UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

"Efectividad antibiofilm de un hidrogel de nanopartículas de Selenio sobre *Enterococcus faecalis*"

POR

JUAN MANUEL SIFUENTES CASAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA

MONTERREY, N. L. DICIEMBRE 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

"Efectividad antibiofilm de un hidrogel de nanopartículas de Selenio sobre *Enterococcus faecalis*"

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO

TESISTA: JUAN MANUEL SIFUENTES CASAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN POSGRADO

Los miembros del jurado aceptamos la investigación y aprobamos el documento que avala a la misma, que como opción al título de Maestría en Odontología Avanzada presenta:

JUAN MANUEL SIFUENTES CASAS

Honorables miembros del jurado

PRESIDENTE

SECRETARIO

1° VOCAL

2° VOCAL

3° VOCAL

ÍNDICE

RESUMEN……I

ABSTRACT……II

INTRODUCCIÓN……..…..……...1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…….…….……4

JUSTIFICACIÓN…….….…....5

HIPÓTESIS…….….…...6

OBJETIVOS…….…....7

ANTECEDENTES…….…….....8

Enfermedades infecciosas y resistencia antimicrobiana…….…….....8

Infecciones asociadas a la formación de biofilm……....9

Especies patógenas de *E. faecalis*……..……12

E. faecalis……..……..12

Los biofilms bacterianos: resistentes a los agentes antimicrobianos…….....13

Agentes antimicrobianos……14

Nanotecnología……...15

Selenio……16

MATERIAL Y MÉTODOS……...17

Síntesis y caracterización de nanopartículas de selenio……...17

Desarrollo de hidrogel cargado con SeNPs……...……..……17

Actividad antimicrobiana con nanopartículas de selenio por prueba de difusión de agar……..18

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del hidrogel cargado con nanopartículas de Selenio por ensayo de viabilidad celular XTT…….……....18

Actividad antibiofilm de nanopartículas de selenio por microscopía de fluorescencia……...19

RESULTADOS……..20

Caracterización de las nanopartículas de selenio……..……..……....20

Actividad antifúngica de SeNPs……..……21

Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC) de SeNPs…….....21

Actividad antibiofilm de las nanopartículas de selenio…….....23

DISCUSIÓN……...……...24

CONCLUSIONES……...…….25

BIBLIOGRAFÍA……...…...26

RESUMEN

A pesar del hecho de que vivimos en una era de tecnologías avanzadas e innovadoras, las enfermedades infecciosas siguen siendo uno de los desafíos de salud más grande en todo el mundo. La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes, es un problema de salud pública que se creía superado. En este trabajo se tuvo por objetivo determinar la actividad antifúngica y antibiofilm de un hidrogel de nanopartículas de selenio. Las nanoestructuras se sintetizaron por método coloidal reduciendo la sal de partida. La actividad antimicrobiana se analizó mediante el ensayo XTT específico para hongos. La actividad antibiofilm se analizó por el ensayo FMCA y microscopía de fluorescencia. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que las nanopartículas de selenio (SeNPs) presentaron una forma circular con un tamaño promedio de 104 nm y una distribución homogénea. Al analizar su actividad antifúngica se encontró que inhibió el crecimiento de *Candida albicans* mostrando un halo de 22 mm en comparación con el tratamiento control con Miconazol que presento solo 13 mm de inhibición. Al analizar la actividad antibiofilm se detectó que las SeNPs inhibieron la formación de biofilm con la misma efectividad que el tratamiento convencional basado en Miconazol. En conjunto estos datos indican que SeNPs constituyen una alternativa innovadora para el tratamiento de Candidiasis.

ABSTRACT

Even though we live in an era of advanced and innovative technologies, infectious diseases remain one of the biggest health challenges in the world. The resistance that antibiotics exercise to antibiotics, antiseptics and disinfectants, is a public health problem that is believed to have been overcome. In this work we have aimed to determine the antifungal and antibiotic activity of a selenium nanoparticle hydrogel. The nanostructures were synthesized by colloidal method by reducing the starting salt. Antifungal activity was analyzed in the fungal specific XTT assay. Antibiotic activity was analyzed by the FMCA assay and fluorescence microscopy. Among the results, it was found that the selenium nanoparticles (SeNPs) had a circular shape with an average size of 104 nm and a homogeneous distribution. When we analyzed its antifungal activity, we found that it inhibited the growth of *Candida albicans* showing a halo of 22 mm compared to the control treatment with Miconazole that only had 13 mm of inhibition. When we analyzed the antibiotic activity, it was detected that the SeNPs inhibited the formation of biofilm with the same effectiveness as the conventional treatment based on Miconazole. Together these data indicate that SeNPs are an innovative alternative for the treatment of Candidiasis.

