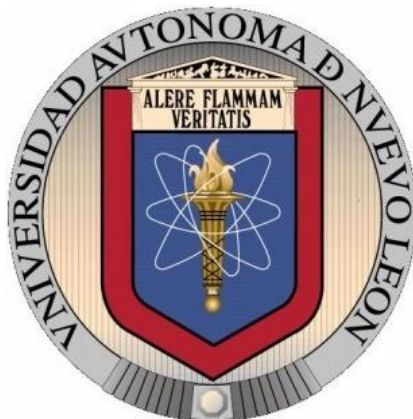


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) SOBRE EL BIOFILM DE
*ENTEROCOCCUS FAECALIS IN VITRO***

POR

C.D.E.E. RAFAEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

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

JUNIO, 2019

TESIS

ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) SOBRE EL BIOFILM DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS IN VITRO

POR
C.D.E.E. RAFAEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

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

Comité de Examen de Tesis

DR. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
PRESIDENTE

DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
SECRETARIO

DR. JUAN MANUEL SOLÍS SOTO
VOCAL

TESIS

ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) SOBRE EL BIOFILM DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS IN VITRO

POR
C.D.E.E. RAFAEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

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

COMITÉ DE TESIS

DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
CO-DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mi camino.

A la memoria de mis padres.

A mi familia.

A Gaby por su amor, apoyo y comprensión.

A Rafa por hacerme conocer el amor incondicional y ser mi razón de ser.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por ser el vínculo en mi formación y superación como académico y profesional.

A mi director de tesis Dr. Claudio Cabral Romero mi más amplio reconocimiento y agradecimiento por su valiosa dirección y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Dr René Hernández Delgadillo mi agradecimiento por todo el trabajo realizado durante mi estancia dónde tuve la oportunidad de aprender y desarrollar este proyecto.

Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño mi más profundo agradecimiento por el respaldo brindado.

ÍNDICE

Sección		Página
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo General		
5.2 Objetivos Específicos		
6. ANTECEDENTES	12
7. MATERIAL Y MÉTODOS	19
8. RESULTADOS	21
9. DISCUSIÓN	24
10. CONCLUSIONES	26
11. BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

El objetivo del tratamiento endodóntico es la prevención o tratamiento de la periodontitis apical a través de la eliminación de la infección microbiana del sistema de conductos radiculares. Sin embargo, la instrumentación y el uso de irrigantes podrían ser insuficientes para remover por completo el biofilm intraconducto. En este trabajo se tiene por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de un hidrogel cargado con dodecil sulfato de sodio (SDS) así como también determinar la capacidad y eficacia para remover el biofilm de *Enterococcus faecalis* in vitro. La actividad antimicrobiana del SDS se analizará por medio de ensayos de viabilidad celular MTT empleando *E. faecalis* y a un cultivo microbiano mixto como modelo experimental. La actividad antibiofilm se analizará mediante microscopía de fluorescencia. Los datos obtenidos muestran una eficacia importante del hidrogel con SDS como agente antimicrobiano, compitiendo contra el hipoclorito de sodio (NaOCl) y el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Al analizar los resultados antibiofilm, el hidrogel con SDS removió el biofilm de 24 horas tanto de *E. faecalis* como de un cultivo mixto mostrando un alto potencial para su empleo como tratamiento coadyuvante en la desinfección de conductos radiculares.

ABSTRACT

The goal of root canal treatment is the prevention and treatment of apical periodontitis through the elimination of microbial infection of the root canal system. However, instrumentation and use of irrigants could be not enough to detach all root canal biofilm. In this work, the aim was to evaluate antimicrobial and antibiofilm activity of a hydrogel loaded with sodium lauryl sulfate (SDS) on *E. faecalis* and polymicrobial culture in vitro. The antimicrobial activity of the SDS was evaluated by MTT cell viability assays. Antibiofilm activity was analyzed by FDA assays and fluorescence microscopy. Data obtained show high efficacy of hydrogel loaded with SDS to inhibit *E. faecalis* growth as well polymicrobial cultured. SDS competes in efficacy with sodium hypochlorite (NaOCl) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). On the other hand, hydrogel loaded with SDS shows a similar antibiofilm activity than sodium hypochlorite after 24 hours of exposition. Altogether these results strongly suggest that hydrogel loaded with SDS could be an innovative drug to use in root canal disinfection to increase the possibility of success in endodontic treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La infección endodóntica puede ser primaria o secundaria. En general, el desarrollo de la infección primaria implica inflamación e infección de la pulpa dental luego de la invasión de microorganismos que eventualmente dan como resultado el establecimiento del biofilm intraconducto y como respuesta del hospedero la inflamación de los tejidos de soporte, es decir; periodontitis apical. El tratamiento de conductos consiste en la remoción por completo del tejido pulpar que se encuentra dentro de las raíces así como la desinfección total del conducto, lo que se considera el paso más importante para lograr un tratamiento exitoso. La instrumentación y el uso de irrigantes como el hipoclorito de sodio, clorhexidina, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e hidróxido de calcio podrían ser insuficientes para remover por completo el biofilm intraconducto. En este trabajo se tiene por objetivo estudiar la actividad de un hidrogel cargado con dodecil sulfato de sodio (SDS) para evaluar su capacidad antimicrobiana, así como también la eficacia para remover el biofilm de *E. faecalis*. La actividad antimicrobiana del SDS se analizará por medio de ensayos de viabilidad celular MTT empleando a *E. faecalis* como modelo experimental. La actividad antibiofilm se analizará mediante microscopía de fluorescencia.

