

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFFECTO ANTIFÚNGICO DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA
MODIFICADA CON FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* IN VITRO**

POR

ADRIÁN MAURICIO DE LA GARZA TREVIÑO

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

NOVIEMBRE, 2019

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA
MODIFICADA CON FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* IN VITRO

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

TESISTA
ADRIÁN MAURICIO DE LA GARZA TREVIÑO

Comité de Tesis

DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
Director de Tesis

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
Co-Director de Tesis

DR. RENE HERNÁNDEZ DELGADILLO
Asesor Metodológico

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ
Asesor Estadístico

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA
MODIFICADA CON FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* IN VITRO

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
Coordinador del Posgrado de Endodoncia

DRA. ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA
Subdirector de la Subdivisión de Estudios de Posgrado
de la Facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Nuevo León

APROBACIÓN DE TESIS

LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA A LA MISMA; COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Comité de tesis

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Casiano Del Angel Mosqueda por haber tenido la atención hacia mí y apoyarme durante toda la investigación, con sus consejos, sabiduría y sobre todo con su tiempo, ya que sin su ayuda, no se habría culminado este proyecto

Al Dr. Rene Hernández por habernos ayudado en el manejo de la *Candida albicans* y en todo la metodología que implican los hongos.

Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, por haber estado al pendiente de nuestros proyectos y ofreciéndonos siempre su apoyo y conocimientos.

A mi familia, por haber estado siempre ahí, aunque sea a la distancia, pero nunca faltaron los mensajes de apoyo ni de aliento para seguir adelante.

A Dios por iluminar a mi familia y haberme dado la oportunidad de estudiar una maestría, a base de esfuerzo y dedicación.

También quiero agradecer al Dr. Ricardo Escalante por haberme orientado durante estos 2 años en todo momento, y por siempre encontrar las palabras para motivarme a seguir y sobre todo por su amistad tan sincera y transparente.

A la Dra. Mayra Martínez por su vocación de ayudar a la gente cuando más se necesita, ya que nunca faltó una porra, un ánimo o cualquier palabra de apoyo hacia mí y por su incansable labor tanto como maestra y amiga.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Endodoncia.....	5
4.2 Microbiología.....	7
4.3 Candida albicans.....	8
4.4 Regeneración pulpar.....	9
4.5 Células madre de papila apical.....	11
4.6 Medicación intraconducto.....	12
5. MARCO DE REFERENCIA.....	14
6. MÉTODOS.....	21
7. RESULTADOS.....	25
8. DISCUSIÓN.....	28
9. CONCLUSIONES.....	30
10. LITERATURA CITADA.....	31
11. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	37

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Comparación entre grupo control y grupos experimentales sobre la inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i> in vitro.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 – Pre-cultivo de <i>C. albicans</i> a 18 horas previas a ser sembradas en el Agar.....	22
2 – Siembra de <i>C. albicans</i> en Agar Dextrosa Sabouraud mediante método de Estriado.....	22
3 - Aplicación de Esponjas de Colágeno a diferentes concentraciones en pozos de Agar.....	23
4 – Inhibición de crecimiento de <i>C. albicans</i> a 24 horas.....	25
5 - Inhibición de crecimiento de <i>C. albicans</i> a 48 horas.....	26

NOMENCLATURA

DAP	Pasta doble antibiótica
TAP	Pasta triple antibiótica
NaOCl	Hipoclorito de sodio
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
SCAPs	Células madre de papila apical
CHX	Clorhexidina
MIC	Concentración mínima inhibitoria
H₂O	Agua
EPS	Sustancia extracelular polimérica

Nombre: Adrián Mauricio de la Garza Treviño
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Odontología
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia
Páginas: 37

Título de Estudio: Efecto antifúngico de una solución doble antibiótica modificada con Fluconazol sobre *Cándida albicans in vitro*

RESUMEN

Introducción: Dentro de la infección endodóntica primaria se pueden encontrar, además de múltiples especies de bacterias, la presencia de *Candida albicans* y el uso de antibióticos no es suficiente para su erradicación. **Objetivo:** Evaluar el efecto antifúngico de una solución doble antibiótica modificada con fluconazol sobre *Candida albicans in vitro*. **Métodos:** Se realizó la preparación de la solución doble antibiótica modificada con Fluconazol en tres concentraciones diferentes (.4 mg/ml, .2 mg/ml y .1 mg/ml). Como grupo control se preparó DAP (ciprofloxacino y metronidazol 1:1) mezclada con propilenglicol. Las soluciones fueron embebidas en esponjas de colágeno y colocadas en pozos de Agar con *Candida albicans* previamente sembrado, y se evaluó su crecimiento a las 24 y 48 horas. **Resultados:** Se observó que la solución doble antibiótica con Fluconazol, tiene efecto antifúngico a bajas concentraciones y que la DAP no es eficaz para la erradicación de *C. albicans*. **Conclusión:** Por lo tanto, la esponja de colágeno cargada con la solución doble antibiótica modificada con fluconazol podría ser una alternativa efectiva para erradicar *C. albicans* durante procedimientos regenerativos en endodoncia.

Palabras clave: *Candida albicans*, Fluconazol, Pasta doble antibiótica, Esponja de colágeno

Name: Adrián Mauricio de la Garza Treviño
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Odontología
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia
Pages: 37

Study Title: Antifungic effect of a double antibiotic solution with Fluconazole over *Candida albicans in vitro*

ABSTRACT

Introduction: Within the primary endodontic infection can be found, in addition to multiple species of bacteria, the presence of *Candida albicans* and the use of antibiotics is not enough for eradication. **Objective:** To evaluate the antifungal effect of a double antibiotic solution modified with fluconazole on *Candida albicans* in vitro. **Methods:** The preparation of the double antibiotic solution modified with Fluconazole was carried out in three different concentrations (.4 mg / ml, .2 mg / ml and .1 mg / ml). As a control group, DAP (ciprofloxacin and metronidazole 1: 1) prepared with propylene glycol. The solutions were embedded in collagen sponges and placed in agar with previously seeded *Candida albicans*, and their growth was evaluated at 24 and 48 hours. **Results:** It was observed that the double antibiotic solution with Fluconazole has an antifungal effect at low concentrations and that DAP is not effective for the eradication of *C. albicans*. **Conclusion:** Therefore, the collagen sponge loaded with the double antibiotic solution modified with fluconazole could be an effective alternative to eradicate *C. albicans* during regenerative procedures in endodontics.

Keywords: *Candida albicans*, Fluconazole, Double antibiotic paste, Collagen sponge

1. INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica regenerativa ha demostrado relevancia clínica para tratar dientes inmaduros con pulpa necrótica (Chen and Chen, 2016). El objetivo principal de este tratamiento es continuar con el desarrollo de la raíz, reduciendo el riesgo de fracturas asociadas con una apexificación con hidróxido de calcio (Adel *et al.*, 2014).

La medicación intraconducto en procedimientos regenerativos es un factor crítico para obtener resultados exitosos (McTigue *et al.*, 2013). Al respecto, la mezcla tradicional de antibióticos como la pasta triple antibiótica (TAP) que contiene ciprofloxacino, metronidazol y minociclina ha demostrado ser eficaz. Los medicamentos intraconducto utilizados son el hidróxido de calcio, formocresol y la pasta doble antibiótica (DAP). La DAP está compuesta de los mismos antibióticos, excepto la minociclina, la cual ha demostrado efectos sobre la coloración del diente (Chuensombat *et al.*, 2013).

En este contexto, para obtener una consistencia aceptable de la DAP, se requiere una alta concentración de estos antibióticos (Daniel *et al.*, 2016). Algunas investigaciones han descrito su efecto citotóxico sobre las células madre de papila apical (SCAPs), (Ruparel *et al.*, 2012) y células madre de pulpa dental (DPSCs) (Sabrah *et al.*, 2015). Por lo tanto, estudios recientes han recomendado el uso de concentraciones más bajas de estos medicamentos que varían de 0.1 a 2 mg /mL para disminuir su citotoxicidad (Daniel *et al.*, 2016).

