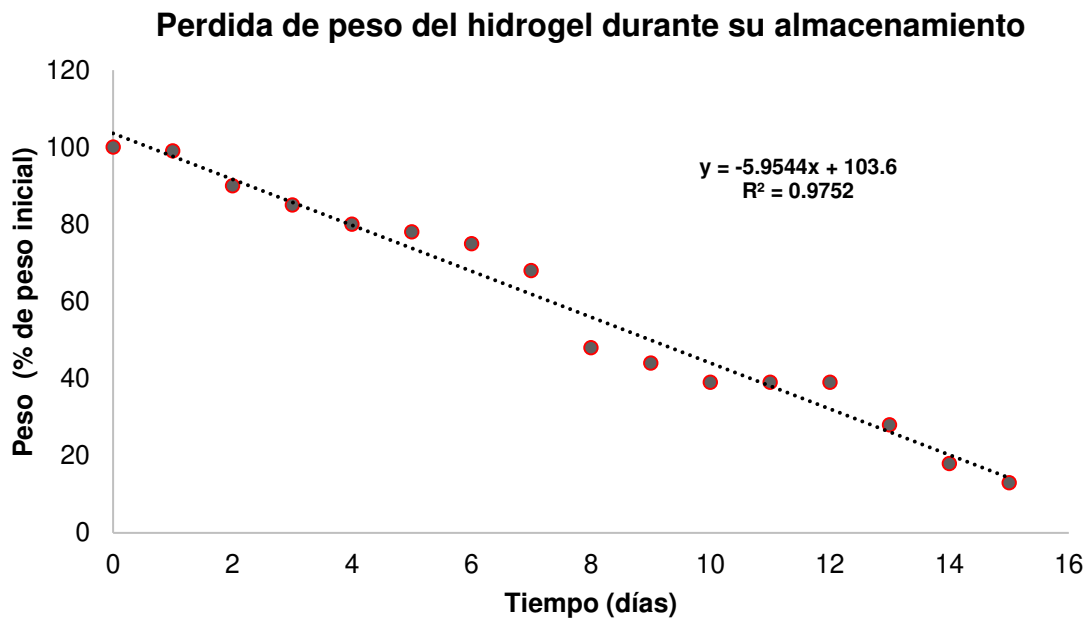


Figura 1. Estabilidad del hidrogel con 1% de clindamicina y anfotericina B. Medición de la pérdida de peso del hidrogel durante su almacenamiento a temperatura ambiente.

Actividad antimicrobiana del hidrogel con clindamicina y amfotericina B

Al analizar la actividad antimicrobiana del hidrogel con clindamicina y amfotericina B se encontró que inhibió el crecimiento de *E. faecalis* con la misma eficacia que clorhexidina e hipoclorito de sodio (Figura 2). CTAB y SDS superaron ligeramente la actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con medicamentos (Fig. 2).