Los datos obtenidos muestran una eficacia importante del SDS como agente antimicrobiano, compitiendo contra el hipoclorito de sodio y CTAB. Al analizar los resultados antibiofilm, el SDS removió el biofilm de 24 horas tanto de *E. faecalis* como de un cultivo mixto, mostrando un alto potencial para su empleo como tratamiento coadyuvante en la desinfección de conductos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los porcentajes de fracaso en el tratamiento endodóntico en su gran mayoría pueden ser asociados a una incompleta desinfección de conductos. El método tradicional basado en la irrigación con soluciones desinfectantes como el hipoclorito de sodio, clorhexidina, EDTA, e hidróxido de calcio, solos o en combinación, no es suficiente para la erradicación total del biofilm intraconducto, posiblemente debido al poco tiempo de exposición con las superficies de las paredes dentinarias, especialmente en la porción apical de los conductos radiculares estrechos. Es necesario implementar nuevas alternativas de tratamiento que sean efectivas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y remover su biofilm. En este trabajo se propuso desarrollar un hidrogel suplementado con el detergente aniónico SDS, ampliamente utilizado en las técnicas básicas de biología molecular para destruir pared y membrana de microorganismos genéticamente modificados. Se analizaron las propiedades antimicrobianas y antibiofilm del hidrogel con SDS sobre *E. faecalis* y un cultivo polimicrobiano mixto.

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración que la irrigación con diferentes clases de desinfectantes poseen la desventaja del poco tiempo de exposición y debido a la posibilidad de que se presenten infecciones secundarias (infección posterior al tratamiento) en los conductos radiculares, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento intraconducto. En este estudio se desarrolló un hidrogel biodegradable suplementado con el detergente aniónico SDS y se evaluó su potencial antimicrobiano y antibiofilm sobre *E. faecalis* y un cultivo polimicrobiano mixto. Nuestra hipótesis está basada en que una exposición tópica directa y prolongada de SDS inhibirá el crecimiento y formación de biofilm de *E. faecalis* y cultivo mixto heterogéneo. En caso de tener éxito se contará con una alternativa de tratamiento de bajo costo para contribuir a la limpieza y desinfección de los conductos radiculares.

4. HIPÓTESIS

El hidrogel cargado con dodecil sulfato de sodio (SDS) será eficaz para inhibir el crecimiento y remover el biofilm de *E. faecalis* in vitro.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado con dodecil sulfato de sodio (SDS) y comprobar si será eficaz para remover el biofilm de *E. faecalis* in vitro.

5.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un hidrogel biodegradable suplementado con dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Determinar la actividad antimicrobiana del hidrogel suplementado con SDS mediante ensayos de viabilidad celular MTT.
- Analizar la actividad antibiofilm del hidrogel sobre biofilm de *E. faecalis* por ensayos FDA y microscopía de fluorescencia.

6. ANTECEDENTES

Etiología de las Infecciones Radiculares

Las bacterias y sus productos juegan un papel importante en el inicio y propagación de las enfermedades pulpares y periapicales. Generalmente es aceptado que la presencia de bacterias en la pulpa dental se debe a diversos factores, entre los más comunes se consideran: presencia de caries, filtraciones coronarias debido a fisuras y/o restauraciones defectuosas, traumatismos dentales, afecciones periodontales, etc.¹ La infección de la pulpa dentaria moviliza los microorganismos en sentido apical invadiendo y colonizando los tejidos periapicales.^{2,3,4} La relación entre la presencia de bacterias en pulpa y enfermedad periapical fue ampliamente demostrada por Kakehashi *et al.*⁵ En dicho estudio, pulpas de rata (convencionales) fueron expuestas al medio ambiente oral con la consecuente necrosis pulpar seguido por inflamación periapical y formación de lesiones. Sin embargo; cuando el mismo procedimiento se realiza sobre ratas libres de gérmenes, las pulpas permanecieron vitales y relativamente no inflamadas además que la exposición pulpar fue reparada por dentina. Este estudio nos demuestra que sin la presencia de bacterias y sus productos, las lesiones periapicales de origen endodóntico no se originan. En humanos se ha demostrado que la periodontitis apical y la resorción ósea se desarrollan solo cuando el conducto radicular está infectado.⁶

Diversos autores han detectado la presencia de hongos y más recientemente virus en asociación con infecciones endodónticas,^{7,8,9,10} sin embargo se considera que las bacterias constituyen los principales microorganismos implicados en la patogenia de la enfermedad pulpar.

La infección endodóntica puede ser primaria o secundaria. En general, el desarrollo de la infección primaria implica inflamación e infección de la pulpa dental luego de la invasión de microbios y/o subproductos que eventualmente dan como resultado la inflamación de los tejidos de soporte, es decir, periodontitis apical. La infección secundaria (o infección posterior al tratamiento) ocurre como reinfección (adquirida o emergente), infección

remanente (persistente) o infección recurrente (desarrollada en los dientes después de un proceso de curación aparente) en dientes que han sido previamente tratados.¹¹

Las infecciones endodónticas primarias son polimicrobianas¹², predominando *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptoestreptococos*, *Eubacterium* y especies de *Camphylobacter*.