1. INTRODUCCIÓN

Un biofilm bacteriano maduro consiste en una multicapa de bacterias adherentes a una superficie incrustado en una matriz de exopolisacáridos (EPS) (Kishen, 2010; Siqueira, Rôças, & Ricucci, 2010). La resistencia antimicrobiana entre los microorganismos patógenos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Existen muchos mecanismos por medio de los cuales un microbio puede llegar a ser resistente al ataque con antibióticos, uno de ellos es la formación de "biofilm" (Davies, 2003). Una vez que las bacterias se establecen dentro del conducto radicular, especialmente dentro de los canales accesorios más pequeños, no pueden ser fácilmente alcanzados por los mecanismos de defensa del huésped o por antibióticos sistémicos. *Enterococcus faecalis*, es un coco anaeróbico, grampositivo que ha sido implicado en infecciones persistentes del conducto radicular y es aislado en el 38% de los casos con microorganismos recuperables (Bottcher, Sehnem, Montagner, Fatturi Parolo, & Grecca, 2015). Las bacterias que son miembros de una comunidad de biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistente a los compuestos antimicrobianos que sus planctónicos homólogos (Kolenbrander, 2011), afectando el éxito del tratamiento endodóntico. El biofilm oral constituye un excelente modelo experimental para evaluar la efectividad *in vitro* de un hidrogel con actividad antimicrobiana y antibiofilm. Las nanopartículas (NPs) pueden proporcionar una nueva estrategia para tratar y prevenir infecciones (Magalhães et al., 2016). Reportes previos, han reportado la actividad antimicrobiana, anticancerígena y antioxidante de nanopartículas de selenio (Estevam et al., 2017; Piacenza et al., 2017; Zhai et al., 2017)

Las enfermedades bucales afectan entre 60 y 90 % de la población en el mundo, las caries dentales en humanos se encuentran ampliamente distribuida, una patología responsable de daño en la boca que afecta a la población de cualquier edad, sexo, condición social y lugar de residencia. El impacto que se genera en la salud bucal de una población lleva mucho tiempo en ser observado, ya que las enfermedades bucales dependen de múltiples factores y de la educación para la salud como elemento básico en la modificación de hábitos higiénicos y dietéticos (Peres et al., 2019). Con la significante reducción en la inversión en el desarrollo e investigación de nuevos antimicrobianos entre las grandes compañías farmacéuticas, no se producen nuevas alternativas de tratamiento con el rango suficiente para eliminar la emergente resistencia entre las bacterias patógenas (Falagas, Fragoulis, & Karydis, 2006) (Falagas et al., 2006). extracción del implante, aumentando así el trauma para el paciente y el coste del tratamiento (Mah & O'toole, 2001).

Recientemente la nanotecnología ha surgido como una nueva ciencia con diversas aplicaciones, incluyendo la ciencia de los materiales, electrónica, biotecnología, microbiología, entre otros. Las nanopartículas son consideradas normalmente por tener un tamaño alrededor de los 100 nm, exhibiendo propiedades muy diferentes que los mismos materiales de la misma composición debido a una mayor relación entre volumen/superficie asociada a una mayor capacidad de interacción con otras moléculas. En particular el uso de nanopartículas de plata, oro, cobre, zinc, silicio y sus óxidos han sido considerados importantes por tener efectos antimicrobianos (Allaker, 2010). Los metales nobles y sus compuestos se han utilizado como agentes terapéuticos de la antigüedad en la medicina para el tratamiento de diversas infecciones. Recientemente, se han hecho muchos avances en el campo de la

nanobiotecnología hacia el desarrollo de diferentes tipos de nanomateriales con una amplia gama de aplicaciones. Entre las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de metales nobles han demostrado potenciales aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, en este trabajo proponemos analizar la eficacia antibiofilm antimicrobiana de un gel basado en nanopartículas de selenio en un modelo *in vitro* de *Enterococcus faecalis,* comparando los resultados con el tratamiento tradicional con hidróxido de calcio.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las infecciones en el conducto radicular se caracterizan por una gran persistencia requiriendo hasta meses de tratamiento para poder erradicarlas. Debido a la multirresistencia a los antimicrobianos que está en aumento a nivel mundial, es necesario el desarrollo de alternativas de tratamiento innovadoras y a bajo costo para ser implementadas en toda la población. En el caso particular de *E. faecalis*, el tratamiento convencional puede ser no exitoso y, por lo tanto, urge el desarrollo de alternativas eficaces que sean de bajo costo y seguras. En este trabajo se estudió la eficacia antimicrobiana de un hidrogel de nanopartículas de selenio sobre *E. faecalis*. En caso de tener éxito se contará con una innovadora alternativa para el tratamiento de conductos basado en nanopartículas de selenio.

¿El hidrogel de SeNPs obtendrá potencial antimicrobiano y antibiofilm sobre *Enterococcus faecalis*?

3. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana y antibiofilm sobre *Enterococcus faecalis* de un hidrogel de nanopartículas de selenio será altamente efectiva.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel basado en nanopartículas de selenio.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de selenio mediante microscopía electrónica de barrido y EDX.
- Desarrollar un hidrogel de selenio en base a carboximetilcelulosa
- Establecer la actividad antimicrobiana del hidrogel de nanopartículas de selenio.
- Evaluar la actividad antibiofilm del hidrogel de nanopartículas de selenio.

5. ANTECEDENTES

5.1 Enfermedades infecciosas y resistencia antimicrobiana

Las enfermedades de origen infeccioso causadas por bacterias y hongos patógenos representan un desafío serio para la farmacología y medicina actual puesto que se evidencia a través de los millones de muertes que causan a nivel mundial. Los microorganismos causantes de estas enfermedades se encuentran en diversas partes del entorno que incluye nuestro propio cuerpo cuya zona con mayor porcentaje de microorganismos es la cavidad oral en la que se manifiestan diversas enfermedades altamente prevalentes como la caries dental y la enfermedad periodontal. Por ello, debido al desarrollo vertiginoso de la resistencia bacteriana y la toxicidad de algunos medicamentos, se hace propicia la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos a través del uso de nanopartículas de Selenio, beneficiosos no solo para la salud en general sino también en una posible aplicación para la salud bucal. (Arévalo & Gómez, 2016)

Según la Organización Mundial de la Salud, en términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos tienen caries dental, a menudo acompañada de dolor o sensación de molestia. Las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan entre un 15% y 20% de los adultos de edad media (35-44 años). La pérdida total de la dentadura es un fenómeno bastante generalizado que afecta sobre todo a las personas mayores. Alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y 74 años no tiene dientes naturales.

5.2 Infecciones asociadas a la formación de biofilm

Los hongos y las bacterias en la naturaleza no generalmente crecen en suspensiones nutritivas de laboratorio, ya que pueden desarrollarse en superficies e interfaces. Por muchos años, los microorganismos han sido vistos como formas de vida simple, creciendo como células individuales en suspensiones líquidas cuando los nutrientes requeridos están presentes y sobreviviendo como organismos latentes o en esporas cuando estén ambientalmente estresados. Después de observar los primeros microorganismos que fueron encontrados en superficies, se hizo evidente que ellos prefieren crecer en superficies asociadas a comunidades o microcosmos, hoy en día comúnmente llamado biofilm o biocapa. Recientemente, los biofilms han sido involucrados en muchas condiciones médicas e infecciones. Con el incremento del uso de procedimientos médico-invasivos, las infecciones que forman biofilm constituyen un importante factor de riesgo para complicaciones postoperatorias. Muchas infecciones crónicas y persistentes, como la endocarditis, osteomielitis, periodontitis, otitis media e infecciones del tracto biliar han sido atribuidas al desarrollo del biofilm bacteriano. Sin duda, la cavidad oral es un ecosistema en constante colonización y crecimiento de diversos microorganismos, siendo las especies bacterianas y hongos más comunes y debe señalarse que están íntimamente relacionados con el desarrollo de la caries dental, moniliasis bucal o candidiasis además de la enfermedad periodontal (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999). Dentro de este marco, las especies bacterianas demuestran un comportamiento cooperativo y pueden subsecuentemente diferenciarse más para exponer comportamientos complejos multicelulares. Los microrganismos pueden ser susceptibles a las condiciones del medio ambiente,

creciendo dentro de comunidades complejas (biofilm), dicho de otro modo, pueden ser resistentes a los antimicrobianos de uso común (Costerton, 1995).

5.3 Los biofilms bacterianos: inherentemente resistentes a los agentes antimicrobianos

A pesar de los continuos esfuerzos, el incremento en la prevalencia de resistencia a los antibióticos comunes entre las bacterias patogénicas ha llegado a ser el problema más importante en la medicina moderna. Con la significante reducción en la inversión en el desarrollo e investigación de nuevos antimicrobianos entre las grandes compañías farmacéuticas, no se producen nuevas alternativas de tratamiento con el rango suficiente para eliminar la emergente resistencia entre las bacterias patógenas. La incidencia de infecciones por Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquiridas en la comunidad incrementó dramáticamente en los últimos dos años, con al menos 50% de las infecciones clasificadas como resistentes a meticilina y 30% de Enterococos exhibiendo resistencia a vancomicina1. En el 2010, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América, lanzó su iniciativa 10x20, realizando un llamado para el desarrollo de nuevas drogas antibacterianas, con la meta de sintetizar al menos 10 nuevos antibióticos para el año 2020. Adicionalmente, el continuo uso excesivo de las limitadas clases efectivas de antibióticos actualmente disponibles amenaza a la llamada “era de los antibióticos”. En la década pasada, la crisis de resistencia antimicrobiana empeoró significativamente y existe una urgente necesidad de nuevos agentes antimicrobianos con actividad contra patógenos de resistencia múltiple (Falagas et al., 2006) (Guntheroth, 1984).