Por otra parte, Se han encontrado, hongos cultivables en infecciones endodónticas, tanto primarias como resistentes. Los hongos pueden producir enfermedad

cuando hay factores locales o sistémicos predisponentes del individuo (Baumgartner *et al.*, 2000).

Dentro de la microbiota humana oral, encontramos al *Candida albicans* (*C. albicans*), el cuál puede existir en armonía con otros miembros de esta microbiota, pero si hay alguna perturbación en el balance delicado, como por ejemplo: variaciones en el ambiente local (cambios en el pH o nutricionales), uso de antibióticos, o alteraciones en el sistema inmune, pueden causar que *C. albicans* prolifere rápidamente y cause infección. (Gulati and Nobile, 2016), a pesar de ello no existen medicamentos intraconducto que garanticen la erradicación de este microorganismo, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de fluconazol sobre el crecimiento de *C. albicans* al ser mezclado en la solución doble antibiótica in vitro. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia que el fluconazol erradica *C. albicans* en el conducto radicular.

2. HIPÓTESIS

La solución doble antibiótica modificada con fluconazol tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. albicans* in vitro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico de una solución doble antibiótica modificada con fluconazol sobre *C. albicans in vitro*

3.2 Objetivos específicos

- Obtener una esponja de colágeno cargada con una solución doble antibiótica modificada con fluconazol utilizando incubación.
- Cultivar una población de *C. albicans* mediante Agar Dextrosa Sabouraud.
- Determinar el halo de inhibición de *C. albicans* expuesta a una solución doble antibiótica modificada utilizando el método de difusión en agar

4. ANTECEDENTES

4.1 Endodoncia

La endodoncia es la rama de la odontología que se enfoca en el estudio de la morfología, fisiología y patologías de la pulpa dental y de los tejidos perirradiculares. Estudia las ciencias básicas y clínicas de la pulpa sana y etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de las afecciones de la pulpa y de los tejidos perirradiculares (AAE, 2016).

Estas patologías se han ido clasificando con el paso de los años, y diferentes organismos han hecho diversas propuestas.

Sin embargo, una de las Instituciones más prestigiadas es la Asociación Americana de Endodoncia (AAE). La cuál está en constante cambio y al día con información veraz y acertada.

Según la AAE la clasificación actual sobre el diagnóstico endodotal es la siguiente:

Pulpa normal: Una categoría de diagnóstico clínico en la que la pulpa no presenta síntomas y normal a pruebas pulpares.

Pulpitis reversible: Un diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la inflamación debería resolverse y la pulpa volver a la normalidad.

Pulpitis irreversible sintomática: Un diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos indican que la pulpa inflamada es incapaz de curarse. Descripciones adicionales: dolor térmico persistente, dolor espontáneo, dolor referido.

Pulpitis irreversible asintomática: Un diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican la pulpa inflamada es incapaz de curar. Descripciones adicionales: sin síntomas clínicos pero inflamación producida por caries, excavación de caries, trauma.

Necrosis de la pulpa: Una categoría de diagnóstico clínico que indica la muerte de la pulpa dental. La pulpa usualmente no responde a la prueba de vitalidad.

Previamente tratada: indica que el diente ha sido tratado endodónticamente y los conductos están obturados con varios materiales de relleno además de medicamentos intraconducto.

Terapia iniciada previamente: Una categoría de diagnóstico clínico que indica que el diente ha sido tratado previamente por terapia de endodoncia parcial (p. ej., pulpotomía, pulpectomía).

Tejidos apicales normales: Dientes con tejidos perirradiculares normales que no son sensibles a la percusión o palpación. La lámina dura que rodea la raíz está intacta, y el ligamento periodontal es uniforme.

Periodontitis apical sintomática: Inflamación, generalmente del periodonto apical, que produce síntomas clínicos que incluyen una respuesta dolorosa a morder y / o percusión o palpación. Puede ser o no ser asociado con un área radiolucida apical.

Periodontitis apical asintomática: La inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar aparece como un área radiolucida en apical, y no produce síntomas clínicos.

Absceso apical agudo: Reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis caracterizada por un inicio rápido, dolor espontáneo, sensibilidad del diente a la presión, formación de pus e hinchazón de tejidos asociados.

Absceso apical crónico: Reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis caracterizada por una aparición, poca o ninguna molestia y la descarga intermitente de pus a través de un tracto sinusal asociado.

Osteítis condensante: Lesión radiopaca difusa que representa una reacción ósea localizada de un grado inflamatorio bajo, generalmente visto en el ápice del diente (AAE, 2016).

Objetivos de la endodoncia

El propósito del tratamiento de conductos es debridar completamente y desinfectar el sistema de conductos para erradicar las bacterias o al menos reducirlas a

un nivel por debajo de lo necesario para prevenir la enfermedad periapical o permitir su curación. (Siqueira, 2008). Esto se lleva a cabo mediante la instrumentación mecánica y la desinfección química con irrigantes.

Limpieza y conformación de sistema de conductos radiculares

Los procedimientos de limpieza y desinfección intraconducto están relacionados con los efectos mecánicos y químicos de los irrigantes. El hipoclorito de sodio (NaOCl) se ha utilizado como una solución de irrigación antimicrobiana en diversas concentraciones durante la instrumentación biomecánica en el tratamiento endodóntico (Sena, 2006).

Se han usado varias concentraciones de NaOCl como irrigantes de conductos durante muchas décadas. Las principales ventajas de NaOCl son su capacidad para disolver los tejidos necróticos y sus propiedades antibacterianas contra la mayoría de los microorganismos (Kho, 2006).

Sen et al., probaron las propiedades antifúngicas de CHX .12%, 0.5% de NaOCl y 5% de NaOCl contra *C. albicans* utilizando un modelo cilíndrico de dentina. Ellos informaron que *C. albicans* era más resistente a estas soluciones de irrigación cuando estaba presente smear layer, en su ausencia se muestra que NaOCl tiene actividad antifúngica después de 30 minutos (Sen, 1999).

4.2 Microbiología

Bacterias

Las bacterias desempeñan el papel etiológico primario en el desarrollo de necrosis pulpar, enfermedad periapical y fracaso de tratamientos endodónticos previos. (Kakehashi, 1965).

La evidencia de invasión bacteriana en los túbulos dentinarios ha sido reconocida por más de un siglo, aunque la evidencia experimental del papel de las bacterias en el tratamiento dental se demostró sólo en la década de 1960. La Infección pulpar y la inflamación puede ocurrir a través del contacto directo entre tejidos pulpares y bacterias

orales (por ejemplo, con caries en exposición de la pulpa) o como consecuencia de la migración bacteriana a través de túbulos dentinarios (Taschieri, 2014).

En general, se cree que la principal causa de fracaso en el tratamiento es la supervivencia de microorganismos en la porción apical del diente. A diferencia de las infecciones endodónticas primarias, que son de naturaleza polimicrobiana y están dominadas por anaerobios gram negativos, los microorganismos implicados en las infecciones secundarias están compuestos por algunas especies bacterianas. El *Enterococcus faecalis* es un organismo persistente que, a pesar de constituir una pequeña proporción de la flora en conductos no tratados, juega un papel importante en la etiología de las lesiones perirradiculares persistentes después del tratamiento del conducto radicular (Stuart, 2006).

Es la especie más frecuente en lesiones persistentes. Es un anaerobio facultativo grampositivo capaz de invadir los túbulos dentinarios. Tiene capacidad para unirse a la dentina y forma las comunidades organizadas en biofilms, pueden contribuir a provocar una resistencia bacteriana a varias soluciones de irrigación y medicamentos usados en endodoncia (Basmaci, 2013).