Por el contrario la flora microbiana presente en las infecciones secundarias, por lo general, son capaces de sobrevivir a condiciones adversas tales como medio ambientes con un pH alcalino y condiciones donde los nutrientes son limitados. Hay un claro contraste en los fenotipos microbianos en infecciones primarias en comparación con infecciones secundarias, predominando en esta última las bacterias gram-positivas.¹³ Ha sido demostrada la presencia de ciertas especies bacterianas en dientes con infección posterior al tratamiento, como son: *Enterococos*, *Streptococos*, *Lactobacilos*, *Actinomyces* y Hongos (*Candida Albicans*). En particular la presencia de *E. faecalis* merece especial atención debido a su alta prevalencia en los casos de dientes que cursan con periodontitis apical persistente.¹⁴ Este es un microorganismo anaerobio facultativo grampositivo que puede tolerar condiciones ambientales adversas, incluido un pH alcalino alto, así como poder tolerar largos periodos de inanición. Debido a su capacidad para penetrar en túbulos dentinarios así como la de formar biopelículas es muy difícil de erradicar por medio del proceso químico-mecánico durante el tratamiento de conductos.¹⁵

Conforme el proceso infeccioso avanza los microorganismos se organizan en biofilms agregados, coagregados y también como células que se encuentran suspendidos en el fluido del canal conocido como células planctónicas.^{16,17,18,19,20} La teoría del biofilm fue introducida en 1978 como un nuevo paradigma en microbiología por Costerton *et al.*,²¹ sin embargo; es Nair en 1987 quién reporta por primera vez en las paredes de conductos radiculares microcolonias bacterianas conformadas por cocos, bacilos, filamentos y espiroquetas; lo que se considera la introducción del concepto de biofilm en endodoncia. Este se puede definir como una estructura asociativa de una o varias estirpes bacterianas, embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos autoproducida y que se encuentra adherida a una superficie o sustrato. Dicha asociación puede ser entre bacterias de la misma o de distinta especie. La

primera de ellas se denomina autoagregación y la segunda coagregación. La coagregación está considerada una forma de biofilm más compleja y difícil de eliminar, ya que bacterias de distinta especie pueden compartir distintos mecanismos de defensa en pos del mantenimiento de la comunidad asociada en biofilm.^{22,23,24}

El proceso de la formación del biofilm puede dividirse en cuatro etapas:

- **Adhesión:** Inicialmente los patógenos en estado planctónico se unen a las proteínas de la matriz extracelular presentes en la superficie a colonizar, además emplean estructuras como fimbrias, adhesinas, pilis y flagelos para una adhesión mecánica. La unión de las células microbianas a una superficie se denomina adhesión, mientras que la unión entre células microbianas recibe el nombre de cohesión.²⁵
- **Acumulación:** La segunda etapa consiste en la proliferación de las bacterias unidas a la superficie, a partir de este crecimiento bacteriano se producirá una matriz. La formación de esta es un proceso dinámico y complejo que depende de la disponibilidad de nutrientes, la síntesis y la secreción de material extracelular, la competencia entre las microcolonias, la secreción de proteínas y la propia interacción entre los componentes de la matriz.^{26, 27}
- **Maduración:** En el proceso de maduración influyen factores como secreción de toxinas, adhesión célula a célula, factores ambientales, señalización molecular (quorum sensing), regulación metabólica, respuestas al estrés, resistencia y virulencia.²⁸
- **Separación:** La etapa de separación del biofilm se puede presentar como respuesta a alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, fluctuaciones en los niveles de oxígeno y el incremento de productos tóxicos. Las bacterias que se han separado tienen la capacidad de reiniciar el proceso de formación del biofilm en un ambiente que presente las condiciones adecuadas.²⁸

Se han descrito muy variadas formas de biofilm, desde pequeñas formaciones hasta cadenas de biofilm,²⁹ pero la formación más característica encontrada es la de biofilm en forma de champiñón (mushroom-shape).³⁰ Estas colonias se observan al microscopio como

estructuras unitarias, las cuales se encuentran separadas de otras por canales de agua, todo dentro de la matriz de polisacáridos. Se piensa que estos canales permiten la distribución de los nutrientes así como la eliminación de los residuos de las colonias. Las principales características del biofilm son: heterogeneidad estructural, variabilidad genética, comunicación intercelular (quorum sensing) y una menor susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Estos microorganismos son más resistentes para poder ser eliminados debido a las características físico-químicas y biológicas del biofilm, lo que hace difícil su erradicación ya que los microorganismos no pueden ser atacados por agentes antibacterianos, bacteriófagos o el sistema inmune.^{31,32} De hecho, algunos estudios mencionan que los microorganismos que conforman el biofilm pueden ser aproximadamente 1000 veces más resistentes hacia agentes antimicrobianos y mecanismos de defensa del huésped que sus contrapartes planctónicas.^{33,34}

La remoción del biofilm bacteriano que se adhiere a las superficies de los conductos radiculares, puede ser facilitada mediante la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares, sin embargo es imposible limpiar y conformar estos en su totalidad por la complejidad anatómica que presentan.³⁵ Aún con el uso actual de la instrumentación rotatoria, los instrumentos actúan solo a nivel central del conducto radicular dejando aletas e istmos sin tocar después de la completa preparación de los mismos.³⁶

Peters *et al.*,³⁷ comprobaron que la instrumentación mecánica deja aproximadamente del 35% al 40% de las paredes del conducto radicular sin tocar y estas áreas pueden albergar bacterias organizadas en biofilms así como sus productos de desecho, los cuales pueden impedir una buena adaptación de los materiales de obturación y provocar posteriormente inflamación en tejidos perirradiculares por tal razón aparte de la instrumentación es necesario la combinación con soluciones irrigadoras, por lo tanto la terapia endodóntica debe ser un conjunto de maniobras químico-mecánicas.