5.4 Nanotecnología

El término nanotecnología se refiere a la manipulación de la materia en la escala atómica y las moléculas donde el tamaño se mide en millonésimas de un milímetro ($1x10^{-9}$ metros). La ciencia a nanoescala (o nanociencia) estudia los fenómenos, las propiedades, y respuestas de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, y en general en tamaños entre 1 y 100 nm. En esta escala, y especialmente por debajo de 5 nm, las propiedades de la materia difieren significativamente (es decir, los efectos a escala cuántica juegan un papel importante) de eso en una escala de partículas más grande. La nanotecnología es entonces el diseño, la manipulación, construcción, producción y aplicación, controlando la forma y tamaño, las propiedades-respuestas y funcionalidad de las estructuras, dispositivos y sistemas del orden o menos de 100 nm (Logothetidis, 2012).

La nanotecnología está influenciando en muchas disciplinas las cuales son esenciales para la vida y más significativamente en salud y medicina. Nanotecnología aplicada a la medicina, dirige a retos significativos en avances en materiales médicos estructurados a nanoescala, dispositivos, dispositivos biotecnológicos, sistemas de aparatos moleculares, además de nanorrobótica.

Las fabricaciones nano-moleculares, modificaciones superficiales, desarrollo cuántico, nanoformulaciones, son algunos métodos basados en nanotecnología, por el cual se desarrollan los sistemas para aplicaciones biológicas y clínicas de la nanomedicina. Tales sistemas son aplicados en imágenes/visualización para el diagnóstico y terapia clínica, monitoreo, entrega de fármacos, aplicaciones en ingeniería de tejidos, terapéuticas experimentales y clínicas, orientado a células específicas, para efectos antibacteriales, métodos diagnósticos en modelos *in-vitro* como también diagnóstico y tratamiento del cáncer.

5.5 Selenio

El selenio es un elemento químico de número atómico 34, masa atómica 78,96 y símbolo *Se*; es un elemento semimetálico sólido de color gris brillante, de características parecidas a las del azufre, el selenio es bien conocido por sus propiedades fotoeléctricas y semiconductoras y ha sido usado satisfactoriamente en celdas solares, rectificadores, medidores de exposición fotográfica, también empleado para la fabricación de vidrio y xerografía. Selenio es además uno de los elementos esenciales para los humanos. Ha sido confirmado que el selenio puede mejorar la actividad de la seleno-enzima, peróxido de glutatión y previene los radicales libres de células dañadas y tejidos in vivo. Así, el selenio es utilizado como suplemento alimenticio y en la medicina. Recientemente, las nanopartículas de selenio están atrayendo más y más la atención debido a su excelente rendimiento fotoeléctrico y su alta actividad biológica, y se ha dedicado mucho esfuerzo para la fabricación de nanopartículas de selenio (Hosnedlova et al., 2018). Los métodos químicos basados en procedimientos de fase de solución parecen proporcionar una excelente ruta para la fabricación de nanopartículas de selenio, aunque hay un número de técnicas rutinarias que son capaces de sintetizar nanopartículas de selenio. El selenio ha sido investigado para algunas aplicaciones médicas como anticancer (L. C. Clark et al., 1996). El selenio como suplemento alimenticio ha demostrado que reduce el riesgo de varios tipos de cáncer incluyendo cáncer de próstata (L. Clark et al., 1998) cáncer de pulmón y esofágico (L. C. Clark et al., 1996) y canceres gástrico-cardiaco (Wei et al., 2004).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de selenio mediante microscopía electrónica de barrido y EDX.

6.1 Síntesis, caracterización y desarrollo de hidrogel de nanopartículas de selenio

Las nanopartículas de selenio fueron sintetizadas usando el método coloidal como fue reciamente descrito por Tran y Webster con ligeras modificaciones (Tran & Webster, 2011). Para llevar a cabo la síntesis se utilizaron los siguientes reactivos: selenito de sodio Na_2SeO_3 y L-glutation reducido (GHS) agua ultrapura (Barnstead Nanopure Diamond). Para caracterizar las nanopartículas sintetizadas y obtener información de la forma y tamaño de las nanoestructuras se obtuvieron micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM; FEI Tecnai G2 Twin, Hillsboro, OR; 160 kV accelerating voltage) y espectro EDX para evaluar la composición química.