Hongos

Los hongos son microorganismos eucariotas quimioorganotropos que pueden participar en infecciones endodónticas y, por lo tanto, en la etiología de las enfermedades perirradiculares. Poseen atributos de virulencia, incluyendo adaptabilidad a una variedad de condiciones ambientales, adhesión a una variedad de superficies, producción de enzimas hidrolíticas, transición morfológica, formación de biopelículas y evasión e inmunomodulación de la defensa del huésped, que pueden desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades perirradiculares

4.3 Candida albicans

Es la especie de hongo más comúnmente aislada de los conductos radiculares infectados, y esta especie ha sido considerada un microorganismo dentinofílico debido a

su afinidad invasiva con la dentina. También se ha descubierto que *C. albicans* es resistente a algunos medicamentos intraconducto, como el hidróxido de calcio. Su capacidad para invadir los túbulos dentinarios y la resistencia a los medicamentos intraconducto de uso común puede ayudar a explicar por qué *C. albicans* se ha asociado con casos de infecciones persistentes del conducto radicular (Siqueira, 2004).

El inicio y la persistencia de las infecciones por *Candida* en los conductos radiculares dependen de su colonización y penetración en la dentina. Afinidad específica de *C. albicans* por el tipo I a las proteínas de colágeno y matriz extracelular en la dentina promueven la adhesión celular, la colonización y los iones Ca^{2+} facilitan su morfogénesis. Además, *C. albicans* tiene la capacidad de detección de contacto y su dimensión microscópica (levaduras de 1-6 μm e hifas 1.9-2.6 μm de diámetros) les permiten invadir y penetrar túbulos dentinarios. Por lo tanto, para reducir sustancialmente o erradicar *C. albicans* de los conductos radiculares, los medicamentos intraconducto deben tener la capacidad de penetrar en la dentina para así lograr una desinfección (Yoo, 2017).

Biofilm

Una biopelícula se puede definir como comunidades de microorganismos unidos a una superficie, incrustados en una matriz extracelular de polisacáridos. Dentro de estas microcolonias, las bacterias se han convertido en comunidades organizadas con heterogeneidad funcional (Costerton, 1999).

4.4 Regeneración Pulpar

Recientemente, el órgano dental en el desarrollo con ápice inmaduro ha tomado un importante enfoque en la atención. La infección endodóntica o trauma de un diente con un ápice inmaduro puede conducir a la necrosis de la pulpa y la interrupción del desarrollo del diente, dando como resultado raíces con ápice incompleto, longitud de raíz reducida y paredes radiculares delgadas y frágiles. Numerosos estudios han

abordado estrategias de ingeniería de tejidos dirigidas al estudio de la completa formación de las raíces en dientes inmaduros (Tziafas, 2010).

Históricamente, se han logrado resultados endodónticos aceptables mediante procedimientos de apexificación con el uso de hidróxido cálcico a largo plazo. Sin embargo, se han expresado preocupaciones de que la terapia a largo plazo con hidróxido de calcio podría alterar las propiedades mecánicas de la dentina (Hargreaves, 2008).

El primer paso esencial en la terapia de regeneración endodóntica es desinfectar el conducto radicular con una terapia química intensiva mediante el riego con NaOCl y la aplicación de medicamento intraconducto durante 1-4 semanas. Los medicamentos intraconducto más comúnmente utilizados durante el procedimiento de regeneración endodóntica son el hidróxido de calcio y la pasta triple antibiótica (TAP), que es una mezcla de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina. Sin embargo, la presencia de minociclina en TAP se ha asociado con la decoloración de los dientes. (Kim, 2015).

El tratamiento endodóntico regenerativo es un procedimiento que implica la desinfección del conducto radicular con el uso de antibióticos. Múltiples bacterias aeróbicas y anaeróbicas causan infección en los conductos radiculares y, por lo tanto, es difícil desinfectar los conductos eficazmente con un solo tipo de antibiótico. Por lo tanto, Hoshino y Sato recomendaron una combinación de tres antibióticos, incluidos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina (Lee, 2015).

Estos protocolos generalmente implican la desinfección del conducto radicular y la formación de un coágulo sanguíneo y / o células madre de papila apical en el espacio del conducto radicular, que luego se restaura con un material de microorganismos impregnables, lo que permite al tejido reparación y maduración de la raíz. Sin embargo, se ha observado que durante el tratamiento las coronas del diente afectado, sufre un cambio de color o decoloración. (Kahler, 2016)

Berkhoff et al evaluaron la eliminación de TAP mediante diferentes procedimientos de irrigación y descubrieron que aproximadamente el 88% de la TAP en forma de pasta se

retuvo en el sistema de conductos radiculares independientemente de la técnica de irrigación utilizada y la TAP estaba presente circunferencialmente hasta 350 μm dentro de la dentina. Por el contrario, se eliminó hasta el 98% del hidróxido de calcio y sólo estaba presente en 50 μm de dentina. (Kahler, 2016)

En la actualidad la mayoría reportan el tratamiento de regeneración utilizando TAP, ya que es un excelente agente antimicrobiano. Se conoce poco sobre el efecto de la TAP a nivel celular, ya que al utilizarla directo en el conducto, se administra de manera local, en mucha mayor magnitud que lo que encontramos en la circulación sistémica (Berkhoff, 2014).

4.5 Células madre de papila apical (SCAPs)

En los últimos años, varios informes clínicos han demostrado que los dientes permanentes inmaduros diagnosticados con pulpa no vital y periodontitis o absceso perirradicular pueden sufrir apexogénesis. Un hallazgo científico reciente es el descubrimiento y aislamiento de una nueva población de células madre mesenquimales que residen en la papila apical de dientes inmaduros, lo que puede explicar por qué la apexogénesis puede ocurrir en estos dientes permanentes inmaduros con infección. Estas células son llamadas células madre de papila apical (SCAPs), y tienen la capacidad de diferenciación múltiple. (Chen, 2013)

Recientemente se ha descubierto una nueva población de células madre mesenquimales que residen en la papila apical de dientes inmaduros permanentes y se denominó células madre de papila apical (SCAPs). Estas células madre parecen ser la fuente de los odontoblastos que son responsables de la formación de la dentina de la raíz. La conservación de estas células madre cuando se tratan dientes inmaduros puede permitir la formación continua de la raíz hasta su finalización (Huang, 2008).

4.6 Medicación Intraconducto

Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio se ha incluido en varios materiales y formulaciones antimicrobianas que se usan en una serie de modalidades de tratamiento en endodoncia. Estos incluyen, medicamentos intraconducto entre citas, protector pulpar o recubrimiento y selladores de conductos radiculares. Las formulaciones de hidróxido de calcio también se usan durante el tratamiento de perforaciones de raíz, fracturas de raíz y resorción de raíz (Mohammadi, 2011).

El Hidróxido de calcio tiene una amplia gama de actividad antimicrobiana contra patógenos endodónticos comunes, pero es menos efectiva contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) y *C. albicans*. También es un agente anti endotoxina eficaz. Sin embargo, su efecto sobre biofilms es controversial (Mohammadi, 2011).

Kakehashi et al., En 1965, en un estudio clásico demostró que las bacterias causan la enfermedad de la pulpa; sin embargo, numerosos estudios han revelado que hay presencia de hongos y, más recientemente, virus en la incidencia de infecciones endodónticas. La literatura revela que *E. faecalis*, *Actinomyces* y *C. albicans* fueron los microorganismos más prevalentes asociados al fracaso de la endodoncia. Waltimo et al., mostraron que la *C. albicans* era resistente al hidróxido de calcio; sin embargo, combinando hidróxido de calcio con NaOCl o con clorhexidina podría proporcionar una preparación de amplio espectro antimicrobiano con un efecto duradero.