Irrigantes

Diversos estudios han demostrado que el uso de agentes químicos acompañando la terapia mecánica da como resultado tratamientos exitosos y con muy buen pronóstico.³⁸ Sin embargo, no hay un irrigante que por sí solo pueda eliminar la parte orgánica e inorgánica resultante de la instrumentación de los conductos radiculares,³⁹ y es difícil que estos mantengan contacto directo

con la superficie de las paredes dentinarias, especialmente en la porción apical de los conductos radiculares estrechos.⁴⁰

Actualmente queda claro que ninguna de las sustancias que se emplean como irrigantes, al ser utilizadas individualmente son capaces de cumplir con las expectativas esperadas al realizar un tratamiento endodóntico, por esto es recomendado el uso de al menos dos de ellas para lograr la desinfección y eliminación de material orgánico e inorgánico del conducto radicular.^{41,42,43}

Hipoclorito de sodio

Se han propuesto diferentes agentes químicos auxiliares para la preparación del conducto radicular y el más comúnmente usado en endodoncia es el hipoclorito de sodio (NaOCl),⁴⁴ por ser un agente antimicrobiano potente, capaz de producir la lisis o muerte bacteriana, así mismo se considera el desinfectante más potente en el tratamiento de los conductos radiculares debido a su excelente capacidad para disolver tejidos vitales y necróticos.^{45, 46, 47}

En la terapia endodóntica, el NaOCl se usa en concentraciones que varían de 0.5 a 6%, todas estas concentraciones muestran actividad antibacteriana.⁴⁸ Los estudios demuestran que la actividad antimicrobiana no depende de la concentración, caso contrario en lo que se refiere a la capacidad de disolución del tejido y en la interrupción del proceso en la biopelícula.^{49, 50} En lo que se refiere a la capacidad de disolución de tejido necrótico, Harrison y Hand⁵¹ demostraron que la dilución del hipoclorito de sodio disminuye significativamente la propiedad para disolver dicho tejido. La concentración al 2.5% fue tan solo un tercio de efectiva en comparación con concentraciones del 5.25%. El hipoclorito de sodio a pesar de tener excelentes propiedades, presenta ciertas desventajas entre ellas, ser citotóxico, altamente irritante si se extruye a los tejidos periapicales, no tener capacidad de penetrar y limpiar porciones estrechas de los conductos radiculares y principalmente ser ineficiente en la remoción de lodillo dentinario. Estas han sido unas de las principales razones por las cuales a través del tiempo se ha buscado otro tipo de irrigantes que contrarresten esos inconvenientes.

Clorhexidina

La clorhexidina es un agente antibacterial de amplio espectro que actúa en contra de

bacterias gram positivas y negativas. Su uso como irrigante en endodoncia se basa en la sustantividad y en su efecto antimicrobiano de larga duración que deriva de su adhesión a la hidroxiapatita.⁵² Se recomienda una concentración de 2% cuándo se utiliza como irrigante intraconducto. Comparada con el hipoclorito de sodio su grado de toxicidad es más bajo, sin embargo; una de sus principales desventajas es que no posee capacidad de disolución de los tejidos.⁵³

Alexidina

Otro irrigante introducido recientemente es la alexidina, la cual tiene una rápida acción antibacteriana. En comparación con la clorhexidina la alexidina tiene una afinidad más alta por los principales factores de virulencia bacteriana, como son los lipopolisacáridos y los ácidos lipoteicoicos, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad de la membrana bacteriana.⁵⁴ Otra ventaja importante de la alexidina sobre la clorhexidina es que su combinación con hipoclorito de sodio no produce formación de paracloroanilina, el cual es un precipitado altamente tóxico.^{55,56}

Nanopartículas

En los últimos años, el uso de nanopartículas para desinfectar conductos radiculares ha ganado popularidad debido a su amplio espectro de actividad antibacteriana. Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas de quitosán, óxido de zinc y plata poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana como resultado de sus propiedades físico-químicas que provocan la alteración de la permeabilidad de la pared celular, lo cual resulta en la muerte celular.^{57,58}

Agentes Quelantes

Los agentes quelantes se introdujeron a la endodoncia para ayudar en la preparación de conductos calcificados y angostos en 1957 por Nygaard Ostby. El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) se ha recomendado como coadyuvante en la terapia endodóntica debido a que además de ser biocompatible muestra una alta eficiencia en la eliminación de la capa de lodo dentinario, lo cual ayuda a prevenir el bloqueo apical y de esta manera mejora la difusión de las soluciones desinfectantes en el conducto radicular. Su mecanismo de acción consiste en un efecto quelante sobre los iones de calcio de la dentina.

Por si solo tiene poca o ninguna actividad antimicrobiana. El EDTA al 17% a pH 7, puede facilitar el acceso a conductos muy estrechos y descalcificar hasta una profundidad de 50 um.⁵⁹

Otros agentes desmineralizantes empleados en endodoncia han sido: el ácido maleico, el ácido paracético y el ácido cítrico.

Enzimas Proteolíticas

La tripsina al igual que la proteinasa K son enzimas proteolíticas las cuales han sido usadas para degradar la matriz extracelular. La tripsina al utilizarla con activación ultrasónica fué capaz de matar eficazmente a las bacterias aeróbicas y anaeróbicas además de tener capacidad para alterar biofilm.⁶⁰

Medicación Intraconducto: Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio es una de las sustancias más ampliamente utilizadas en endodoncia, dentro de sus múltiples indicaciones se ha propuesto como medicación intraconducto y solución irrigadora. Su actividad antibacteriana se debe a su elevado pH (12.8) y a la liberación de iones hidróxilo. Sin embargo se ha demostrado que el hidróxido de calcio ha sido ineficaz contra biofilms de *E. faecalis* incluso después de 24 horas de tratamiento.^{61,62}

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*, *E. 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 SDS

Para obtener el hidrogel cargado con SDS, 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 y el SDS para obtener una concentración final del 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 aforó a 100 de volumen final de la solución. Bajo estas condiciones experimentales el hidrogel se almacenó a 4°C durante 2 meses para evaluar su estabilidad.