6.2Desarrollo de hidrogel cargado con SeNPs

- Desarrollar un hidrogel de selenio en base a carboximetilcelulosa

Para llevar a cabo la preparación del hidrogel con SeNPs, preparamos PVA al 10 % con agitación magnética y calentamiento. Posteriormente, se adicionaron las nanopartículas de selenio y se mezclo durante 4 horas hasta formar una solución homogénea y formar un gel transparente. La concentración final del hidrogel a evaluar fue del 1%.

6.3 Actividad antimicrobiana con nanopartículas de selenio por prueba de difusión de agar

- Establecer la actividad antimicrobiana del hidrogel de nanopartículas de selenio.

6.4 Actividad antimicrobiana del hidrogel con nanopartículas de selenio por prueba de difusión de agar

La actividad antimicrobiana del hidrogel de SeNPs sobre el crecimiento de *E. faecalis* se determino por la prueba de difusión de agar de Kirby y Bauer. *E. faecalis* se cultivo en Agar Tripticaseína de Soya (TSB, BD DIFCO, Sparks MD, USA) a 37°C, durante la noche en condiciones aeróbicas con inóculos estándar (0.5 MacFarland). 100 µL de cultivo de la bacteria se esparcieron en placas con agar TSB usando torunda de algodón estéril. Después, se hicieron pozos con anillo de poliestireno de 5 mm de diámetro previamente esterilizados sobre la superficie de agar. Se colocaron 100 µL del hidrogel de nanopartículas de selenio al 1%. Hidrogel de PVA sin nanopartículas fue usado como control negativo. Después de dejarlo una noche en incubación a 37°C el diámetro del halo fue medido con Vernier.

6.5 Actividad antibiofilm de nanopartículas de selenio mediante MTT y microscopía de fluorescencia en modelo de dentina

- Evaluar la actividad antibiofilm del hidrogel de nanopartículas de selenio.

La actividad antibiofilm del hidrogel de SeNPs para inhibir el crecimiento de *E. faecalis fue* determinada usando el ensayo de MTT y microscopía de fluorescencia. La cepa de *E. faecalis* creció en agar SDB a 37°C, durante la noche en condiciones

aeróbicas. La siguiente colonia fue aislada e incubada en superficie de dentina (3x3 mm) previamente esterilizada. Después de incubar por 3 semanas y bajo cambio constante de medio de cultivo, se aplico el hidrogel de selenio al 1% por 7 días. Como control positivo se utilizará el hidróxido de calcio. Posteriormente , 10 µl de MTT fueron incubadas a 37 ºC durante 2 horas en ausencia de luz. Posteriormente, se cuantificaron a una longitud de onda de 570nm utilizando un lector de absorbancia de microplacas (Biotek, Winooski, VT). Para la evaluación de microscopia de fluorescencia, la inhibición de la formación del biofilm, una vez formado, se evaluo el hidrogel de SeNPs al 1% a diferentes tiempos de exposición (0, 4, 8 y 18 horas). Como control positivo. En este ensayo utilizamos diacetato de fluoresceína al 0.02%. Los resultados se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia a una longitud de onda de 495nm.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las nanopartículas de selenio

Caracterización del hidrogel cargado con SeNPs

El tamaño y forma de las nanopartículas de selenio fue determinado por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS. Como se puede apreciar en la Figura 1 las nanopartículas presentan una forma esférica con un tamaño promedio de 30nm, distribución homogénea y mediante la obtención de espectros EDS se corroboro la presencia de SeNPs dentro del hidrogel en base a quitosan al 1% mediante SEM.