Pasta Triple Antibiótica

Sato et al., Desarrollaron una TAP conformada por minociclina (espectro de gram + y gram-), ciprofloxacino (espectro de gram+ y gram-) y metronidazol. Hoshino y Takushige mostraron que la mezcla de una pasta de tres antibióticos con propilenglicol colocado en el conducto radicular con un léntulo y en una concentración de 20 µg / ml. disminuye en más del 99%; el número medio de colonias bacterianas que

está presente. Otro estudio in vitro muestra que cada antibiótico utilizado sólo es ineficaz contra las bacterias presentes en la pulpa, la dentina y las lesiones apicales, mientras que el trío de antibióticos permite la esterilización completa de las bacterias (Hoshino, 1998).

La sensibilidad de las bacterias a las drogas generalmente se determina como la concentración inhibitoria mínima (MIC) (Hoshino, 1996).

Pasta doble antibiótica

La AAE recomienda el uso de hidróxido de calcio o de TAP durante un periodo corto para el tratamiento de regeneración endodóntica para la desinfección. Pero la minociclina juega un papel importante en cuanto al cambio de color que produce en la dentina. Para evitar decoloración de la corona, se propuso sellar los túbulos dentinarios con agente adhesivo antes del uso de la TAP, como medicación intraconducto.

Han propuesto reemplazar la minociclina con amoxicilina, cefaclor o clindamicina, pero se optó por simplemente eliminar la minociclina y llamarla pasta doble antibiótica (Pena dos Santos *et al.*, 2018).

La doble pasta antibiótica (DAP) está indicada cuando el hidróxido de calcio no es suficiente para eliminar la sintomatología. Se ha demostrado que el metronidazol de manera aislada, no tiene efecto contra *E. faecalis*, y la literatura ya ha demostrado que carece de efecto antimicrobiano contra anaerobios facultativos. El espectro de acción de ciprofloxacino es eficaz contra los patógenos anaerobios y gramnegativos en la cavidad oral pero está limitada nuevamente a bacterias Gram-positivas (Zancan *et al.*, 2018).

Así mismo se ha demostrado que la DAP ha sido efectiva contra biofilms de *E. faecalis*, pero no en biofilms de *C. albicans*, por lo tanto no tiene efecto antifúngico (Zancan *et al.*, 2018).

5. MARCO DE REFERENCIA

Con los años, la mayoría de los estudios han demostrado que la microbiota recuperada de los dientes resistentes al tratamiento endodóntico predominantemente consistía en bacterias gram-positivas, especialmente *E. faecalis* (Murad *et al.*, 2014).

Se ha estudiado este microorganismo, y se ha determinado que *E. faecalis* es un coco grampositivo, anaerobio facultativo que se encuentra a menudo en el 30% - 90% de los dientes endodonciados. Las probabilidades de que los dientes con endodoncia alberguen *E. faecalis* son 9 veces mayores que los dientes con infecciones primarias.

Los hongos de la especie *Cándida* sólo se encuentran en las infecciones primarias de forma esporádica, pero su frecuencia oscila entre el 3% y 18% de las infecciones persistentes / secundarias.

Tanto *E. faecalis* como *C. albicans* poseen atributos que les permiten sobrevivir en conductos tratados, como resistencia a fármacos, capacidad para formar biofilm, invadir los túbulos dentinarios y soportar periodos prolongados de privación nutricional (Walton and Torabinejad, 2010).

E. faecalis es un patógeno oportunista asociado con diferentes formas de enfermedades periradiculares, incluidas las primarias e infecciones endodónticas persistentes (Røçaset *et al.*, 2004).

Esto se debe a su capacidad de adherirse a la dentina y penetrar a lo largo de los túbulos dentinarios y colonizar la dentina en forma de biofilm (Distel *et al.*, 2002).

Son capaces de producir estructuras de superficie celular (por ejemplo, cápsula) o secreciones extra celulares por ejemplo, polisacárido extracelular, puede ofrecer protección a todas las bacterias residentes de diversas tensiones ambientales, como cambios de pH, choque osmótico, radiación. También alivia el efecto de cualquier

sustancia nociva que se difunda a través de la matriz EPS antes de llegar a los microorganismos (Davey and O´ Toole 2000).

Las bacterias y los hongos del microbiota oral humano pueden invadir el sistema de conductos de los dientes. La penetración de bacterias en los túbulos dentinarios puede alcanzar hasta 300 micras (Siqueira and Rôças, 2002).

Además de bacterias, varios estudios han informado sobre la aparición de hongos en las infecciones primarias del conducto radicular (Sen *et al.*, 1995).

Aunque las bacterias son los principales microorganismos que se encuentran en las infecciones endodónticas primarias, existen algunos estudios que establecen la presencia de hongos en los conductos radiculares infectados. *C. albicans* y *E. faecalis* se consideran las especies de hongos y bacterias más resistentes que son responsables de las fallas en el tratamiento del conducto radicular (Pankaj, 2017)

Se ha analizado que los hongos son microorganismos eucarióticos que pueden colonizar la cavidad oral, especialmente las especies de *Candida*, pero también han sido ocasionalmente detectados en infecciones intrarradiculares primarias. En un estudio molecular, se reportó la incidencia de *C. albicans* en 21% de las muestras de conductos con infección primaria (Baumgartner *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha reportado que las infecciones fúngicas invasivas, han aumentado considerablemente, y el número de pacientes en riesgo por estas infecciones, está aumentando a medida que las terapias inmunomoduladoras continúan expandiéndose (Campoy and Adrio, 2016).

Aparte de *C. albicans*, se han logrado aislar otras especies de *Cándida*, como por ejemplo *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. garapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicva*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* (Mergoni *et al.*, 2018).

La *Cándida* también se ha localizado en las dos infecciones más prevalentes de la cavidad oral, que son caries y la enfermedad periodontal, pero no se ha clasificado como cariogénico primario o patógeno periodontal (Mergoni *et al.*, 2018).

También se ha reportado recientemente que los polienos son moléculas macrocíclicas orgánicas que desestabilizan la función de la membrana celular.

La Nistatina, Natamicina y Anfotericina B, son los únicos 3 polienos de uso clínico. De ellos, la Nistatina y Natamicina son activas contra *Cryptococcus*, *Cándida*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Campoy and Adrio, 2016).

La transición de *C. albicans*, desde un comensal inofensivo a un organismo patogénico, aparentemente es dependiente de cambios mínimos en las condiciones predisponentes, las cuales pueden causar una variedad de factores de virulencia. Estos factores incluyen adherencia el cual permite una colonización del tejido duro dental, hifa y tigmotropismo los cuales permiten la penetración del microorganismo a los túbulos dentinarios, secreción de proteasa la cual ayuda a la supervivencia del microorganismo en ambientes con nutrientes limitados y las alteraciones fenotípicas que ayudan a la adaptación en condiciones ecológicas difíciles (Waltimo *et al.*, 2003).

Debido a que tenemos dentro del conducto tanto bacterias como hongos, es crucial explorar las diluciones óptimas de medicamentos antibióticos que tienen un efecto antibacteriano contra la biopelícula bacteriana establecida sin comprometer la supervivencia de las células madre de la pulpa dental humana (Sabrah *et al.*, 2015).

Uno de los pasos importantes al realizar el tratamiento de endodoncia es la irrigación del conducto radicular, ya que disuelve tejidos de pulpa vitales o necróticos, interrumpe biofilms endodónticos, neutraliza endotoxinas y elimina la capa de barrillo dentinario (Neelakantan *et al.*, 2017).

