

**“Evaluación in vitro de la concentración inhibitoria mínima de varios agentes antimicrobianos solos y en combinación para el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)”**

**“In Vitro Evaluation of the Minimum Inhibitory Concentration of Various Antimicrobial Agents Alone and in Combination for *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)”**

Anabel Giraldo Giraldo. <sup>1\*</sup>, Diana Cristina Aristizábal-Suárez. <sup>2</sup>, Andrea Liliana Diez-Valencia. <sup>3</sup>, Diego Mauricio Tobón-Calle. <sup>4</sup>, Mónica Andrea Arias-Londoño. <sup>5</sup>

1. Endodoncista. Candidata a MSc - Universidad CES, Medellín, Colombia.
2. Endodoncista. Docente Universidad CES, Medellín, Colombia.
3. Endodoncista. Docente Universidad CES, Medellín, Colombia.
4. Endodoncista. Docente Universidad CES, Medellín, Colombia.
5. Microbióloga Industrial y ambiental. MSc biología. Docente Universidad CES, Medellín, Colombia.

**TABLA DE CONTENIDO**

RESUMEN .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	8
3. OBJETIVOS.....	12
General.....	12
Específicos .....	12
4. METODOLOGÍA.....	12
Materiales y métodos.....	12
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	15
6. RESULTADOS .....	16
7. DISCUSIÓN.....	37
8. AGRADECIMIENTOS .....	42
9. CONFLICTO DE INTERESES .....	42
10. CONCLUSIONES.....	42
11. REFERENCIAS .....	43

## RESUMEN

**Introducción:** Se ha demostrado que los microorganismos son los principales responsables de las enfermedades pulpares y perirradiculares. La bacteria *Enterococcus faecalis*, encontrado más prevalentemente en infecciones endodónticas persistentes, resiste a medicamentos antibacterianos como hidróxido de calcio y pastas multiconjugadas. El aumento de los posibles casos de periodontitis apical refractarias por dicha resistencia, han llevado a la búsqueda de alternativas. Entre ellas se ha documentado que antibióticos de amplio espectro solos o combinados, pudiera ser una solución a esta problemática.

**Objetivo:** Mediante un estudio In vitro, evaluar la concentración inhibitoria mínima de varios agentes antimicrobianos de amplio espectro como la amoxicilina, el metronidazol y la ciprofloxacina, solos y en combinación, sobre el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

**Materiales y métodos:** Se usaron presentaciones comerciales de los antibióticos y la vancomicina como control. Se utilizaron técnicas de micro dilución para evaluar la actividad antimicrobiana frente a la cepa bacteriana de *E. faecalis* realizando análisis estadísticos ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples de TUKEY con un nivel de incertidumbre de 0,05. **Resultados:** En este estudio, la amoxicilina obtuvo el mayor porcentaje de inhibición sobre *E. faecalis* al ser utilizado en una baja concentración de 60 µg/ml. Hubo diferencia estadísticamente significativa con los demás antibióticos.

**Conclusiones:** Se demostró una relación directamente proporcional entre el aumento de la concentración de cada antibiótico y su efecto en el porcentaje de inhibición sobre el *E. faecalis*, concluyendo el posible uso de la amoxicilina de manera independiente en el conducto para el tratamiento de infecciones persistentes perirradiculares.

**Palabras clave:** Antibióticos, bacteria resistente, eficacia antimicrobiana, enfermedades perirradiculares, infección endodóntica persistente.

**Introduction:** It has been shown that microorganisms are the main responsible for pulp and periradicular diseases. The bacterium *Enterococcus faecalis*, found most prevalent in persistent endodontic infections, is resistant to antibacterial drugs such as calcium hydroxide and multipurpose pastes. The increase in possible cases of refractory apical periodontitis due to said resistance has led to the search for alternatives. Among them, it has been documented that broad-spectrum antibiotics, alone or in combination, could be a solution to this problem. **Objective:** Through an in vitro study, to evaluate the minimum inhibitory concentration of various broad spectrum antimicrobial agents such as amoxicillin, metronidazole and ciprofloxacin, alone and in combination, on *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Materials and methods:** Commercial presentations of antibiotics and vancomycin were used as control. Micro-dilution techniques were used to evaluate the antimicrobial activity against the bacterial strain of *E. faecalis* by performing two-way ANOVA statistical analyzes and TUKEY multiple comparisons with an uncertainty level of 0.05. **Results:** In this study, amoxicillin obtained the highest percentage of inhibition over *E. faecalis* when used in a low concentration of 60 µg / ml. There was a statistically significant difference with the other antibiotics. **Conclusions:** A directly proportional relationship was demonstrated between the increase in the concentration of each antibiotic and its effect on the percentage of inhibition on *E. faecalis*, concluding the possible use of amoxicillin independently in the duct for the treatment of persistent infections periradicular.

**Key words:** Antibiotics, resistant bacteria, antimicrobial efficacy, periradicular diseases, persistent endodontic infection.

## 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo más importante del tratamiento endodóntico es minimizar el número de microorganismos y los restos infecciosos en el sistema de conductos radiculares para prevenir o tratar la periodontitis apical. Este proceso de desinfección químico-mecánica o limpieza ha sido descrito como la parte más importante en la conformación en endodoncia descrita por Grossman (1) y Schilder (2). La desinfección químico-mecánica se obtiene por los materiales de irrigación y los medicamentos intraconducto, cuando estos últimos estén indicados utilizarlos.

Es importante tener en cuenta las variaciones anatómicas que pueden presentar los conductos radiculares y que ocasionan complicaciones durante el acceso, conformación, desinfección y selle tridimensional, siendo una de las principales causas del fracaso del tratamiento (3). Existe una asociación directa entre las anomalías del desarrollo y la pulpa y las enfermedades perirradiculares (4), resaltando la importancia del papel que juegan las técnicas y protocolos de irrigación y activación frente a la anatomía del sistema de conductos.