Actividad Antimicrobiana del Hidrogel cargado con SDS

El efecto bactericida del hidrogel-SDS sobre el crecimiento de *E. faecalis* y/o cultivo polimicrobiano mixto 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). 1X10⁴ células fueron inoculadas en 100 µl de medio TSB en placas de poliestireno de 96 pozos. Como control de crecimiento se emplearon microorganismos cultivados en medio TSB sin ningún inhibidor. CTAB 1% e hipoclorito de sodio 2.5% fueron utilizados como inhibidores positivos. La placa de 96 pozos fue incubada a 37 °C durante 18 horas. 10 µl de MTT fueron añadidos a cada pozo, la placa se protegió contra la luz y se incubó a 37 °C, por 2 horas, 200 µl 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 medida fue analizada por estadística descriptiva.

Actividad Antibiofilm del Hidrogel cargado con SDS sobre el Biofilm de *E. faecalis*

Para evaluar la capacidad del hidrogel-SDS para remover el biofilm formado por *E. faecalis* y/o cultivo polimicrobiano 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 SDS 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 24 horas y luego se agregó el hidrogel-SDS, CTAB, o hipoclorito de sodio como controles positivos. Se dejó actuar por 24 horas y FDA fue diluida a 10 µg/ml 200 µl fueron añadidos a cada pozo. Se incubó la placa a 37°C durante 30 min 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 de 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

Actividad Antimicrobiana del Hidrogel-SDS

Al analizar la actividad antimicrobiana del hidrogel-SDS sobre *E. faecalis* se encontró que inhibió 94% del crecimiento bacteriano (Figura 1). En comparación con CTAB e hipoclorito de sodio la efectividad antimicrobiana del hidrogel-SDS compite y superó ligeramente al hipoclorito de sodio.

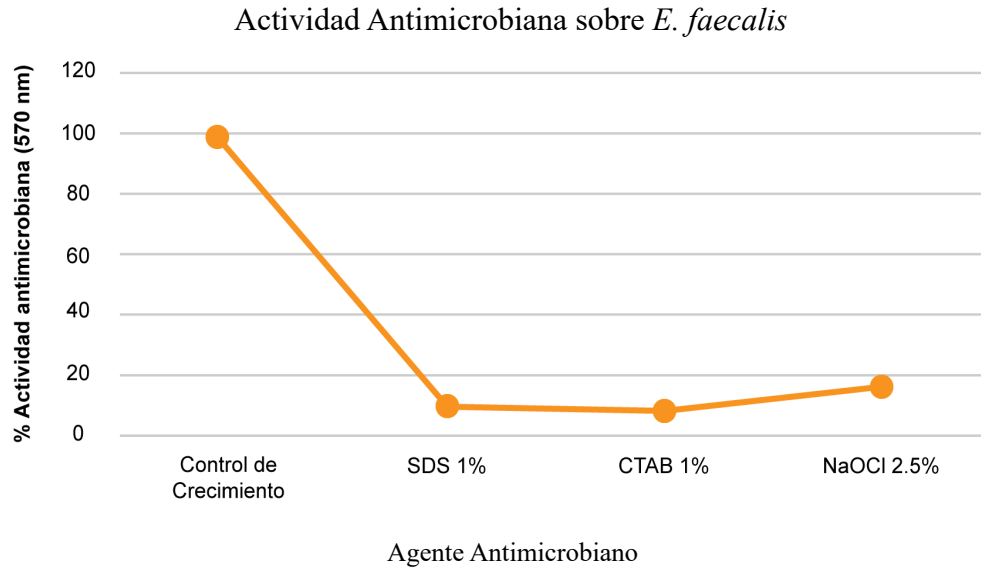


Figura 1. Actividad antimicrobiana del hidrogel-SDS sobre el crecimiento de *E. faecalis* mediante ensayo de viabilidad celular MTT.

Cuando el hidrogel-SDS se expuso a un cultivo polimicrobiano se encontró prácticamente el mismo comportamiento al observado sobre *E. faecalis* (Figura 2). El hidrogel-SDS inhibió el 82% del crecimiento de los microorganismos del cultivo mixto, CTAB 86% y el hipoclorito de sodio un 79% (Fig.2).

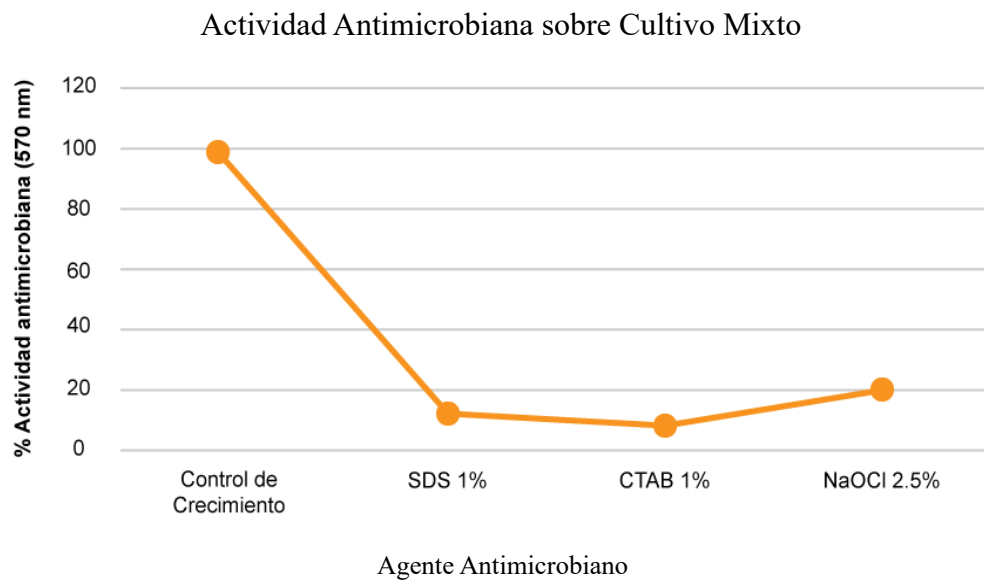


Figura 2. Actividad antimicrobiana del hidrogel-SDS sobre el crecimiento de un cultivo polimicrobiano mixto mediante ensayo de viabilidad celular MTT.