El NaOCl es el irrigante más utilizado en el tratamiento de conducto, en concentraciones que van del .5% al 6%. Ya que este es un potente antimicrobiano, que al entrar en contacto con la mayoría de las bacterias, las elimina (Haapasalo *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que el NaOCl engloba diversas propiedades deseables como principal irrigante de los conductos radiculares y ha sido ampliamente descrito como el irrigante ideal de los actualmente disponibles. En el campo endodóntico, posee amplio espectro antimicrobiano contra microorganismos endodónticos y biofilms, incluyendo microbiota difícil de erradicar de los conductos radiculares, como *Enterococcus*, *Actinomyces* y *Candida* (Cohen and Hargreaves, 2011).

Se comprobó que el efecto de los quelantes en negociar conductos calcificados, estrechos o tortuosos para establecer patencia depende tanto de la anchura del conducto como la cantidad de sustancia activa disponible, desde que el proceso de desmineralización continúa hasta que los quelantes han formado un complejo con el calcio. Los resultados de la unión del calcio en la liberación de protones conllevan al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a perder su eficacia en un ambiente ácido (Cohen and Hargreaves, 2011).

Dentro de los irrigantes, otro muy importante es el EDTA que es un agente quelante recomendado como adyuvante en la terapia del conducto radicular. Muchos autores han demostrado su eficacia para eliminar la porción inorgánica de la capa de frotis (Haapasalo *et al.*, 2014).

Se ha estudiado, que el EDTA extrae las proteínas superficiales bacterianas al combinarse con iones metálicos de la envoltura celular, lo que puede llevar en su caso a la destrucción de las bacterias. Los agentes quelantes como el EDTA forman un complejo estable con el calcio. Cuando todos los iones disponibles están enlazados, se alcanza el equilibrio y no se produce mayor disolución; por tanto, el EDTA es autolimitante (Cohen *et al.*, 2016).

Algunos estudios concluyeron que la aplicación combinada de EDTA al 17% y 2.5% de NaOCl reduce significativamente la cantidad de biopelícula intraconducto (Ozdemir *et al.*, 2010).

En un estudio similar, se evaluó los efectos de usar EDTA y NaOCl en el crecimiento de *E. faecalis* en los conductos radiculares. La aplicación combinada de ambos resultó en una mejor erradicación de este microorganismo, así como la cantidad de biopelícula en el conducto (Ozgur *et al.*, 2010).

El tratamiento endodóntico regenerativo es un procedimiento de tratamiento diseñado para reemplazar el tejido de la pulpa dañada con tejido viable que restablece la función normal de la estructura pulpa-dentina. Después del tratamiento endodóntico regenerativo, el desarrollo continuo de la raíz y la deposición de tejido duro en la pared de la dentina pueden ocurrir en circunstancias ideales. Sin embargo, es difícil predecir el resultado del tratamiento endodóntico regenerativo (Lee, 2015).

Para optimizar la terapia de regeneración endodóntica, las células dentro del conducto radicular deben poder adherirse y proliferar en las superficies de la dentina y diferenciarse en células similares a los odontoblastos. Recientes estudios *in vitro* encontraron que las concentraciones clínicamente utilizadas de varios medicamentos antibióticos como TAP y DAP tenían efectos tóxicos directos sobre las células madre de papila apical (SCAPs) y fibroblastos. Por lo tanto, se ha recomendado el uso de concentraciones más bajas de TAP y DAP (0.1-1 mg ml⁻¹) para evitar los efectos citotóxicos de estos medicamentos (Kim, 2015).

El medicamento intraconducto más utilizado en el tratamiento endodóntico de regeneración es la mezcla de ciprofloxacino, metronidazol, y minociclina, que también se llama TAP. Esta combinación ha demostrado ser altamente eficaz contra las bacterias comúnmente encontradas en sistemas de conductos radiculares infectados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Nikita, 2012).

Hay criterios divergentes acerca del tiempo en que debe permanecer la TAP en el conducto, las opiniones oscilan entre 7 y 35 días, algunos afirman que esa pasta logra estabilizar el conducto infectado en 24 horas; sin embargo, entre los inconvenientes de esta técnica, figura la producción de pigmentaciones en el tejido dentario, atribuidas a la minociclina.

Por tal razón se ha sugerido eliminarla, o sustituirla por una Cefalosporina, como el Cefaclor, o en su defecto, colocar un sellador dentinario, antes de aplicarla (Santiago Dager *et al.*, 2014).

Uno de los problemas de estos medicamentos es que el medicamento debe eliminarse por completo del sistema de conductos antes de la obturación. Los investigadores han demostrado que los restos de medicamentos impiden la penetración de selladores o cementos en las paredes de la dentina del conducto radicular, ya que actúan como una barrera física a lo largo del interfaz sellador / dentina (Guiotti *et al.*, 2014).

Además, las concentraciones clínicas de DAP y TAP pueden conducir a una reacción inflamatoria moderada en los tejidos subcutáneos y son citotóxicas para las células madre de la pulpa dental humana. Por lo tanto, la eliminación completa de medicamentos del conducto radicular es un paso importante en el tratamiento endodóntico exitoso. (Kamocki *et al.*, 2015).

El fluconazol, es un triazol de primera generación, que exhibe una actividad antifúngica de amplio espectro y es un medicamento de uso seguro (Campoy and Adrio, 2016).

El spongostan es una esponja a base de gelatina degradable frecuentemente utilizada para hemostasia en cirugía. Puede ser usada sola o en combinación con vasoconstrictor, para mejorar el efecto hemostático (Jensen *et al.*, 2010).

La reacción en los tejidos debido al spongostan generalmente son leves, pero se ha reportado que al dejarlo dentro de defectos óseos, ha habido una cicatrización tardía (Jensen *et al.*, 2010).

También se ha concluido en un estudio de análisis de casos clínicos de regeneración, que el uso de un biomaterial de tercera generación para la obturación endodóntica, con una técnica mínimamente invasiva, permite la reparación ad integrum de los tejidos que conforman el sistema de inserción dental (Fernández *et al.*, 2012).

6. MÉTODOS

Preparación de soluciones doble antibióticas con fluconazol

Se realizó la preparación de la solución doble antibiótica modificada con fluconazol en tres concentraciones diferentes; ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .4mg/ml (2%); ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .2 mg/ml+H₂O (1%); ciprofloxacino .8 mg/ml + metronidazol 2mg/ml + .1 mg/ml + H₂O (.5%). Como grupo control se preparó una pasta doble antibiótica compuesta por ciprofloxacino de 500 mg (50%) + metronidazol 500mg (50%)+ propilenglicol.

Cultivo de *Candida albicans* y difusión de Agar

La solución doble antibiótica modificada con fluconazol sobre el crecimiento de *C. albicans* (ATCC 90029) fue evaluada por la prueba de difusión de agar de Kirby y Bauer. Partiendo de un precultivo de 18 horas de crecimiento, *C. albicans* fue sembrada en Agar Dextrosa Sabouraud (SDB, BD DIFCO, Sparks MD, USA) ajustando el inóculo previamente (tubo 0.5 de la escala de McFarland). Posteriormente, se perforó el agar con anillo de poliestireno de 5 mm de diámetro previamente esterilizados. La solución doble antibiótica con agregado fungicida se evaluó a diferentes concentraciones: ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .4mg/ml (2%); ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .2 mg/ml+H₂O (1%); ciprofloxacino .8 mg/ml + metronidazol 2mg/ml + .1 mg/ml + H₂O (.5%). Después se incubó a 37°C por 24 horas. El diámetro del halo fue medido con Vernier. Los ensayos antimicóticos se realizaron por triplicado para evaluar la veracidad de los resultados.