El uso del hipoclorito de sodio (NaOCl) y la clorhexidina (CHX) logran el objetivo de reducir las bacterias y eliminar la infección de los conductos radiculares. El hipoclorito de sodio (NaOCl), de 0.5% a 5.25% tiene una alta actividad antimicrobiana y la capacidad de disolver tejido orgánico, sin embargo, es tóxico para los tejidos vitales y perirradiculares

(5). El digluconato de clorhexidina (CHX), exhibe actividad antimicrobiana de amplio espectro y sustentividad a la dentina. No actúa en la disolución de tejido por lo que puede ser menos irritante. Se ha indicado que aumentar su concentración de 0,12% a 2% mejora su eficacia. Se ha demostrado que la CHX, como el último irrigante, reduce las bacterias adherentes cuando se ha usado inicialmente el NaOCl seguido de EDTA (6).

Se han descrito estrategias exitosas para maximizar la desinfección, incluyendo irrigación positiva/negativa y la activación con sistemas sónicos y ultrasónicos (7,8). La irrigación puede realizarse a través de sistemas manuales, irrigando por presión positiva realizada con una jeringa y una aguja endodóntica y sistemas mecánicos que incluyen los métodos sónicos y ultrasónicos (9), así como sistemas modernos como la irrigación apical de presión negativa EndoVac, que fuerza al irrigante hacia la parte apical del conducto proporcionándole una mejor limpieza (7).

Para los casos de infecciones persistentes y de alta contaminación se han utilizado diferentes medicamentos intraconducto entre citas, el que mayor uso ha reportado es el hidróxido de calcio  $\text{Ca(OH)}_2$  (Frank A) (10).

Hoshino y Sato (11,12) han reportado el uso de una pasta antibiótica para la desinfección de los conductos radiculares de los dientes deciduos, esta pasta está compuesta por ciprofloxacina, minociclina y metronidazol, conformando la Pasta Triple Antibiótica (TPA siglas en inglés) que al combinarlos y aplicarlos tópicamente en el conducto podría tener un gran potencial antimicrobiano. Esta mezcla es efectiva contra los patógenos encontrados en las capas profundas de dentina, demostrado no en una medición en micras sino por la

eliminación de microorganismos en la pulpa dental de dientes deciduos cariados (11). La TPA presenta actividad bacteriostática (minociclina) y bactericida (metronidazol y ciprofloxacina) pero como efecto secundario los dientes sufren una pigmentación por la minociclina, la cual es derivada de la tetraciclina. Se pueden definir estrategias para evitar la pigmentación sin perder la capacidad de desinfección de dicha pasta, para esto es necesario hacer una búsqueda de otro antibiótico que reemplace la minociclina y mantenga o mejore su capacidad de desinfección (12). Se inicia un proceso para reemplazar la minociclina por la amoxicilina, la cual es una de las alternativas propuestas por Hoshino (11) y Sato (12).

Son necesarios estudios de laboratorio para evaluar el uso potencial de un medicamento que no sea tóxico, que el vehículo para su aplicación no altere las propiedades de los tejidos como por ejemplo el color, las propiedades mecánicas de la dentina y que tenga durabilidad para cumplir su objetivo (13).

El objetivo de este estudio es evaluar la concentración inhibitoria mínima de varios agentes antimicrobianos de amplio espectro como la amoxicilina, el metronidazol y la ciprofloxacina, solos y en combinación, sobre el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

**Hipótesis nula:** diferentes concentraciones de amoxicilina, metronidazol y ciprofloxacina, solos o en combinación, logran el mismo efecto en la disminución de la concentración inhibitoria mínima del *Enterococcus faecalis*.

## 2. MARCO TEÓRICO

En la enfermedad pulpar y periapical se encuentran una gran variedad de microorganismos. Aproximadamente 100 especies son detectadas en tratamientos endodónticos realizados, siendo la mayoría de estas bacterias Gram positivas (18).

Las bacterias que componen la flora normal de la cavidad oral, en su mayoría, están implicadas en la infección e inflamación de la pulpa y la posterior necrosis de ésta; por lo tanto, se denominan patógenos primarios. Las bacterias Gram negativas son los microorganismos más frecuentes en la infección endodóntica primaria y se encuentran en casi todas las infecciones asociadas a periodontitis apical, incluso en abscesos. Entre éstas se destacan *Dialister*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Tannerella*.

Bacterias Gram positivas pueden encontrarse también en porcentajes elevados. Entre las más destacadas están *Pseudoramibacter*, *Filifactor*, *Micromonas*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Olsenella* y *Propionibacterium*. Otros microorganismos solo causan la enfermedad cuando las defensas del huésped están deterioradas y se denominan patógenos oportunistas (18).

Las bacterias dentro de los túbulos dentinarios pueden constituir un reservorio importante en el cual puede ocurrir infección o reinfección del conducto radicular durante el tratamiento endodóntico, pues se ha demostrado que un diente previamente tratado tiene nueve veces más probabilidades de contener *E. faecalis* (18) (19). Por eso es importante tener en cuenta las variaciones anatómicas que se pueden presentar en los conductos radiculares para prevenir cuáles serán las complicaciones, riesgos y fracasos. Están

presentes los conductos laterales (derivado del conducto principal en el tercio medio), deltas apicales (del conducto principal en el tercio apical), anastomosis entre los conductos (uniones entre los conductos principales), conductos en C (fusión de los conductos o presencia de un conducto distal extenso), entre otros (20).