Actividad Antibiofilm del Hidrogel-SDS sobre *E. faecalis* Biofilm

Al analizar la actividad antibiofilm del hidrogel-SDS se encontró que removió el 63% del biofilm de *E. faecalis* 24 horas post-tratamiento (Figura 3). La efectividad antibiofilm del hipoclorito de sodio y CTAB fueron ligeramente superiores con un 68 y 67% respectivamente (Fig. 3).

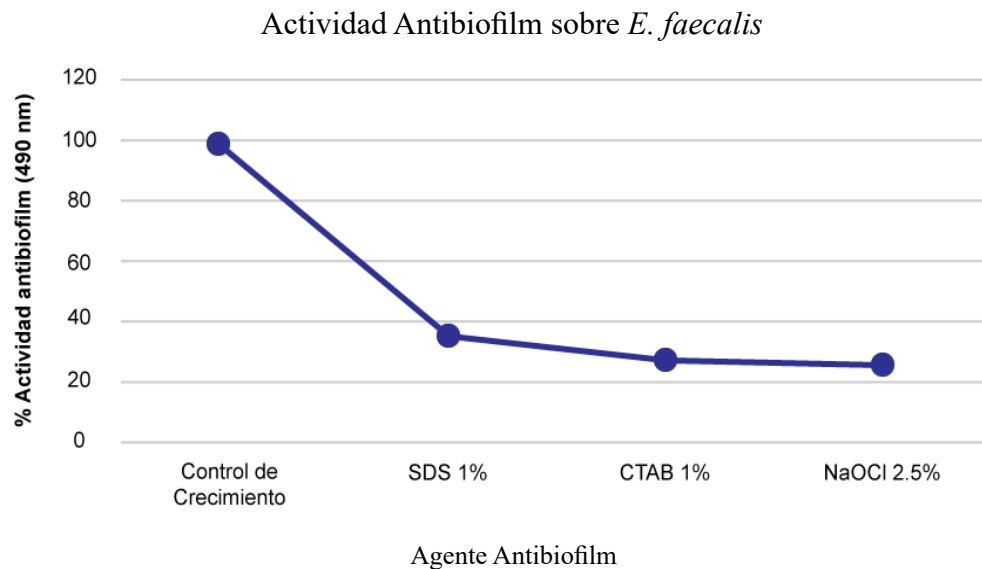


Figura 3. Actividad antibiofilm del hidrogel-SDS sobre un biofilm de 24 horas de *E. faecalis* por el ensayo de FDA y microscopia de fluorescencia.

Actividad Antibiofilm del Hidrogel-SDS sobre un Biofilm de Cultivo Mixto

Los resultados obtenidos acerca del potencial antibiofilm del hidrogel-SDS sobre un biofilm de cultivo mixto, fueron muy similares a los encontrados con el biofilm homogéneo de *E. faecalis* (Figura 4). El hidrogel-SDS removió el 79% del biofilm mixto al igual que el CTAB, y el hipoclorito de sodio removió un 76% del mismo biofilm 24 horas post-exposición.

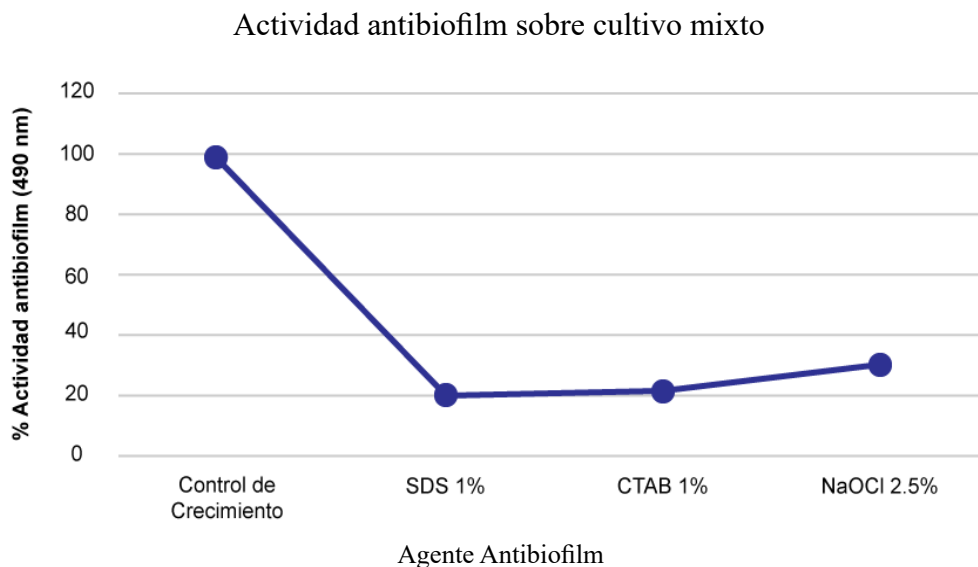


Figura 4. Actividad antibiofilm del hidrogel-SDS sobre un biofilm polimicrobiano mixto de 24 horas mediante el ensayo de FDA y microscopia de fluorescencia.

Microscopía de Fluorescencia de la actividad Antibiofilm del Hidrogel-SDS

Con el objetivo de obtener imágenes que describieran de forma más visual el potencial antibiofilm del hidrogel-SDS sobre el cultivo polimicrobiano se obtuvieron imágenes mediante microscopia de fluorescencia y empleando FDA como dye. La Figura 5 muestra el biofilm remanente post-exposición con el hidrogel-SDS mostrando la ausencia de bacterias. Un fenómeno similar se observa con los tratamientos con CTAB e hipoclorito de sodio.