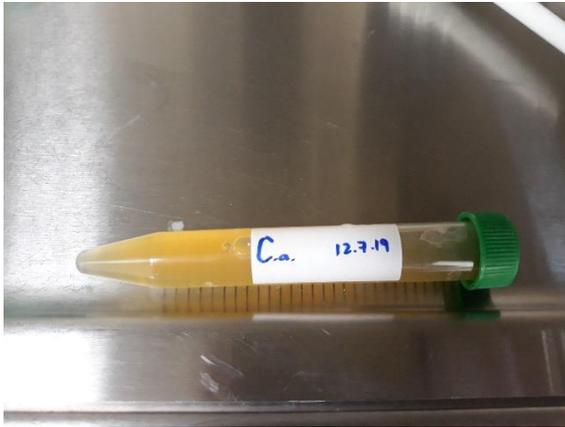


Fig. 1. Pre-cultivo 18 horas previas de *C. albicans*



Fig. 2. Siembra de *C. albicans* en Agar Dextrosa Sabouraud.

Preparación de esponjas de colágeno embebidas con la solución doble antibiótica y fluconazol.

Para la colocación de los medicamentos se utilizó una esponja de colágeno absorbible estéril de 1cm x 1cm x 1 cm (Spongostan™) a la cual se le añadieron 200 μ l de la mezcla de las soluciones previamente preparadas. Para su completa absorción, se usaron pozos de cultivo a los cuales se les agregó la solución y posteriormente la esponja hasta que estuviera completamente saturada. Para el grupo control también se usó una esponja embebida en la pasta doble antibiótica mezclada con propilenglicol (DAP).

Se colocaron las esponjas de colágeno en los pozos de Agar con las diferentes concentraciones de solución antibiótica con Fluconazol, para posteriormente ponerlas en incubación durante 24 horas a 37°C. De igual manera se colocó una esponja de colágeno con H₂O en un pozo y otro con DAP tradicional, para evaluarlas como controles.

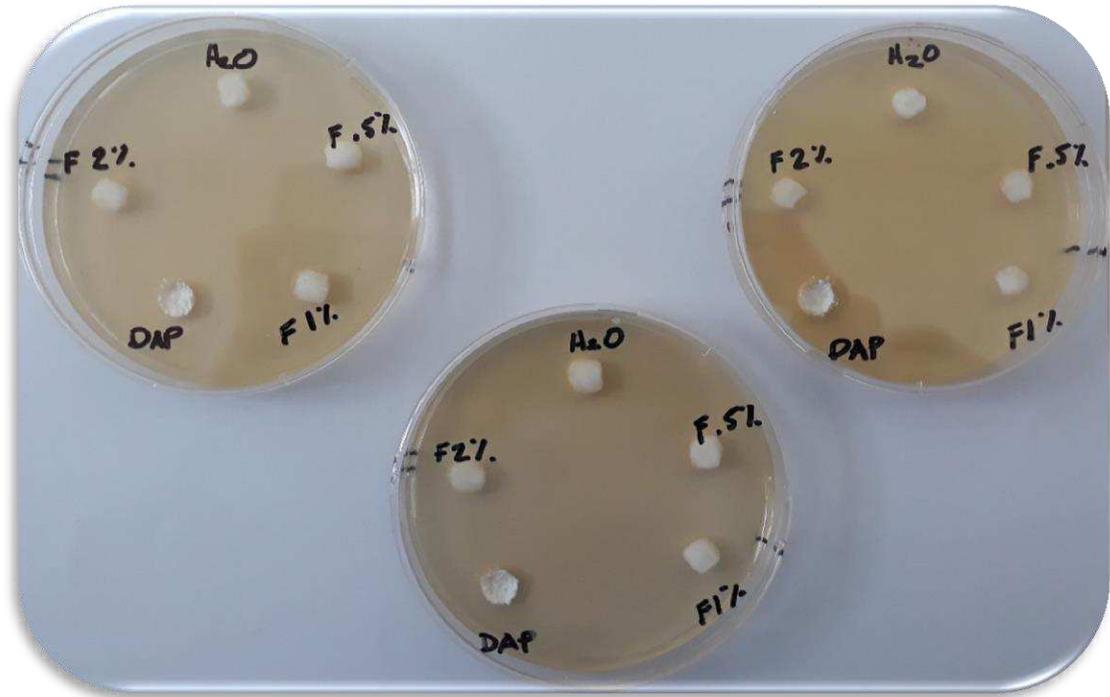


FIG. 3 Aplicación de esponjas de colágeno a diferentes concentraciones en pozos de Agar

Análisis estadístico

El modelo estadístico analítico consistió en la aplicación de un análisis comparativo mediante una prueba t de diferencia de medias para muestras independientes en caso de que la variable muestre evidencia de normalidad, dicha prueba será determinada considerando un 95% de confiabilidad.

El modelo fue aplicado para comparar las diferencias entre los promedio por grupo de estudio.

La estadística de prueba t de diferencia de medias que será empleada para analizar los resultados es el siguiente:

$$z = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

En caso de que la variable muestre evidencia de libre distribución será aplicada una prueba de U de Mann Whitney para dichas muestras, la prueba será determinada considerando también un 95% de confiabilidad.

La prueba corresponde a una *U de Mann-Whitney*, es correspondiente al realizar una comparación de medias tratándose de variables no paramétricas.

7. RESULTADOS

Se logró cargar una esponja de colágeno con una solución doble antibiótica modificada con fluconazol, para evaluar el efecto antifúngico de estas. No hubo precipitados en la solución y se logró una mezcla homogénea de las soluciones.

Posteriormente se evaluaron las Cajas de Petri a las 24 horas y se observó un halo de inhibición semejante en los tres pozos donde estaba la esponja de colágeno con la solución.

En los pozos de control, no hubo halo de inhibición, se observó crecimiento bacteriano donde no había medicación.

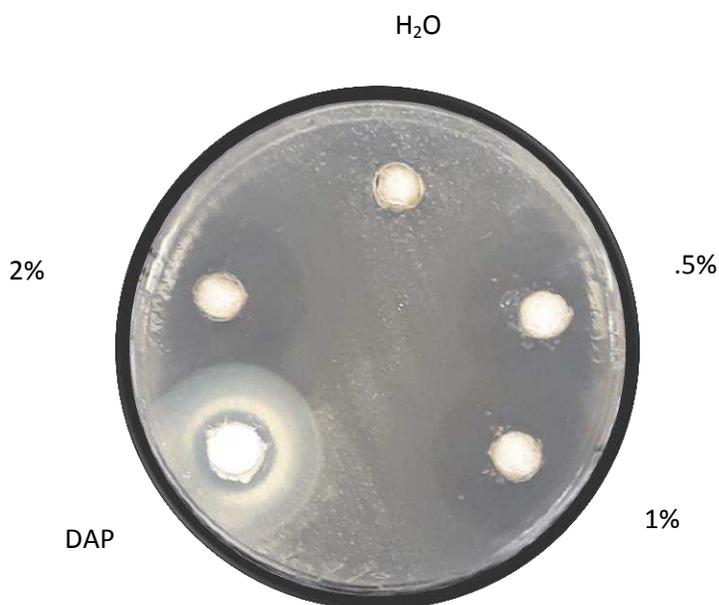


Fig. 4 Evaluación a las 24 horas de incubación

En la evaluación a las 48 horas de incubación se demostró que el efecto antifúngico de la solución es similar que a las 24 horas, no hubo crecimiento del halo, pero seguía siendo efectiva, ya que no había crecimiento bacteriano.