En el conducto radicular se pueden presentar diferentes enfermedades que alteran la vitalidad pulpar; una de las primeras y más común es la pulpitis, la cual es una inflamación provocada por estímulos nocivos (agentes bacterianos, trauma, iatrogenia, entre otros) y puede ser reversible (revierte rápidamente después de la irritación) o irreversible (no puede curarse), sintomática o asintomática. La necrosis pulpar (muerte de la pulpa) genera una vascularización inexistente y los nervios pulpares no son funcionales. Debido a una exacerbación de las enfermedades mencionadas, se puede generar una inflamación en el periodonto que cuando se localiza en los tejidos periapicales se denomina periodontitis perirradicular o apical que a su vez se divide en sintomática y asintomática (20).

El objetivo de la terapia endodóntica es eliminar las bacterias del conducto radicular, con el fin de proveer un ambiente para la reparación y cicatrización tisular. Éstos microorganismos son difíciles de eliminar por su alta resistencia a los agentes antibacterianos, siendo las bacterias Gram positivas los más resistentes. Entre éstas se encuentra el *E. faecalis*, que tiene la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales más adversas en los conductos radiculares instrumentados y medicados. Por esta razón se hace necesario el uso de medicamentos intraconducto que permiten reducir la capacidad de daño de estas bacterias (20,21).

Estudios previos han evaluado la combinación de diferentes medicamentos para contrarrestar las infecciones del tejido pulpar y periapical. Hoshino y col realizaron un estudio in vitro para probar la eficacia antibacterial de medicamentos como minociclina, metronidazol y ciprofloxacina solos y en combinación, los cuales al aplicarlos individualmente no mostraron una completa eliminación de las bacterias, sin embargo, combinados se potencializaron y mostraron mejores resultados frente al *E. faecalis* (11).

El metronidazol es un derivado nitroimidazólico que exhibe un amplio espectro contra protozoos y bacterias anaerobias. Tiene una fuerte actividad antibacteriana frente a los cocos anaeróbicos, así como contra bacilos Gram negativos y Gram positivos. El metronidazol permea fácilmente las membranas celulares bacterianas y se une al ADN, interrumpiendo su estructura helicoidal lo cual conduce a la muerte celular (inhibe la síntesis de ácidos nucleicos) (22).

La minociclina es una tetraciclina con amplio espectro contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, contra espiroquetas y bacterias anaerobias y facultativas (que pueden vivir en ambiente con oxígeno y sin oxígeno). Las tetraciclinas son bacteriostáticas y actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Su desventaja es que causa pigmentación dental (23).

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano del grupo de las fluoroquinolonas. Su mecanismo de acción es bactericida, alterando el ADN bacteriano. Es activo frente a un amplio espectro de bacterias Gram negativos aerobios y Gram positivos. No es activo frente a bacterias anaerobios (24).

La acción de algunos agentes físicos o químicos sobre las bacterias pueden generar dos posibilidades: la primera es la acción bactericida, con la capacidad de eliminar un grupo de microorganismos en general que depende de factores como el tamaño y composición de la población bacteriana, PH, concentración, tiempo de exposición al agente, temperatura e incluso presencia de materia orgánica en el mismo medio en el que se encuentran los microorganismos que se van a eliminar. Por otro lado la bacteriostática, que se utiliza para reducir o detener el metabolismo bacteriano, inhibiendo el crecimiento de bacterias que permanecen vivas para dar tiempo a que el organismo reaccione desarrollando sus propios mecanismos de defensa para destruir los microorganismos nocivos invasores (24).

Una característica ampliamente reconocida de los antibióticos es que son bacteriostáticos e inhiben el crecimiento sin matar las células o son bactericidas y provocan la muerte celular. Por lo tanto, si los fármacos bactericidas son más potentes con células que crecen activamente, la inhibición del crecimiento inducida por un fármaco bacteriostático debería reducir la eficacia del fármaco (25).

Estos antibióticos mencionados anteriormente combinados forman una pasta utilizada con frecuencia de forma empírica en los tratamientos endodónticos y su formulación ha sido descrita en diferentes artículos mostrando su forma de preparación, la cual consiste en triturar las tabletas de metronidazol, ciprofloxacina y adicionar el polvo de la capsula de minociclina y mezclarlos con agua estéril o solución salina hasta obtener la consistencia deseada (24). Una problemática evidente de dicha pasta es la pigmentación dental, por lo que para prevenir esto se ha propuesto reemplazar la minociclina por amoxicilina observando a su vez un mejor resultado al sustituirla (12).

### 3. OBJETIVOS

#### General

Mediante un estudio In vitro, evaluar la concentración inhibitoria mínima de varios agentes antimicrobianos de amplio espectro como la amoxicilina, el metronidazol y la ciprofloxacina solos y en combinación sobre el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

#### Específicos

- Seleccionar la combinación ideal de principios activos para la evaluación In vitro de la concentración inhibitoria mínima.
- Determinar las dosificaciones cuantitativas ideales para la evaluación In vitro de la concentración inhibitoria mínima.
- Evaluar In vitro la concentración inhibitoria mínima de los agentes antimicrobianos seleccionados como amoxicilina, metronidazol y ciprofloxacina solos o en combinación frente a la cepa bacteriana de tipo planctónica *Enterococcus faecalis*.

### 4. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio experimental in vitro.

#### Materiales y métodos

##### Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa de la bacteria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, se adquirió a través de la empresa Microbiologics® (Minnessota, Estados Unidos) a través del instituto colombiano de medicina tropical – Universidad CES. El cultivo liofilizado fue resuspendido en caldo infusión cerebro corazón (BHI). Posteriormente fue usado para inocular tubos adicionales

con el mismo caldo y cajas con agar tripticasa de soya (TSI). Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Al finalizar la incubación, se tomaron alícuotas a las que se añadió glicerol al 15% y se almacenaron a -80°C. Los cultivos en cajas de Petri fueron almacenados a 4°C para posterior uso.