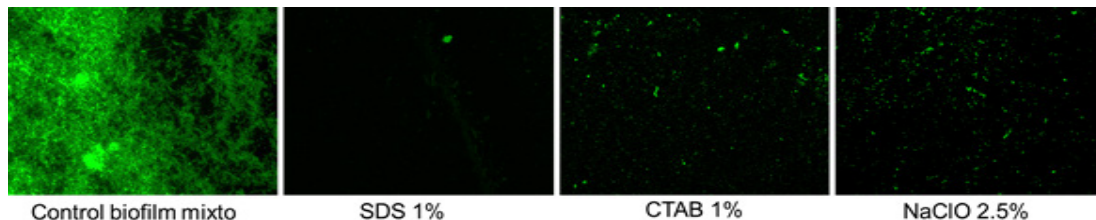


Figura 4. Actividad antibiofilm del hidrogel-SDS sobre un biofilm polimicrobiano mixto de 24 horas mediante el ensayo de FDA y microscopia de fluorescencia.

9. DISCUSIÓN

Las enfermedades bucodentales se encuentran entre las cinco causas de mayor demanda de atención en los servicios de salud de nuestro país. Las enfermedades orales de mayor prevalencia, de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (O.M.S.) son: caries dental y enfermedad periodontal. Una consecuencia común de una caries no atendida es la necrosis pulpar y la potencial pérdida de los dientes. El tratamiento de endodoncia consiste en la remoción de remanentes de tejido pulpar, microorganismos y toxinas bacterianas de los conductos radiculares lo cual es punto esencial para lograr un tratamiento exitoso.⁶³ La desinfección durante el tratamiento endodóntico se ha basado tradicionalmente en el uso de soluciones desinfectantes como el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones, clorhexidina, EDTA y la colocación de medicamentos intraconductos como el hidróxido de calcio. Sin embargo, a pesar de su gran potencial antimicrobiano; el tiempo de exposición con las superficies de las paredes dentinarias puede ser demasiado corto para tener efecto sobre un biofilm maduro de más de 7 días de formación. Se ha reportado la aparente eficiencia del hipoclorito de sodio como agente antimicrobiano, sin embargo; su efecto en remoción de biofilm intraconducto no ha sido suficientemente explorado, principalmente por la carencia de adecuados modelos experimentales que permitan reproducir fielmente el comportamiento de las bacterias que conforman el biofilm intraconducto.

En este estudio se encontró que el hidrogel con 1% de SDS inhibió el crecimiento de *E. faecalis* solo y en cultivo mixto, con similar eficacia que hipoclorito de sodio y CTAB. No existen muchos reportes del uso de detergentes aniónicos como el SDS en la odontología, pero si de aminos cuaternarios como el cetilpiridino.

La efectividad antibiofilm del hidrogel-SDS fue similar a la obtenida con hipoclorito de sodio y CTAB 24 horas posterior a la exposición, lo cual sugiere un potencial importante para su aplicación una vez realizada la limpieza químico-mecánica; pudiéndose utilizar este hidrogel entre citas como un medicamento intraconducto.

Creemos que, sumando al efecto de irrigación con el hipoclorito de sodio, el hidrogel con SDS incrementaría de forma relevante los porcentajes de éxito en la limpieza y desinfección de los conductos radiculares. Es importante recalcar que el efecto antimicrobiano y antibiofilm del SDS se presenta incluso a bajas concentraciones, además de tener la gran ventaja de ser económico.

Así mismo, debemos considerar que recientes investigaciones 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.⁶⁴ Hidrogeles a base de hidrocélulosa cargados con nitrato de plata han sido reportados con actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado hidrogeles a base de carbopol suplementados con metronidazol han sido propuestos para liberación tópica para el tratamiento de vaginosis bacteriana.⁶⁵

10. CONCLUSIONES

En conjunto los resultados obtenidos sugieren fuertemente que un hidrogel compuesto por el detergente SDS constituye una alternativa efectiva y económica para inhibir el crecimiento y formación de biofilm de los microorganismos presentes en los conductos radiculares.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Hargreaves KM., Berman LH., Cohen.S. : Pathways of the Pulp. 11 Edition 2016. Elsevier Pag. 599-600
- 2.- Sundquist G. (1976) Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Dr. Odont. Thesis, University of Umea, Umea, Sweden.
- 3.- Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy.* 1974;25:347–58.
- 4.- Siqueira JF Jr: Microbiology of apical periodontitis. In Ørstavik D, Pitt Ford T, editors: *Essential endodontology*, ed 2, Oxford, UK, 2008, Blackwell Munksgaard, p 135.
- 5.- 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: 340-349.
- 6.- Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson Filho P, Silva LA. “Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulp with and without radiographically evident pathosis”. *Int Endod J* 2008;41:664-669.
- 7.- Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF., Jr. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:320–5.
- 8.- Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:128–37.
- 9.- Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 632–641.
- 10.- Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 327–331.
- 11.- Haapasalo, M., Udnæs, T., Endal, U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod. Top.* 2003; 6: 29–56.
- 12.- Rocas, I.N., Siqueira, J.F., Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J. Endod.* 2010; 36: 45–52.