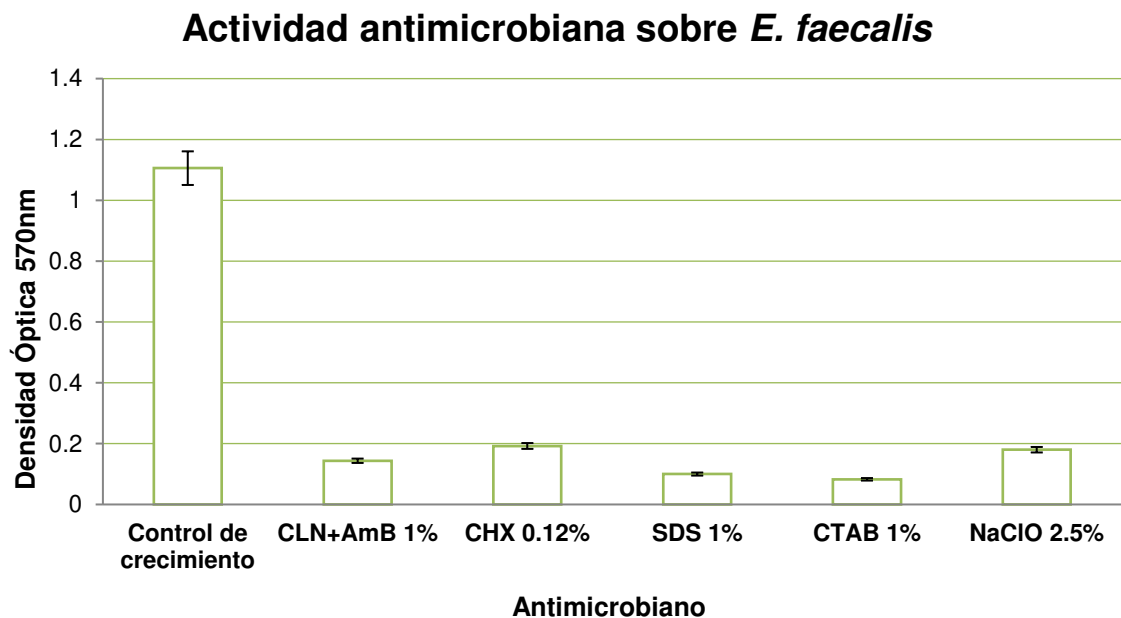


Figura 2. Actividad antimicrobiana del hidrogel con 1% de clindamicina y amfotericina B sobre el crecimiento de *E. faecalis* por el ensayo de viabilidad celular MTT.

La actividad antimicrobiana del hidrogel con clindamicina y amfotericina B sobre un cultivo mixto incluyendo el hongo *C. albicans* fue similar al efecto observado solo con *E. faecalis* (Figura 3), superando el hidrogel al efecto obtenido con hipoclorito de sodio y clorhexidina.

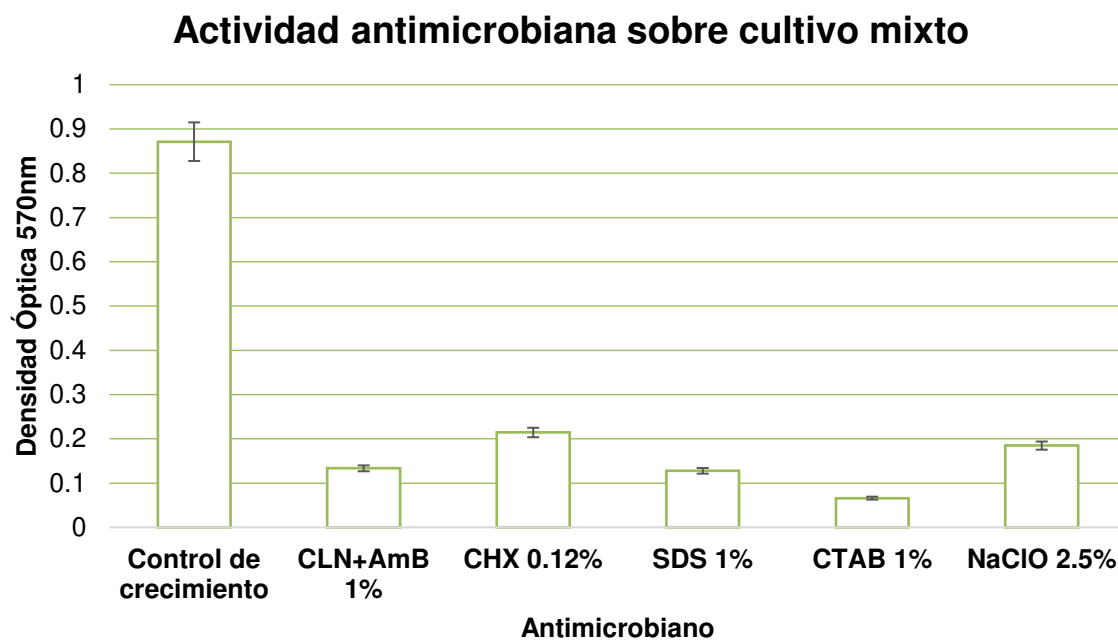


Figura 3. Actividad antimicrobiana del hidrogel con 1% de clindamicina y anfotericina B sobre el crecimiento de cultivo mixto por el ensayo de viabilidad celular MTT.