### **Curva de crecimiento en microplatos**

Con el fin de conocer el comportamiento de las bacterias cultivadas en suspensión a nivel de microplatos, se realizó el seguimiento del crecimiento durante 24 horas de cultivo, con 8 réplicas. Para este fin, se dispensó 100 µl del inóculo y 100 µl de caldo Mueller-Hillton en cada pozo. Los microplatos fueron incubados a 37±1°C. Para cada medición, los platos fueron agitados y se realizó la medición del crecimiento bacteriano a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 625 nm en un espectrofotómetro para platos: Sinergy™ (Modelo HTX, empresa BioTek, Vermont, Estados Unidos).

### **Determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento**

El inóculo se preparó haciendo una suspensión directa en caldo Mueller-Hinton, de una colonia aislada de uno de los cultivos en agar y se incubó durante 24 horas en agitación a 150 RPM y 37°C en un agitador orbital con incubación marca Brand ® (Alemania).

La suspensión se ajustó a una absorbancia de 0.08 para lograr una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, esto equivale a una suspensión que contiene 1 to  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Finalmente, el inóculo debe quedar en el plato en una absorbancia de 0.04.

El cálculo de la actividad antimicrobiana se determinó mediante la obtención del porcentaje de inhibición del crecimiento para cada concentración del extracto proteico, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del extracto}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

Las gráficas de inhibición se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 6.0, (GraphPad Software, San Diego California, Estados Unidos) realizando una regresión no lineal entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración.

#### **Preparación de las soluciones stock y soluciones de trabajo de los antibióticos**

Los antibióticos amoxicilina, ciprofloxacina y metronidazol fueron seleccionados como candidatos a evaluar debido a que son medicamentos de amplio espectro y han sido estudiados en infecciones persistentes del conducto radicular (excepto la amoxicilina, que en este caso se eligió para sustituir la minociclina por su pigmentación). La vancomicina, antibiótico de uso restringido, se seleccionó como un control positivo para la comparación del porcentaje de inhibición sobre la bacteria *E. faecalis*.

Para seleccionar el rango de concentraciones a evaluar, se siguieron los parámetros de resistencia y susceptibilidad para cada uno de los antibióticos reportados en el suplemento M100- S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (26,27). Sin embargo, con la intención de realizar la evaluación lo más cercanamente posible al ensayo clínico, se

utilizaron versiones comerciales orales de cada uno de ellos, excepto para la vancomicina que se aplica de forma intravenosa.

Teniendo en cuenta que los medicamentos orales contienen en promedio un 37.5% de excipientes, la concentración sugerida en el protocolo se aumentó 10 veces, con el fin de obtener una posible mayor resolución del efecto del principio activo y subestimar el efecto de los antibióticos.

Se prepararon soluciones madre de 80000  $\mu\text{g/ml}$  en solución salina y Dimetilsulfóxido (DMSO) por separado, a partir de las cuales se prepararon soluciones de trabajo de 8000, 6000, 4000, 2000, 1000, 500, 800, 250 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Todas las soluciones fueron preparadas volumétricamente y alicuotadas en viales de cromatografía, protegidos de la luz, cuidadosamente cerrados y almacenados  $-4^{\circ}\text{C}$ . Las concentraciones evaluadas para todos los antibióticos en  $\mu\text{g/ml}$  fueron: 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.

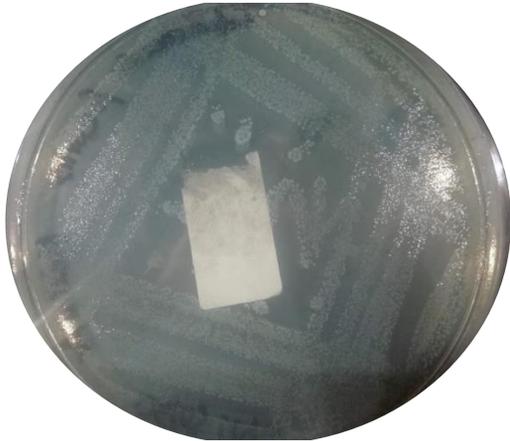
## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Las gráficas de inhibición se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 6.0, realizando una regresión no lineal entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración.

Se realizaron ANOVAS de dos vías y comparaciones múltiples de TUKEY para cada ensayo.

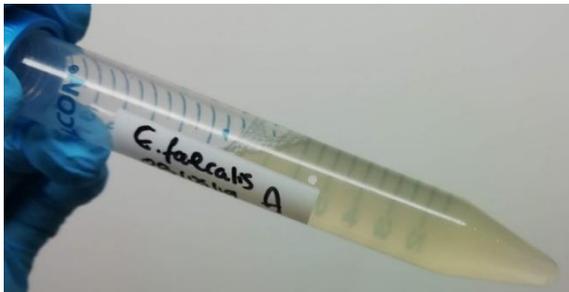
## 6. RESULTADOS

### Condiciones de cultivo



**Figura 1. Cultivo de *E. faecalis* en Agar TSA.**

Se obtuvieron colonias fácilmente visibles, cremosas de color blanco, tamaño pequeño y que al evaluarse en el microscopio se observaron series de cocos ubicados en diadas.

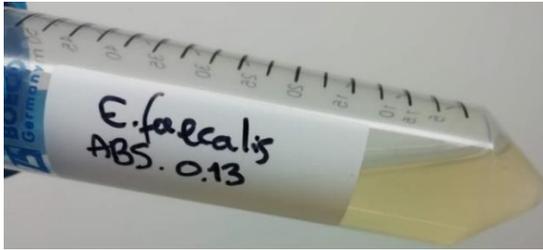


**Figura 2. Preinóculo de *E. faecalis* en Caldo Mueller Hinton. Absorbancia 0.224 a 625 nm.**

El cultivo realizado inicialmente en caldo BHI obtuvo un crecimiento más rápido que en el Mueller Hinton, sin embargo, la absorbancia fue suficiente al pasar las 48 horas para realizar la medición de la inhibición del crecimiento.