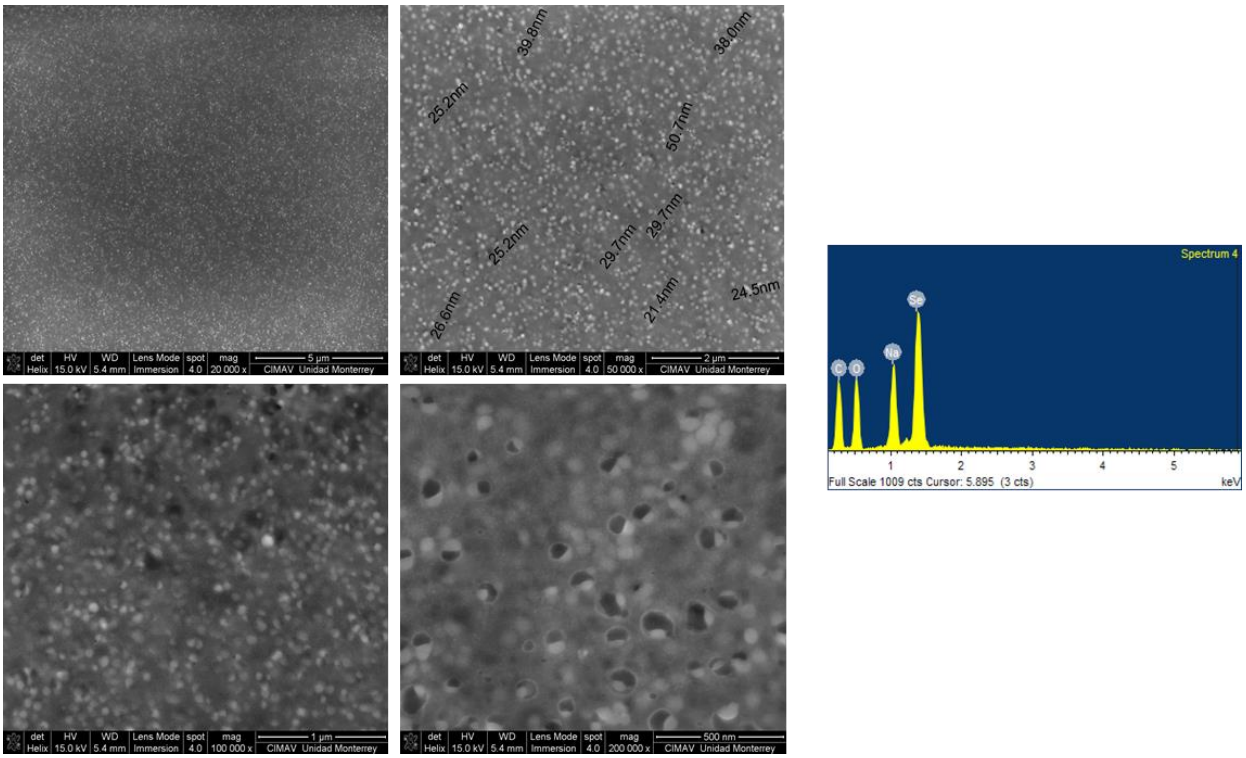

Figura 1. Caracterización de las nanopartículas de selenio. A), B) y C) Nanopartículas de selenio observadas por microscopía electrónica de barrido apreciando nanopartículas esféricas de 104 nm. D). Mediante la selección de un área específica al observar por SEM se obtuvo el espectro EDX que nos permite identificar y cuantificar la composición elemental del área seleccionada, corroborando que es selenio. E) Síntesis de SeNPs. F) SeNPs hidrogel.

7.2 Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con SeNPs

Al analizar la actividad antimicrobiana del hidrogel SeNPs se encontró que inhibió el crecimiento de *E. faecalis (*Figura 1). El promedio de halo de inhibición del hidrogel de SeNPs fue de 16mm. Los resultados con el control de clorhexidina al 2% fue de 14mm. Ambos comparados con el control negativo (agua destilada estéril).

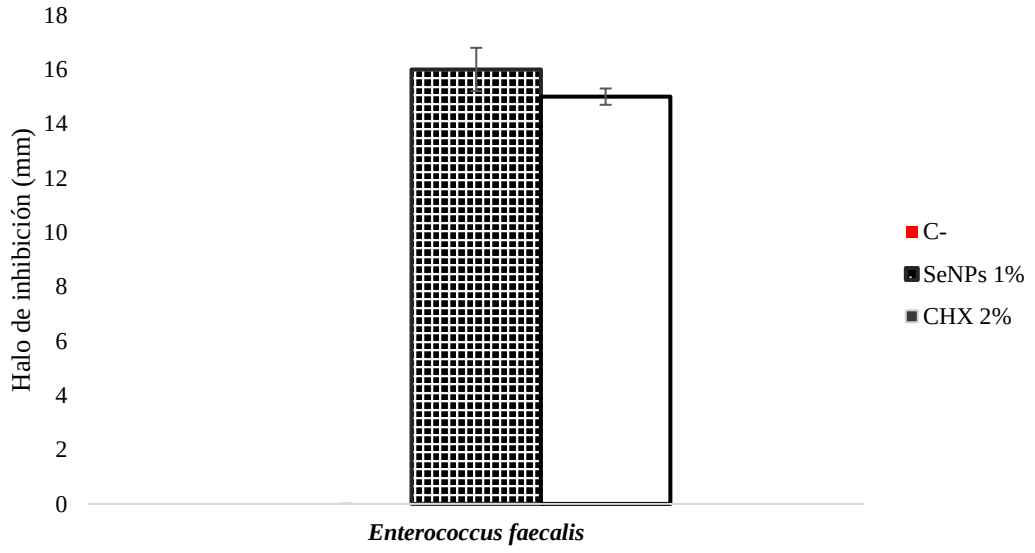

Figura 2. Actividad antimicrobiana del hidrogel de SeNPs sobre cultivo en agar de *E. faecalis*. Los resultados son expresados como el promedio del triplicado de experimentos individuales realizados 3 veces.