Actividad antibiofilm del hidrogel con clindamicina y anfotericina B

Al analizar la actividad antibiofilm del hidrogel con clindamicina y anfotericina B se encontró que removió el 71.9% del biofilm de *E. faecalis* 24h post-tratamiento (Figura 4). Supero en efectividad a la clorhexidina y fue la misma eficiencia que la del hipoclorito de sodio y CTAB.

Efectividad antibiofilm sobre *E.faecalis*

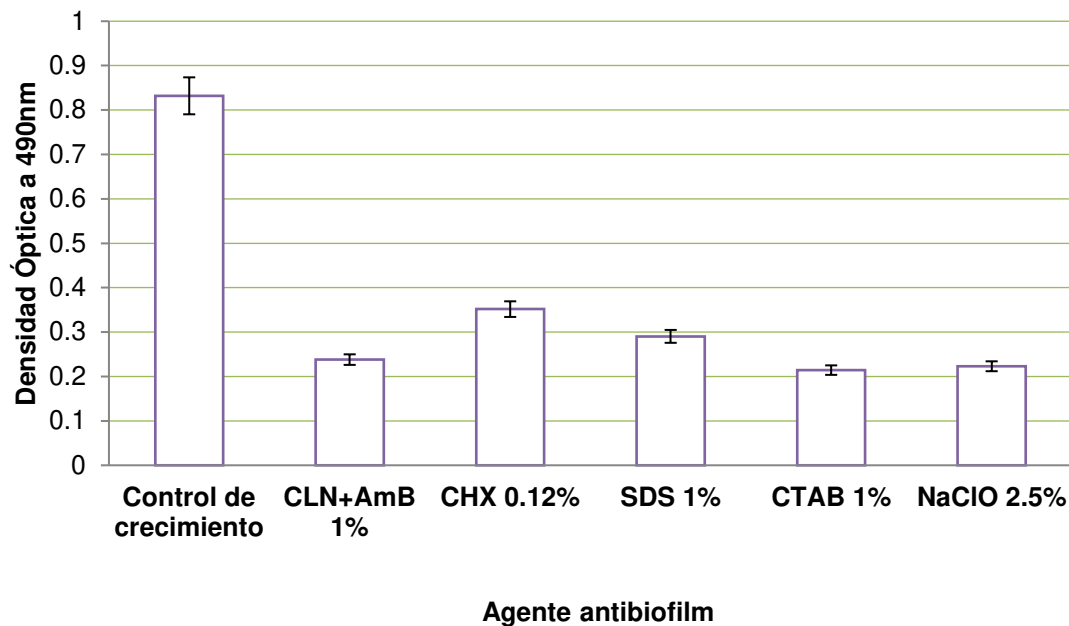


Figura 4. Actividad antibiofilm del hidrogel con 1% de clindamicina y amfotericina B sobre un biofilm de 24h de *E. faecalis* por el ensayo de FDA y microscopia fluorescencia.

La actividad antibiofilm del hidrogel con clindamicina y amfotericina B se encontró que removió el 65.9% de un biofilm mixto 24h post-tratamiento (Figura 5). El efecto obtenido con hipoclorito de sodio y CTAB fue mejor que el obtenido con el hidrogel.