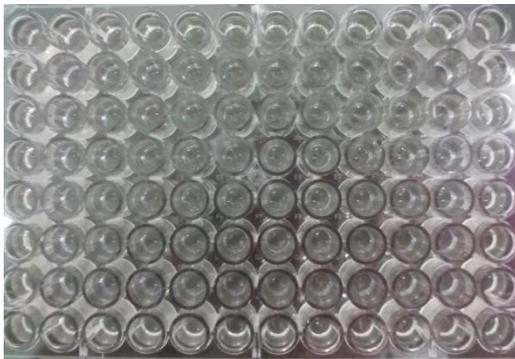
### **Determinación de la concentración inhibitoria mínima**

Se obtuvo una cantidad de 20 mL de inóculo a una densidad óptica de 0.08 a 625nm, suficiente para un microplato de 96 pozos.



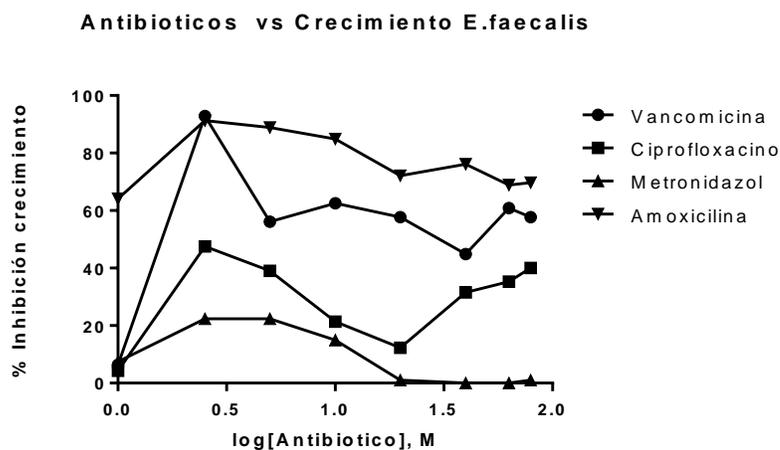
**Figura 3. Inóculo de *E. faecalis* en Caldo Mueller Hinton. Absorbancia 0.08 a 625 nm.**

La evaluación se realizó considerando 2 microlitros de cada concentración de antibióticos, el solvente usado no presentó inhibición del crecimiento de la bacteria, por lo cual los resultados del porcentaje de inhibición corresponden al extracto únicamente.



**Figura 4. Evaluación general de la inhibición del crecimiento en microplatos.**

#### **EVALUACIÓN ANTIBIÓTICOS EN SOLUCIÓN SALINA**



**Figura 5. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de *E. faecalis* bajo diferentes concentraciones de antibióticos en NaCl 0.9%**

Pudo determinarse que el antibiótico con menor actividad fue el metronidazol, el cual alcanzó un valor máximo de inhibición del 20% (**figura 5**) y una dosis efectiva 50 de 12.67  $\mu\text{g/ml}$  (**tabla 1**). Esto pudo ser ocasionado por el hecho de que el antibiótico fue insoluble en su mayor parte en la solución salina estéril, lo que llevó a una retención del sólido en la membrana de esterilización. Por esta razón, se realizarán nuevas evaluaciones en este mismo estudio utilizando otras casas comerciales de los antibióticos y otro disolvente como DMSO, para asegurar que la falta de actividad no se deba a su falta de solubilidad.

En cuanto a la solubilidad de los demás antibióticos, se encontró que la ciprofloxacina y la amoxicilina se disolvieron en mayor cantidad que el metromnidazol, sin embargo permancia un precipitado que fue retenido igualmente durante la esterilización por membrana, esto puede llevar a que posiblemente los resultados sean falsos negativos. El antibiótico vancomicina fue completamente soluble en solución salina estéril.

En cuanto al antibiótico más activo, se encontraron los porcentajes de inhibición más superiores con la Amoxicilina, llegando hasta un 80% de inhibición. Estos resultados fueron más altos que los determinados para la vancomicina que obtuvo un porcentaje de inhibición del 80 % con concentración baja, lo cual puede sugerir una tolerancia por parte de esta bacteria a este antibiótico de uso intrahospitalario, sin embargo es necesario aumentar el número de réplicas para contar con certeza estos resultados.

En general, para todos los antibióticos y con un  $\alpha$  de 0,05, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones evaluadas para ninguno de los antibióticos, lo cual pudo ocurrir debido a que se estaba subestimando la concentración de los antimicrobianos anteriormente, paso que debe evaluarse antes de entrar a aumentar las concentraciones.