7.3 Actividad antibiofilm del hidrogel de SeNPs

Basados en los resultados previos acerca de la actividad antimicrobiana del hidrogel de SeNPs, se exploró la inhibición de la formación de biofilm sobre *E. faecalis* con 14 días de maduración. Los resultados de la actividad antibiofilm obtenidos mostraron que el hidrogel de SeNPs, redujo el biofilm de *E. faecalis* con un 90% de efectividad y el gel de clorhexidina mostró un 79%. Ambos comparados con el control de crecimiento.

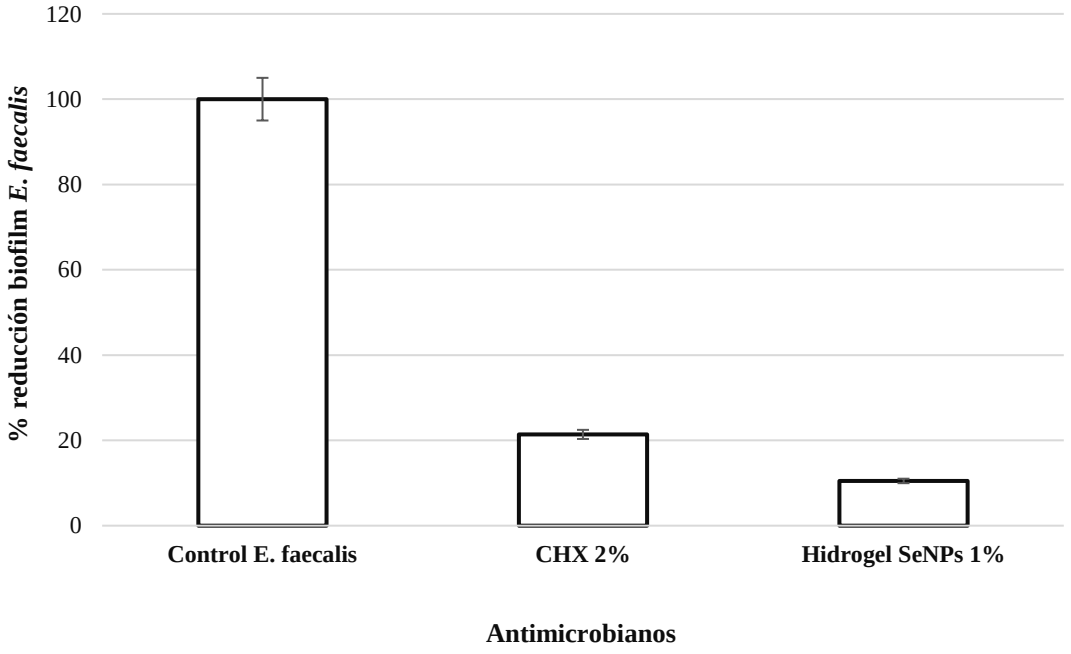

Figura 3. Actividad antibiofilm del hidrogel de SeNPs. Los resultados son expresados como el promedio del triplicado de experimentos individuales realizados 3 veces.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio destaca la importancia de SeNPs como agente antifúngico. Por lo tanto, la presente investigación no solo es una ruta alternativa potencial para el manejo Candidiasis oral, sino también un modo de contrarrestar el crecimiento del biofilm. En la actualidad existen pocas presentaciones tópicas y de aplicación localizada para tratar infecciones de origen fúngico. El antiséptico más empleado en el área odontológica es la clorhexidina. Normalmente se emplea en enjuague bucal al 0.12% o bien de forma directa 2% y en presentación en gel como coadyuvante en el tratamiento de gingivitis y periodontitis. Sin embargo, a pesar de la alta actividad antimicrobiana y antibiofilm que posee, varios reportes también indican la alta citotoxicidad incluso en 5 minutos de exposición sobre fibroblastos gingivales (Mariotti & Rumpf, 1999). En nuestro estudio se encontró que el hidrogel de SeNPs al 1% tuvo mayor efectividad antimicótica que el gel de Miconazol al 1% con sólo 4 horas de exposición. Este resultado puede deberse a la baja permeabilidad que presenta el Miconazol (Qushawy, Nasr, Abd-Alhaseeb, & Swidan, 2018). Diversos estudios apoyan que las nanopartículas de selenio presentan actividad antimicrobiana (Piacenza et al., 2017; Shoeibi & Mashreghi, 2017), antiparasitaria (Mahmoudvand et al., 2014), anticancer (Yang et al., 2017) y antioxidante (Zhai et al., 2017). En resumen, en este estudio se presenta la propiedad antifúngica y antibiofilm de un hidrogel de SeNPs, aunque desconocemos su potencial toxico se podría contemplar para su uso como aplicación tópica contrarrestando algunos tipos de micosis como la candidiasis oral.