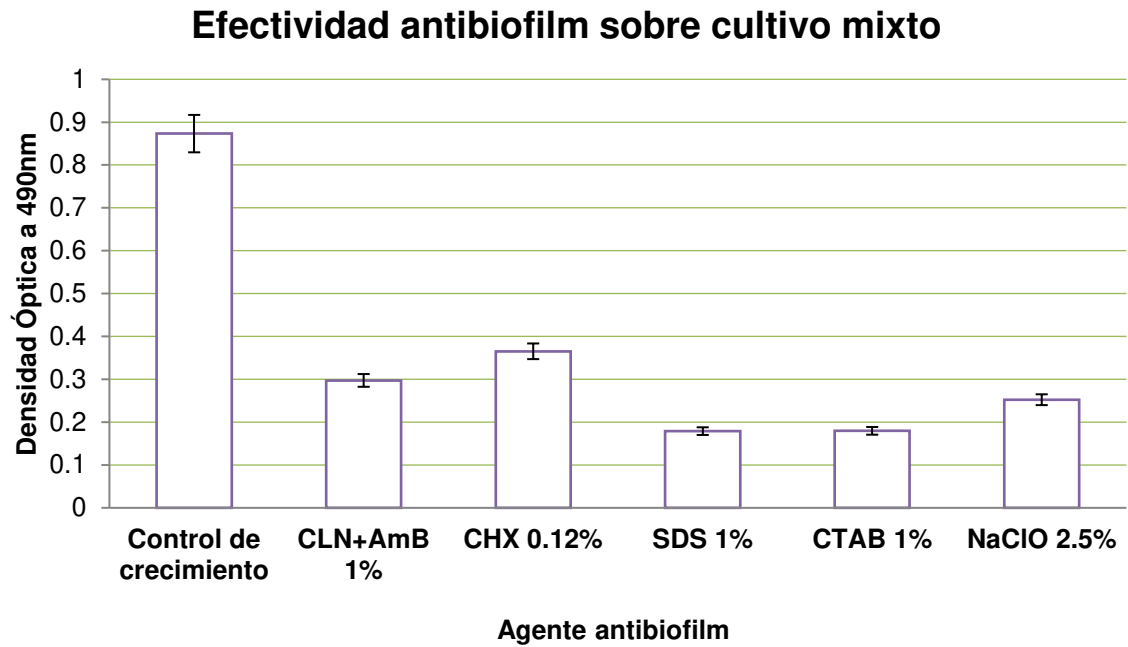


Figura 5. Actividad antibiofilm del hidrogel con 1% de clindamicina y amfotericina B sobre un biofilm mixto de 24horas por el ensayo de FDA y microscopia fluorescencia.

9. DISCUSIÓN

Un factor clave para el éxito en el tratamiento de las infecciones endodónticas radica en la desinfección del sistema de conductos radiculares. También puede influir el sellado y la instrumentación, pero sin duda la clave está en erradicar por completo el biofilm formado por microorganismos intraconducto. El rol de las bacterias creciendo en biofilm intraconducto, túbulos dentinarios y ramificaciones han sido asociadas a fallo del tratamiento endodóntico debido probablemente a la evasión de los desinfectantes (hipoclorito de sodio o clorhexidina)^{34,35}. o a un tiempo muy corto de exposición a estos^{35,36} La probabilidad de un tratamiento exitoso es más alta cuando se ha realizado una limpieza y desinfección completa del canal radicular infectado. Sin embargo, una instrumentación excesiva puede incrementar la susceptibilidad de fractura de la pieza dental del paciente, por lo tanto, se incurriría en una negligencia médica por parte del cirujano dentista.

En este estudio se encontró que el hidrogel con clindamicina y amfotericina B inhibió el crecimiento de *E. faecalis* solo y en cultivo mixto, con similar eficacia que hipoclorito de sodio y clorhexidina. Mozayeni y cols., en el 2014 reporto el uso de antibioticos intraconducto para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* concordando con nuestros resultados. Leonardo MR, y cols., describió en 1999 la efectividad intraconducto de clorhexidina al 2%, en nuestro estudio encontramos similar eficacia, pero con clindamicina y amfotericina B al 1%, la mitad de concentración.

El antiséptico más empleado en el área odontológica es la clorhexidina. Normalmente se emplea en enjuague bucal al 0.12% o bien de forma directa 2% para desinfectar en tratamiento endodóntico u otros. Sin embargo, a pesar de la alta actividad antimicrobiana y antibiofilm que posee, varios reportes también indican la alta citotoxicidad que presenta además de su potencial cancerígeno.