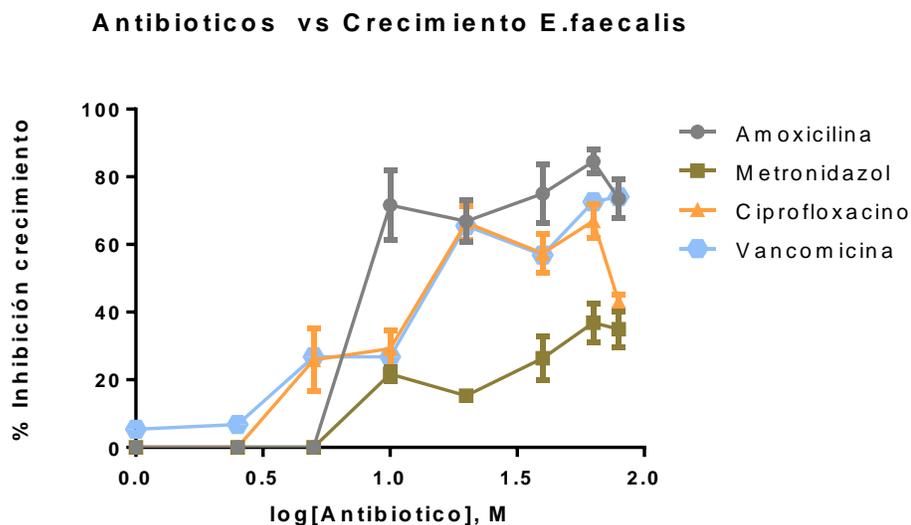
Se determinó la dosis efectiva 50 de cada antibiótico, la cual considera la concentración necesaria de un fármaco para inhibir el crecimiento del 50% de una población de microorganismos. Estos valores fueron representados en la **tabla 1**, en donde se observa que la menor dosis para la inhibición de *E. faecalis* bajo las condiciones de este experimento, corresponde a la ciprofloxacina y la vancomicina. La mayoría de resultados tuvieron desviaciones considerables que indican la necesidad de repetir el experimento más acertadamente.

**Tabla 1. Dosis EC 50 antibióticos en NaCl 0.9%**

<b>DOSIS EC 50 (mg/L)</b>			
<b>Amoxicilina</b>	<b>Metronidazol</b>	<b>Vancomicina</b>	<b>Ciproloxacina</b>
11,8± 2,4	12,67 ±6,6	0,62 ± 0,0	0,59 ± 3,3

Valor  $\alpha$  0,05

## EVALUACIÓN ANTIBIÓTICOS EN DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)



**Figura 6. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de *E. faecalis* bajo diferentes concentraciones de los antibióticos en DMSO**

En esta evaluación pudo observarse, a diferencia de la anterior (solución salina), una relación proporcional de la actividad inhibitoria con la concentración de cada antibiótico. Esto se pudo comprobar en el análisis de varianza realizado en donde se encontró que a medida que incrementa la concentración hay una diferencia en la respuesta (**tabla 2**), contrario a lo que se observó anteriormente con las diluciones en solución salina, en donde no había diferencia entre las concentraciones.

Se determinó que la amoxicilina junto con la vancomicina mostró nuevamente superioridad en cuanto al porcentaje de inhibición, tal como puede evidenciarse en la **figura 6**. La amoxicilina fue el antibiótico con mayor porcentaje de inhibición, con un valor

del 84% a una concentración de 60  $\mu\text{g/ml}$ . Además, estos resultados se pueden verificar con la prueba de comparaciones múltiples (**tabla 3**) en donde se encontró que no hay una diferencia significativa entre el efecto de la vancomicina (antibiótico de control) y la amoxicilina, ubicándolas en un grupo superior al metronidazol y ciprofloxacina, los cuales tampoco presentaron diferencia entre ellos, más si respecto a la vancomicina y amoxicilina.

**Tabla 2. ANOVA de dos vías, interacción, concentración y antibiótico**

2way ANOVA	A	B	C	D	E
Tabular results	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	Log-dose vs response				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	15.09	<0.0001	****	Yes	

Row Factor	54.53	<0.0001	****	Yes	
Column Factor	16.14	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	10620	21	505.7	F (21,48) = 20.90	P < 0.000
Row Factor	38371	7	5482	F (7,48) = 226.5	P < 0.000
Column Factor	11355	3	3785	F (3,48) =156.4	P < 0.000
Residual	1161	48	24.20		

Number of missing  
values 16

***Tabla 3. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples***

Tukey's multiple comparisons test	Mean	95% CI of diff.	Significant	Summary
	Diff.		?	
Amoxicilina vs. Metronidazol	29.58	25.80 to 33.35	Yes	****

Amoxicilina vs. Ciprofloxacino	10.36	6.583 to 14.14	Yes	****
Amoxicilina vs. Vancomicina	4.604	-0.7404 to 9.949	No	ns
Metronidazol vs. Ciprofloxacino	-19.21	-22.29 to -15.43	Yes	****
Metronidazol vs. Vancomicina	-24.97	-30.32 to -19.63	Yes	****
Ciprofloxacino vs. Vancomicina	-5.758	-11.10 to - 0.4137	Yes	*

Es interesante observar que el porcentaje de inhibición disminuyó ligeramente en el último punto evaluado de la actividad inhibitoria (**figura 6**), es decir a las 80  $\mu\text{g/ml}$  para todos los antibióticos, excepto vancomicina, indicando que posiblemente la concentración máxima inhibitoria está alrededor de los 60  $\mu\text{g/ml}$ , por lo cual no sería recomendable aumentarla para obtener un mayor efecto, sino más bien realizar pruebas de actividad inhibitoria mezclando las moléculas para ver si es posible potenciar su acción.

Finalmente, se determinó la dosis efectiva 50 de cada antibiótico, cuyos valores fueron representados en la **tabla 4**. Se observa que la menor dosis para la inhibición de *E. faecalis* bajo las condiciones de este experimento, corresponde a la ciprofloxacina, amoxicilina y vancomicina, a diferencia del experimento anterior, puesto que en este caso, tanto la amoxicilina como la ciprofloxacina tuvieron EC50s menores a la vancomicina. Estos resultados pueden indicar que dentro de la práctica del uso de la pasta tripleantibiótica es posible que la amoxicilina sea el antibiótico más efectivo para el control de *E. faecalis*, sin

embargo se recomienda evaluar la mezcla con uno de los otros antibióticos para verificar si es posible potenciar su acción o por el contrario cambiar de antibiótico para alcanzar el 100% de inhibición de la bacteria.