- 13.-Ran, S., He, Z., Liang, J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. *Arch. Oral Biol.* 2013; 58: 1667–1676.
- 14.-Wang, J.; Jiang, Y.; Chen, W.; Zhu, C.; Liang, J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J. Endod.* 2012; 38: 954–959.
- 15.-Love RM. *Enterococcus faecalis*—A mechanism for its role in endodontic failure. *Int. Endod. J.* 2001; 34: 399–405..
- 16.- Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.*1987;13:29–39.
- 17.-Siqueira JF, Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections.*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 174–8.
- 18.- Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1991; 7: 226–9.
- 19.- Costerton JW. *The Biofilm Primer.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
- 20.- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167–193.
- 21.- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am.* 1978; 238 (1): 86-95.
- 22.- Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006;32:312-8.
- 23.- Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815-8.
- 24.Lopez Piriz R, Aguilar L,Gimenez MJ. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:116-21.
- 25.-Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 2010; 5(6): 917-933.
26. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-575.
27. Payne DE, Boles BR. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. *Curr Genet.* 2016; 62(1): 137-141.

- 28.- Donné J, Dewilde S. The challenging world of biofilm physiology. *Adv Microb Physiol.* 2015; 67: 235-292.
- 29.- Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231-52.
- 30.- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.
- 31.- Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *Journal Medical Microbiology* 1996; 44: 79-87.
- 32.- Costerton JW, Stewart PS (2000) Biofilms and device - related infections. In: Nataro PJ, Balser MJ, Cunningham – Rundels S, eds, *Persistent Bacterial Infections*. Washington, DC: ASM Press, pp.423-39.
- 33.- Devaraj S., Jagannathan N., Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis* in vitro *Sci. Rep.* 2016, 6: 247-97
- 34.- Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2005, 437: 41-47
- 35.- Ferreira RB, Alfredo E, Porto de Arruda M, Silva Sousa YT, Sousa Neto MD. Histological analysis of the cleaning capacity of nickel titanium rotary instrumentation with ultrasonic irrigation in root canals. *Aust Endod J* 2004; 30:56 -8.
- 36.- Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod* 2004;30 (8):559-67.
- 37.- Peters OA, Schonberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J*, 2001; 34 (3): 221-30.
- 38.- Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics.* 2005; 10: 77–102.
- 39.- O'Connell M *et al.* A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *Endod J.* 2000; 26: 739-43.
- 40.- Grande N, Plotino G, Falanga A, Pomponi M, Somma F. Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. *J Endod.* 2006; 32:460-4.
- 41.- Royal M, Williamson A, Drake D. Comparison of 5.25% Sodium Hypochlorite, MTAD,

- and 2% Chlorhexidine in the Rapid Disinfection of Polycaprolactone-Based Root Canal Filling Material. *J Endod.* 2007; 33 (1): 42 – 44.
- 42.- Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the Effect of Two Endodontic Irrigation Protocols on the Elimination of Bacteria from Root Canal System: A Prospective, Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2012; 38 (11): 1479 -1483.
- 43.- Jena A; Kumar S, Govind S. Root Canal Irrigants: A Review of Their Interactions, Benefits, And Limitations. *Compendium.* Apr 2015; 36 (4): 256 – 260.
- 44.- Estrela C, Barbin E, Spanó J, Marchesan M, Pécora J. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13(2): 113-117.
- 45.- Zehnder, M. Root canal irrigants. *J. Endod.* 2006; 32: 389–398.
- 46.- Good, M., El K.I., Hussey D.L. Endodontic ‘solutions’ part 1: A literature review on the use of endodontic lubricants, irrigants and medicaments. *Dent. Update* 2012; 39: 239–246.
- 47.- Haapasalo M., Shen Y., Wang Z. Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* 2014; 216: 299–303.
- 48.-Yang Y. Shen Y. Wang Z., Huang X., Maezono H., Ma J., Cao Y., Haapasalo M. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. *J. Endod.* 2016; 42: 1246–1250.
- 49.-Ordinola-Zapata R., Bramante CM., Aprecio RM., Handysides R.; Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int. Endod. J.* 2014; 47: 659–666.
- 50.-Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J. Appl. Oral Sci.* 2016; 24: 291–298.
- 51.- Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 1981; 7:128-32.
- 52.- Evanov C, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP: Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine irrigants at 37° C and 46° C, *J Endod* 2004; 30: 653.
- 53.- Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*1994; 20 (6): 276-78.
- 54.- Zorko M., Jerala R. La alexidina y la clorhexidina se unen al lipopolisacárido y al ácido lipoteicoico y previenen la activación celular mediante antibióticos. *J. Antimicrob. Quimioterapia* 2008; 62 : 730–737.

- 55.- Kim HS, Zhu Q, Baek SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW, Lee W, Gu Y, Lee Y, Hong ST, Bae KS, Kim JW, Cho K, Kum KY. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J Endod* 2012; 38 : 112–116.
- 56.- Sundus B, Hanan B. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod* 2017; 43: 643-647.
- 57.- Daming Wu, Wei Fan, Anil Kishen, James L. Gutmann, Bing Fan. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 2014; 40: 285-290.
- 58.- Shrestha A, Kishen A. Antibacterial nanoparticles in Endodontics: A review. *J Endod* 2016; 42 (10) : 1417-1426.
- 59.- Hulsmann M, Stotz S. Efficacy, cleaning, ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment. *Int Endod J* 1987;30 (4):227-233.
- 60.- Niazi SA, Clark D., Do T., Gilbert SC, Foschi F., Mannocci F., Beighton D. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J.* 2014; 47(8) : 756–768.
- 61.- Upadya M., Sestha A., Kishen A. Role of efflux pump inhibitors on the antibiofilm efficacy of calcium hydroxide, chitosan nanoparticles, and light-activated disinfection. *J Endod.* 2011; 37 : 1422-1426.
- 62.- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32(2): 93–98.
- 63.- Siqueira Junior F, Rocas IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surfaces areas: Causes clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res* 2018; Vol 32;1.
- 64.- Fantozzi F, Arturoni E, Barbucci R. The effects of the electric fields on hydrogels to achieve antitumoral drug release. *Bioelectrochemistry* 2010; 78(2):191-195.
- 65.- Singh VK *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: 151-158.