Uno de los resultados más importantes de nuestro estudio es la eficacia antimicrobiana del hidrogel contra un cultivo mixto incluyendo bacterias y hongos. Previamente se ha reportado el uso de antibioticos intraconducto a lo que se llamó “pasta triple antibiótica” (William y cols., 2005) sin embargo su eficacia solo radica temporalmente ya que a los 20 minutos solidifica como roca y no posee ningún efecto antimicrobiano. La efectividad antibiofilm del hidrogel fue similar a la obtenida con hipoclorito de sodio, lo cual concuerda con el reporte previo de Berutti y cols, 1997 donde se analizó la desinfección con hipoclorito y su presencia en túbulos dentinarios.

Wu y cols., sugieren fuertemente que la eficacia antibiofilm de AgNPs depende del modo de aplicación. Las AgNPs como medicamento intraconducto y no como irrigante mostraron un potencial en la eliminación de Biofilm durante la desinfección del Sistema de conductos radiculares.⁴¹

Previos reportes han descrito el empleo de hidrogeles como un sistema de liberación local de fármacos. El efecto de liberación de bleomicina fue evaluado sobre un hidrogel de goma *guar* sobre tumor de fibroblastos en ratones con muy buenos resultados.³⁸ Hidrogeles a base de hidrocélulosa cargados con nitrato de plata han sido reportados con actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.³⁹ Por otro lado hidrogeles a base de carbopol suplementados con metronidazol han sido propuestos para liberación tópica para el tratamiento de vaginosis bacteriana.⁴⁰

Estos reportes muestran la eficiencia de diferentes clases de hidrogeles como sistema de liberación local, mostrando mejores resultados que el uso de pastas que al solidificar no presentan ningún efecto antimicrobiano y son difíciles de remover.

10. CONCLUSIONES

El hidrogel biodegradable cargado con Clindamicina y Amfotericina B añadiéndolo directamente como medicamento intraconducto es capaz de remover el biofilm heterogéneo intraconducto incrementando las probabilidades de éxito del tratamiento endodóntico. Se propone el uso de este hidrogel posterior a las irrigaciones con hipoclorito de sodio y reemplazar al hidróxido de calcio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Siqueira JF, Jr, Antunes HS, RoÃcEãs IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS ONE* 2016;11(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0162887
2. Jhajharia K, Parolia A, Shetty K V, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*.2015;5(1): 1-12
3. Tronstad L, Titterud Sunde P. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endod Top*. 2003; 6(1):57–77.
4. Di Filippo et al. The role of biofilms in endodontic treatment failure. *ENDO (Lond Engl)* 2014; 8(2):87–103.
5. D Figdor, G Sundqvist. A big role for the very small — understanding the endodontic microbial flora. *Australian Dental Journal Supplement*. 2007;52:(1):S38-S51
6. Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*. 2009;88(11):969-81.
7. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod*. 1997;23(12):725-27.
8. Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms *.Endodontic Topics*.2012;22: 99-123
9. Mallya L, Kanchana. Applications of Nanotechnology in Dentistry. *Journal of International Medicine and Dentistry* 2015; 2(3): 186-203
10. William W 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005;31:439-43
11. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185–7.

12. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics—biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J* 2010;55:446–52
13. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J* 2013;46:910–22
14. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J* 2010;43:528–35.
15. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32:1091
16. Poggio et al. In vitro antibacterial activity of different endodontic irrigants. *Dental Traumatology* 2012; 28: 205–209
17. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; (34): 424–8.
18. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; (25): 167–71.
19. Bhardwaj A, Ballal S, Velmurugan N. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2012;(15):293-7.
20. Agarwal P, Nagesh L, Murlikrishnan. Evaluation of the antimicrobial activity of various concentrations of Tulsi (*Ocimum sanctum*) extract against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 2010;(21):357-9.
21. Prabhakar AR, Basavraj P, Basappa N. Comparative evaluation of *Morinda citrifolia* with chlorhexidine as antimicrobial endodontic irrigants and their effect on