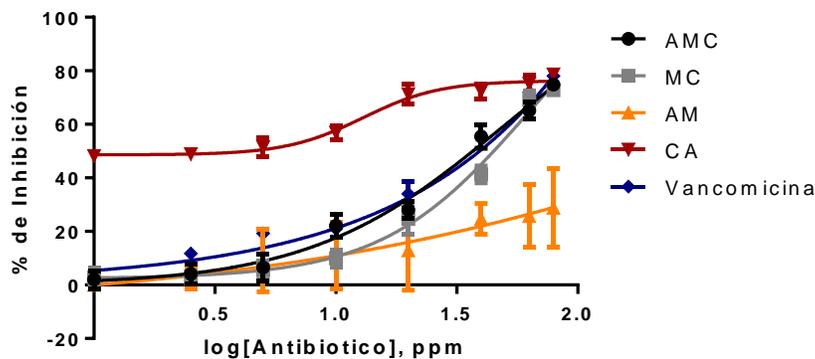
**Tabla 4. Dosis EC 50 antibióticos en DMSO**

<b>DOSIS EC 50 (mg/L)</b>			
<b>Amoxicilina</b>	<b>Metronidazol</b>	<b>Ciproloxacin a</b>	<b>Vancomicina</b>
8,3± 1,4	29,5 ±0,67	6,9 ± 0,09	11,1± 0,18
<i>Valor <math>\alpha</math> 0,05</i>			

### **EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE ANTIBIÓTICOS**

Se realizaron mezclas de los antibióticos previamente evaluados usando las silgas de sus iniciales así: AMC correspondiente a la mezcla amoxicilina – metronidazol – ciprofloxacina, MC metronidazol – ciprofloxacina, AM amoxicilina – metronidazol y por último CA ciprofloxacina – amoxicilina, utilizando la curva de concentraciones evaluadas inicialmente en  $\mu\text{g/ml}$  80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1. Los agentes fueron diluidos en DMSO y se utilizó vancomicina nuevamente como control de inhibición.

### Mezcla antibioticos vs Crecimiento *E. faecalis*



**Figura 7. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de *E. faecalis* bajo diferentes concentraciones y mezclas de antibióticos.**

En la **figura 7**, se observa que el porcentaje de inhibición de la mezcla CA logró un 48% con la menor concentración utilizada, en comparación con las demás mezclas, las cuales fueron menos efectivas al usar menores concentraciones. El mayor porcentaje de inhibición para CA 78,6%, ninguna de las demás mezclas superó éste valor de inhibición, incluso utilizando mayores concentraciones, lo cual también ocurrió para el antibiótico control.

Casi todas las mezclas obtuvieron valores máximos de inhibición cercanos al antibiótico de control, excepto la mezcla AM, cuyo porcentaje de inhibición máximo fue 29%.

A partir del análisis de varianza de dos vías (**tabla 5**), se determinó una diferencia estadísticamente significativa entre las mezclas de antibióticos y entre las concentraciones evaluadas; así mismo se determinó que existe una interacción significativa entre estos factores.

**Tabla 5. ANOVA dos vías, interacción mezclas y concentración de antibióticos**

---

2way ANOVA	A	B	C	D	E
Tabular results	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	Log-dose vs response				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	10.02	<0.0001	****	Yes	
Row Factor	49.66	<0.0001	****	Yes	
Column Factor	36.34	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value

---

Interaction	11007	28	393.1	F (28,104) = 11.49	P < 0.0001
Row Factor	54582	7	7797	F (7,104) = 227.9	P < 0.0001
Column Factor	39941	4	9985	F (4,104) = 291.9	P < 0.0001
Residual	3558	104	34.21		

Number of missing

values 16

Para analizar a mayor profundidad la interacción encontrada, se realizó un análisis de comparaciones múltiples con la prueba de Tukey, a partir de la cual se determinaron algunos grupos que no presentaron una diferencia significativa entre ellos, indicando un efecto similar en el porcentaje de inhibición obtenido, estos grupos corresponden a las mezclas AMC y MC, y MC con vancomicina.

La mezcla AM pudo determinarse con la prueba Tukey como un grupo independiente, con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás, lo cual se observa en la **figura 7** obteniendo el menor porcentaje de inhibición.

También, la mezcla CA se determinó como un grupo independiente, presentando una diferencia estadísticamente significativa entre ella y todas las demás, mostrando los mayores porcentajes de inhibición incluso superiores al antibiótico de control y a la mezcla de los tres AMC (**tabla 6**).

**Tabla 6. Prueba de Tukey, comparaciones múltiples mezclas de antibióticos**

2way ANOVA	A	B	C	D	E
Multiple comparisons	Data Set-A	Data Set- B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set- E
Compare column means (main column effect)					
Number of families	1				
Number of comparisons per family	10				
Alpha	0.05				

---

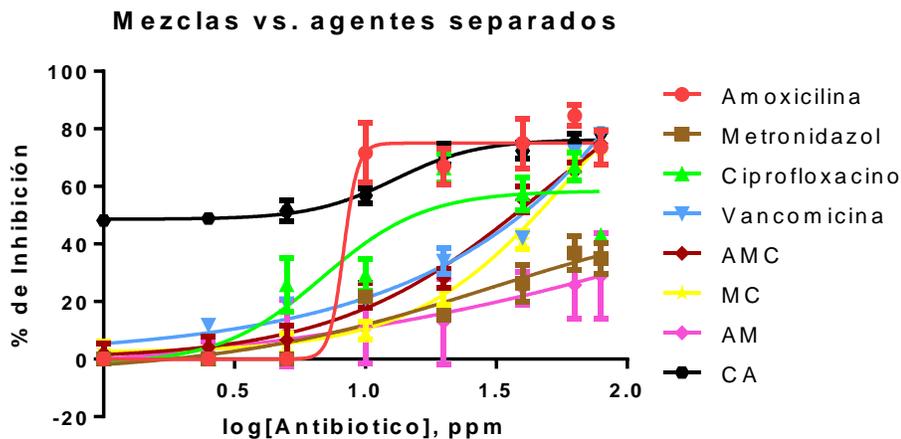
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
AMC vs. MC	3.616	- 0.4438 to 7.675	No	ns
MC vs. AM	17.96	13.90 to 22.02	Yes	****
AMC vs. CA	-30.54	-34.60 to 26.48	Yes	****
AMC vs. Vancomicina	-2.494	-7.466 to 2.478	No	ns
MC vs. AM	14.34	10.28 to 18.40	Yes	****
MC vs. CA	-34.16	-38.22 to -30.10	Yes	****