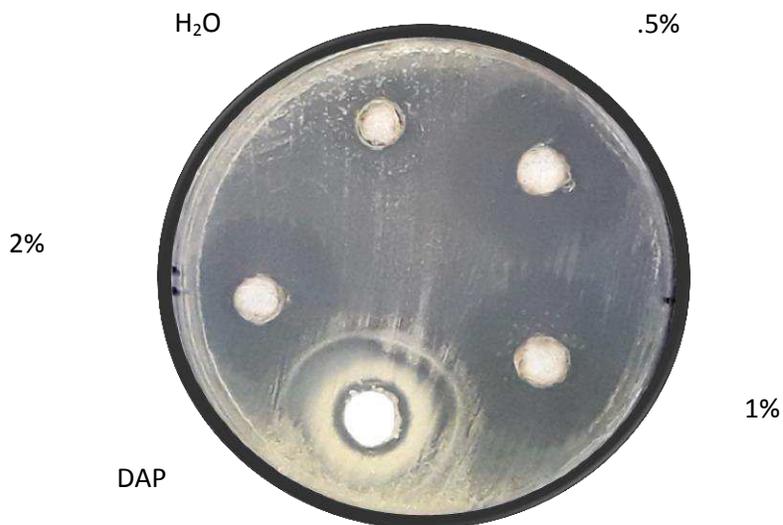


Fig. 5 Evaluación a las 48 horas de incubación

En este estudio se evaluó el halo de inhibición de esponjas de colágeno con una solución doble antibiótica con Fluconazol sobre *C. albicans*, utilizando un vernier.

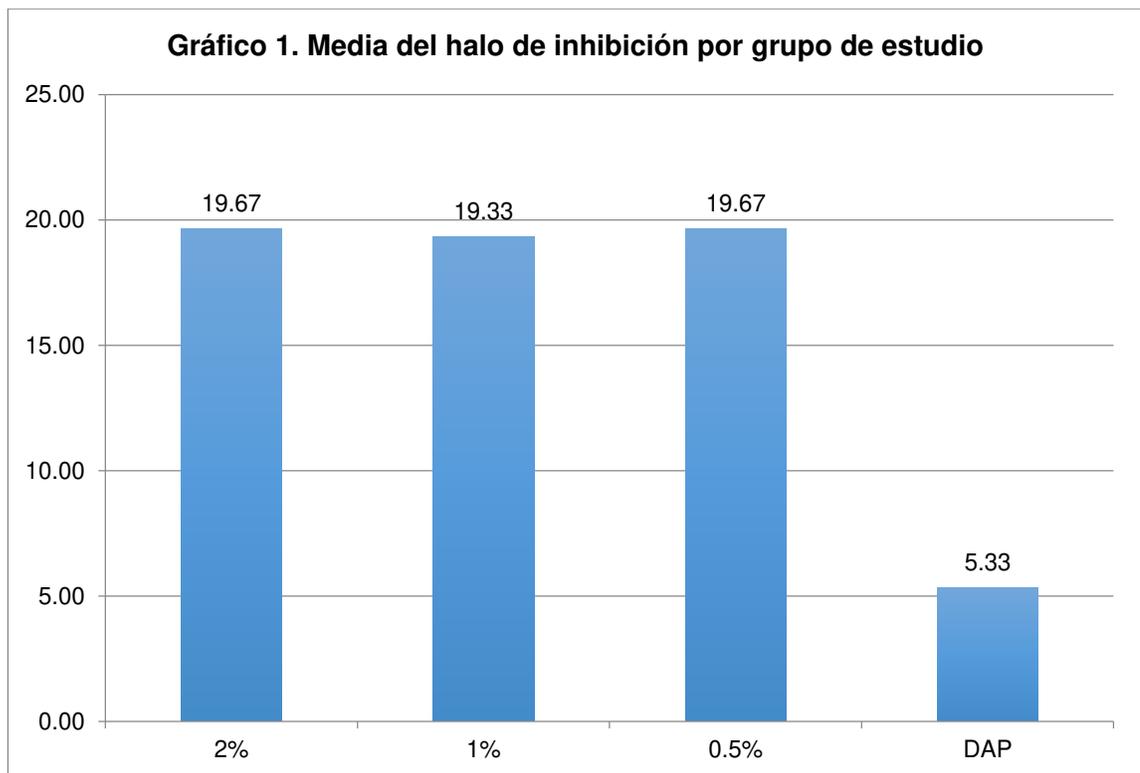
Grupo	Media	Desviación Estándar	Varianza	Valor p
2%	19.67	1.53	2.33	< 0.0001
1%	19.33	0.58	0.33	< 0.0001
0.5%	19.67	0.58	0.33	< 0.0001
DAP	5.33	0.58	0.33	

Tabla 1. Estadística descriptiva del halo de inhibición por grupo de estudio

El grupo evaluado al 2% mostró una media de 19.67 ± 1.53 mm de halo de inhibición bacteriana, así mismo el grupo al 1% mostró una media de 19.33 ± 0.58 mm, mientras que el grupo al 0.5% refiere una media de 19.67 ± 0.58 mm de halo de inhibición.

Mediante una prueba t student de diferencia de medias es posible concluir que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el DAP ($p < 0.05$).

En la tabla 1, se observó que la solución antibiótica con Fluconazol presentó un halo de inhibición similar en sus tres concentraciones (2%, 1% y 0.5%) presentando un buen efecto antifúngico desde una concentración mínima. La DAP no tuvo un halo de inhibición significativo debido a que no presenta efecto antifúngico ($p < 0.05$).



Grafica 1. Media del halo de inhibición por grupo de estudio.

En esta gráfica se observó que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la DAP y la solución antibiótica con Fluconazol en sus tres concentraciones.

También se puede observar que dentro de las tres concentraciones utilizadas, no hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a su efecto antifúngico.

8. DISCUSIÓN

Los hongos están presentes en la microbiota sana de la cavidad oral, y estos contribuyen a la periodontitis apical persistente. *C. albicans* es el hongo que se ha encontrado más frecuentemente en infecciones endodónticas. Estos hongos tienen la capacidad de producir Biofilm debido a su alta afinidad a la dentina y su fácil adhesión a diferentes tipos de superficies. (Zancan *et al.*, 2018).

Es por eso que en este estudio se decidió utilizar *C. albicans* para buscar alternativas de tratamientos en la erradicación de este hongo.

Cen *et al.*, en el 2015, utilizaron Ketoconazol en su estudio contra *C. albicans* debido a que es un antifúngico muy efectivo para este tipo de infecciones, sin embargo, en sus resultados no fue tan efectivo. A diferencia de ese estudio, en el presente, se utilizó Fluconazol a 0.5%, 1% y 2% para probar su eficacia.

Como otro dato importante, en nuestro estudio, se decidió utilizar Fluconazol líquido para facilitar su aplicación en las esponjas de colágeno y a su vez, en los pozos de cultivo. Esto difiere del método utilizado por Ndiaye *et al.*, en el 2016, ya que en ese estudio se utilizó Clorhexidina en gel.

El metronidazol ha demostrado tener efecto antimicrobiano contra *C. albicans*, pero al mezclarlo con ciprofloxacino, éste pierde su acción antifúngico (Zancan *et al.*, 2018).

Debido a esto, en el presente, se optó por combinar el Fluconazol con esta mezcla antibiótica para erradicar la *C. albicans*.

Gokturk *et al.*, en el 2016, demostraron que al utilizar diferentes técnicas de activación de irrigante, no eliminó por completo la pasta doble antibiótica del conducto.

Basados en este estudio, a diferencia de ellos se prefirió utilizar medicamentos en solución, que al combinarlo con las esponjas de colágeno nos facilitó la colocación y remoción de estos medicamentos intraconducto.

El Fluconazol, aparte de tener actividad en contra de *C. albicans*, está reportado que de igual manera, es eficaz para el tratamiento de otro tipo de hongos, por ejemplo *Cryptococcus Neoformans*, *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Coccidioides*. (Campoy and Adrio, 2017).

Es por eso que en nuestro estudio, se decidió utilizar Fluconazol por su amplio espectro antifúngico.

Si en un futuro se logran aislar otro tipo de hongos del conducto radicular, se podría utilizar Fluconazol ya que es una excelente opción de tratamiento.