9. CONCLUSIÓN

El hidrogel de SeNPs representa una opción efectiva para inhibir el crecimiento de *Enterococcus faecalis* y la formación de su biofilm. Las SeNPs podrían constituir el ingrediente activo de para el tratamiento intraconducto radicular.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Allaker, R. P. (2010). The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res, 89*(11), 1175-1186.

2. Arévalo, A. A. P., & Gómez, P. A. M. (2016). Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microrganismos patógenos de la flora oral. *In Crescendo Ciencias de la salud, 2*(2), 530-537.

3. Bottcher, D. E., Sehnem, N. T., Montagner, F., Fatturi Parolo, C. C., & Grecca, F. S. (2015). Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study. *J Endod, 41*(8), 1364-1370.

4. Clark, L., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, J. G., Turnbull, B., Slate, E., . . . Carpenter, D. (1998). Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *British journal of urology, 81*(5), 730-734.

5. Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., . . . Gross, E. G. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *Jama, 276*(24), 1957-1963.

6. Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology, 15*(3), 137-140.

7. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science, 284*(5418), 1318-1322.

8. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery, 2*(2), 114.

9. Estevam, E. C., Griffin, S., Nasim, M. J., Denezhkin, P., Schneider, R., Lilischkis, R., . . . Jacob, C. (2017). Natural selenium particles from Staphylococcus carnosus: Hazards or particles with particular promise? *J Hazard Mater, 324*(Pt A), 22-30.

10. Falagas, M. E., Fragoulis, K. N., & Karydis, I. (2006). A comparative study on the cost of new antibiotics and drugs of other therapeutic categories. *PLoS One, 1*(1), e11.

11. Guntheroth, W. G. (1984). How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *American Journal of Cardiology, 54*(7), 797-801.

12. Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttkay-Nedecky, B., Peng, Q., . . . Kizek, R. (2018). Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine, 13*, 2107-2128.

13. Kishen, A. (2010). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics, 22*(1), 99-123.

14. Kolenbrander, P. E. (2011). Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci, 3*(2), 49-54.

15. Logothetidis, S. (2012). Nanotechnology: Principles and applications. In *Nanostructured materials and their applications* (pp. 1-22): Springer.

16. Magalhães, A. P., Moreira, F. C., Alves, D. R., Estrela, C. R., Estrela, C., Carrião, M. S., . . . Lopes, L. G. (2016). Silver nanoparticles in resin luting cements: Antibacterial and physiochemical properties. *J Clin Exp Dent, 8*(4), e415-e422.

17. Mah, T.-F. C., & O'toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology, 9*(1), 34-39.

18. Mahmoudvand, H., Fasihi Harandi, M., Shakibaie, M., Aflatoonian, M. R., ZiaAli, N., Makki, M. S., & Jahanbakhsh, S. (2014). Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts. *Int J Surg, 12*(5), 399-403.

19. Mariotti, A. J., & Rumpf, D. A. (1999). Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol, 70*(12), 1443-1448.

20. Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., . . . Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet, 394*(10194), 249-260.

21. Piacenza, E., Presentato, A., Zonaro, E., Lemire, J. A., Demeter, M., Vallini, G., . . . Lampis, S. (2017). Antimicrobial activity of biogenically produced spherical Se-nanomaterials embedded in organic material against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus strains on hydroxyapatite-coated surfaces. *Microb Biotechnol, 10*(4), 804-818.

22. Qushawy, M., Nasr, A., Abd-Alhaseeb, M., & Swidan, S. (2018). Design, Optimization and Characterization of a Transfersomal Gel Using Miconazole Nitrate for the Treatment of Candida Skin Infections. *Pharmaceutics, 10*(1).

23. Shoeibi, S., & Mashreghi, M. (2017). Biosynthesis of selenium nanoparticles using Enterococcus faecalis and evaluation of their antibacterial activities. *J Trace Elem Med Biol, 39*, 135-139.

24. Siqueira, J. F., Rôças, I. N., & Ricucci, D. (2010). Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics, 22*(1), 33-49.

25. Tran, P. A., & Webster, T. J. (2011). Selenium nanoparticles inhibit Staphylococcus aureus growth. *Int J Nanomedicine, 6*, 1553-1558.

26. Wei, W.-Q., Abnet, C. C., Qiao, Y.-L., Dawsey, S. M., Dong, Z.-W., Sun, X.-D., . . . Mark, S. D. (2004). Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *The American journal of clinical nutrition, 79*(1), 80-85.

27. Yang, X., Zhang, W., Zhao, Z., Li, N., Mou, Z., Sun, D., . . . Lin, Y. (2017). Quercetin loading CdSe/ZnS nanoparticles as efficient antibacterial and anticancer materials. *J Inorg Biochem, 167*, 36-48.

28. Zhai, X., Zhang, C., Zhao, G., Stoll, S., Ren, F., & Leng, X. (2017). Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J Nanobiotechnology, 15*(1), 4.