- micro-hardness of root canal dentin: An in vitro study. *Int J Oral Health Sci* 2013;(3):5-9
22. Bazvand L, Aminozarbian MG, Farhad A, Noormohmmadi H, Hasheminia SM, Mobasherizadeh S. Antibacterial effect of triantibiotic mixture, chlorhexidine gel, and two natural materials Propolis and Aleo vera against *Enterococcus faecalis*: An ex vivo study. *Dent Res J (Isfahan)* 2014;(11):469-74.
 23. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* 2016; 42 (10), pp. 1417-26.
 24. Bufflier P, Suchett-Kaye G, Morrier JJ, Benay G, Decoret D, Bonin P, et al. Invitro evaluation of the antibacterial effects of intracanal microplasma system treatment. *J Endod.* 1997;(23):28-31.
 25. Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis*. *Iran Endod J.* 2012;7(3):149-55.
 26. Taneja S, Kumari M, Parkash H. Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemp Clin Dent.* 2010;1(1):31-5.
 27. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2009;35(10):1343–49.
 28. Andersson M. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003;51(90001):1-11.
 29. Roopadevi Garlapati et al., Antimicrobial Efficacy of Two Experimental Root Canal Irrigants. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016 Mar, Vol-10(3): ZC57-ZC60
 30. Ashik Ali Lakhani et al., Antimicrobial Activity of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide and 2% Chlorhexidine. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2017 Jan, Vol-11(1): ZC06-ZC09
 31. Jayasimha Raj and Mylswamy: Non-antibiotics as intracanal medicaments. *Journal of Conservative Dentistry | Apr-Jun 2011 (14) Issue 2*

32. Mozayeni et al. Antimicrobial Effects of Four Intracanal Medicaments on *Enterococcus Faecalis*: An *in Vitro* Study. IEJ Iranian Endodontic Journal 2014;9(3):195-198
33. Fica C, A., *Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: Anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas.* Revista chilena de infectología, 2004. **21**: p. 317-326.
34. Goncalves, L.S., et al., *The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials.* J Endod, 2016. **42**(4): p. 527-32.
35. Kim, D. and E. Kim, *Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies.* Restor Dent Endod, 2014. **39**(4): p. 241-52.
36. Lin, L.M., et al., *Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1991. **71**(5): p. 603-11.
37. Lin, L.M., J.E. Skribner, and P. Gaengler, *Factors associated with endodontic treatment failures.* J Endod, 1992. **18**(12): p. 625-7.
38. Fantozzi, F., E. Arturoni, and R. Barbucci, *The effects of the electric fields on hydrogels to achieve antitumoral drug release.* Bioelectrochemistry, 2010. **78**(2): p. 191-5.
39. Gupta, A., et al., *Characterisation and in vitro antimicrobial activity of biosynthetic silver-loaded bacterial cellulose hydrogels.* J Microencapsul, 2016. **33**(8): p. 725-734.
40. Singh, V.K., et al., *Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **44**: p. 151-8.
41. Daming Wu, Wei Fan, Anil Kishen, James L. Gutmann, Bing Fan. (February 2014). Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. Journal of Endodontics, **40**, 285,290.

42. Mariane F.L.S. Lacerda, Marília F. Marceliano-Alves, Alejandro R. Pérez, José C. Provenzano, Mônica A.S. Neves, Fábio R. Pires, Lucio S. Gonçalves, Isabela N. Rôças, José F. Siqueira Jr. (November 2017). Cleaning and Shaping Oval Canals with 3 Instrumentation Systems: A Correlative Micro-computed Tomographic and Histologic Study. *JOE*, 43, 1878,1884
43. Siqueira Junior JF, Rôças IN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. . (October, 2018). Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz. oral res.*, 32, 1-19.
44. J. F. Siqueira Jr A. R. Pérez M. F. Marceliano-Alves J. C. Provenzano S. G. Silva F. R. Pires G. C. S. Vieira I. N. Rôças F. R. F. Alves. (may, 2018). What happens to unprepared root canal walls: a correlative analysis using micro-computed tomography and histology/scanning electron microscopy. *IEJ*, 51, 501-508