El spongostan se utiliza en sitios quirúrgicos donde se puede dejar in situ, también se ha reportado que es un material absorbente, ya que se utiliza como hemostático en cirugías, donde colocan vasoconstrictor en la esponja de colágeno. (Jensen *et al.*, 2010)

En esta investigación se decidió utilizar spongostan debido a sus amplias aplicaciones en la odontología, y por sus buenos resultados clínicos. Resultó tener una fácil manipulación y excelente absorción.

9. CONCLUSIONES

- Es posible cargar una esponja de colágeno estable utilizando una solución doble antibiótica modificada con fluconazol.
- La solución doble antibiótica modificada con fluconazol cargada en una esponja de colágeno tiene un efecto inhibitorio a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *C. albicans in vitro*.
- Los tratamiento de fluconazol en un rango de concentraciones de (.5%, 1% y 2%) tiene un efecto antifúngico concentración-dependiente.
- Por lo anterior, la esponja de colágeno cargada con la solución doble antibiótica modificada con fluconazol podría ser una alternativa efectiva para erradicar *C. albicans* durante procedimientos regenerativos en endodoncia.

10. LITERATURA CITADA

1. Adel S. Alibied, Lina M. Cortes, Jeffery Lo, Than T. Nguyen, Jeffery Albert, Abdulaziz S Abu-Melha, Louis M. Lin, and Jennifer L. Gibbs. Radiographic and Clinical Outcomes of the Treatment of Immature Permanent Teeth by Revascularization or Apexification: A Pilot Retrospective Cohort Study. *J Endod.* 2014;40(8): 1063–1070.
2. Basmaci F, Oztan MD, Kiyani M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J.* 2013;46(9):823-30.
3. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF Jr. Endodontic microbiology and treatment of infections. Cohen S, Hargreaves MK. *Pathways of the Pulp.* 9th ed. St Louis, MO: Mosby, Inc; 2006:580–607.
4. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000;26(12):695-8.
5. Berkhoff J, Chen P, Teixeira F, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod.* 2014;40(8):1172-7.
6. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol.* 2017;1(133):86-96.
7. Chen SJ, Chen L. Radiographic outcome of necrotic immature teeth treated with two endodontic techniques: A retrospective analysis. *Biomed J.* 2016;39(5):366-371.
8. Chen K, Xiong H, Huang Y, Liu C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *Arch Oral Biol.* 2013;58(8):997-1006.
9. Chuensombat S., Khemaleelakul S., Chattipakorn S., Srisuwan T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.* 2013;39(6):813–819.

10. Cohen S, Hargreaves K, Berman L. Pathways of the pulp. Elsevier. 2016;6:880.
11. Cohen S, Hargreaves K. Pathways of the pulp. Elsevier. 2011;9:314-315.
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284(5418):1318-22.
13. Daniel G. Meeker, Karen E. Beenken, Weston B. Mills, Allister J. Loughran, Horace J. Spencer, William B. Lynn,^a and Mark S. Smeltzer. Evaluation of Antibiotics Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on Activity in an Established Biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(10):5688–5694.
14. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. J Am Dent Assoc 2016;147(5):372-380.
15. Fernández J, Maresca B, Sabaté R. Reparación Postendodóntica por Regeneración de Tejidos. RAAO. 2012;(2): 43-50.
16. Glickman G. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: Background and Perspectives. J Endod. 2009;35(12):1619-20.
17. Gokturk H, Ozkocak I, Buyukgebiz F, Demir O. An in vitro evaluation of various irrigation techniques for the removal of double antibiotic paste from root canal surfaces. J Appl Oral Sci. 2016;24(6):568-574.
18. Gulati M, Nobile CJ. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016;18(5):310-21.
19. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J. 2014;216(6):299-303.

20. Hargreaves K, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?. *J Endod.* 2008;34(7):51-6
21. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996 Mar;29(2):125-30.
22. Hoshino E., Takushige T. LSTR 3Mix-MP method-better and efficient clinical procedures of lesion sterilization and tissue repair (LSTR) therapy. *Dent Rev.* 1998;666:57–106.
23. Huang G, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):645-51.
24. Jensen SS, Yazdi PM, Hjørting-Hansen E, Bosshardt DD, von Arx T. Haemostatic effect and tissue reactions of methods and agents used for haemorrhage control in apical surgery. *Int Endod J.* 2010;43(1):57-63.
25. Kahler B, Rossi-Fedele G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *J Endod.* 2016;42(4):563-9
26. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9
27. Kho P, Baumgartner J. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2006;32(7):652-5.
28. Luciane Geanini Pena dos Santos, Luiz Alexandre Chisini, Camila Guerner Springmann, Beatriz Dulcineia Mendes de Souza, Fernanda Geraldo Pappen, Flávio Fernando Demarco, Mara Cristina Santos Felipe, Wilson Tadeu Felipe.

- Alternative to Avoid Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Procedure: A Systematic Review. *Brazilian Dental Journal* (2018)29(5): 409-418.
29. Kim KW, Yassen GH, Ehrlich Y, Spolnik K, Platt JA, Windsor LJ. The effects of radicular dentine treated with double antibiotic paste and ethylenediaminetetraacetic acid on the attachment and proliferation of dental pulp stem cells. *Dent Traumatol.* 2015;31(5):374–379.
 30. McTigue DJ, Subramanian K, Ashok K. Management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Pediatr Dent* 2013;35:55–60.
 31. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod.* 2018;44(11):1616-1625.
 32. Mohammadi Z, Dummer P. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011;44(8):697-730.
 33. Ozgur H, Dogan H, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on *Enterococcus faecalis* Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study. *Journal of Endodontics* 2010; 36: 842-846.
 34. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008;34(8):926–31.
 35. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod.* 2012;38(10):1372-5.
 36. Sabrah AH, Yassen GH, Liu WC, Goebel WS, Gregory RL, Platt JA. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):2059-66.

37. Santiago Dager E, LaO Salas N, Urgellés Pérez Y, Riesgo Cosme Y, Noa Deyá Y. Endodontic Regeneration with Stem Cells. *Medisan* 2014;18(12): 1726
38. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 1999;25(4):235–8.
39. Sena N, Gomes B, Vianna M, Berber V, Zaia A, Ferraz C, Souza F. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*. 2006;39(11):878-85.
40. Siqueira JF Jr, Sen B. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(5):632-41.
41. Siqueira JF, Rocas I. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-1301.
42. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93-8.
43. Taschieri S ,Del Fabbro M ,Samaranayake L ,Chang J, Corbella S. Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2014;5:163–170.
44. Tziafas D, Kodonas k. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010;36(5):781-9
45. Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endod Topics* 2004;9(1):66–78.
46. Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasao MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*. 1999;32(6):421–9.

47. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):128-37.
48. Waltimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J.* 1999;32(2):94–8.
49. Walton R, Torabinejad M. *Endodncia. Principios y Práctica.* 2010. Elsevier;3:45.
50. Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(3): 361–367.
51. Yoo YJ, Kwon I, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim SM, Ahn KB, Lee Y, Han SH, Chang SW, Baek SH, Zhu Q, Kum KY. Antifungal Effects of Synthetic Human Beta-defensin-3-C15 Peptide on *Candida albicans*-infected Root Dentin. *J Endod.* 2017;43(11):1857-1861.
52. Zancan RF, Calefi PHS, Borges MMB, Lopes MRM, de Andrade FB, Vivan RR, Duarte MAH. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech.* 2019;82(5):494-500.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Adrián Mauricio de la Garza Treviño

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Tesis: **EFFECTO ANTIFÚNGICO DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA MODIFICADA CON FLUCONAZOL SOBRE CANDIDA ALBICANS *IN VITRO*.**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Piedras Negras, Coahuila el 18 de Octubre de 1992, hijo de Adrián Mauricio de la Garza Ramírez y María de Lourdes Treviño Aguirre.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en el 2015.