---

MC vs. Vancomicina	-6.109	-11.08	Yes	**
		to -1.138		
AM vs. CA	-48.50	-52.56	Yes	****
		to -44.44		
AM vs. Vancomicina	-20.45	-25.42	Yes	****
		to -15.48		
CA vs. Vancomicina	28.05	23.08	Yes	****
		to 33.02		

## COMPARACIONES TOTALES

Se realizó la comparación de la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *E. faecalis* de las mezclas de antibióticos y los antibióticos utilizados como agentes independientes. Se conservó las concentraciones y el control de inhibición con el antibiótico vancomicina.



**Figura 8. Porcentaje de Inhibición de crecimiento de *E. faecalis* bajo diferentes concentraciones de mezclas y antibióticos.**

Se determinó que dentro del grupo de agentes con los mayores porcentajes de inhibición, se encuentran la amoxicilina con un 84 % a las 60  $\mu\text{g/ml}$ , la mezcla CA con un 78,6 % a las 80  $\mu\text{g/ml}$ , la vancomicina con un 78% a 80  $\mu\text{g/ml}$  y finalmente la mezcla AMC con un valor de 74,9 % a 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Dentro de las muestras menos efectivas se determinó el metronidazol, cuyo porcentaje máximo de inhibición fue del 37 %, seguido por la mezcla AM con la que se obtuvo un 29% de inhibición. Las mezclas que contenían ciprofloxacina con metronidazol, alcanzaron mayores porcentajes de inhibición que con la mezcla AM o el metronidazol y ciprofloxacina solos.

Si bien la ciprofloxacina en mezcla con la amoxicilina presentó un incremento en el porcentaje de inhibición, respecto a la ciprofloxacina sola, esta no alcanzó el nivel que logró la amoxicilina utilizada separadamente.

Para analizar en más detalle estos resultados, se realizó un análisis de varianza de dos vías (**tabla 7**), determinando una diferencia estadísticamente significativa entre las mezclas de antibióticos, los antibióticos usados independientemente y las concentraciones evaluadas. De igual manera se determinó que existe una interacción significativa entre estos factores evaluados.

***Tabla 7. ANOVA dos vías, interacción mezclas, antibióticos y concentraciones***

---

2way ANOVA	A	B	C	D	E
Tabular results	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	Log-dose vs response				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	16.00	<0.0001	****	Yes	
Row Factor	51.90	<0.0001	****	Yes	
Column Factor	29.21	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value

---

Interaction	27854	49	568.4	F (49,152) = 18.31	P < 0.0001
Row Factor	90322	7	12903	F (7,152) = 415.6	P < 0.0001
Column Factor	50846	7	7264	F (7,152) = 234.0	P < 0.0001
Residual	4719	152	31.05		

Number of missing

values 40

La diferencia encontrada entre las concentraciones se observa en la **figura 8**, en donde se puede apreciar el comportamiento exponencial de cada una de las mezclas de acuerdo al aumento de concentración, excepto como se mencionó anteriormente para la mezcla CA. Sin embargo, debido a que la diferencia estadísticamente significativa encontrada entre las mezclas, los antibióticos y las concentraciones no es fácil de observar gráficamente, se procedió a realizar un análisis a mayor profundidad realizando comparaciones múltiples.

***Tabla 8. Prueba de Tukey, comparaciones múltiples mezclas de antibióticos***

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant ?	Summar y
Amoxicilina vs. Metronidazol	29.58	24.63 to 34.52	Yes	****
Amoxicilina vs. Ciprofloxacina	10.36	5.419 to 15.31	Yes	****
Amoxicilina vs. Vancomicina	11.68	6.152 to 17.21	Yes	****
Amoxicilina vs. AMC	14.17	9.548 to 18.80	Yes	****
Amoxicilina vs. MC	17.79	13.16 to 22.41	Yes	****
Amoxicilina vs. AM	32.13	27.50 to 36.75	Yes	****
Amoxicilina vs. CA	-16.37	-20.99 to -11.74	Yes	****
Metronidazol vs. Ciprofloxacina	-19.21	-24.16 to -14.27	Yes	****
Metronidazol vs. Vancomicina	-17.90	-23.42 to -12.37	Yes	****

---

Metronidazol vs. AMC	-15.40	-20.03 to -10.78	Yes	****
Metronidazol vs. MC	-11.79	-16.41 to -7.162	Yes	****
Metronidazol vs. AM	2.554	-2.070 to 7.179	No	ns
Metronidazol vs. CA	-45.94	-50.57 to -41.32	Yes	****
Ciprofloxacina vs. Vancomicina	1.317	-4.211 to 6.844	No	ns
Ciprofloxacina vs. AMC	3.810	-0.8142 to 8.435	No	ns
Ciprofloxacina vs. MC	7.426	2.801 to 12.05	Yes	****
Ciprofloxacina vs. AM	21.77	17.14 to 26.39	Yes	****
Ciprofloxacina vs. CA	-26.73	-31.35 to -22.11	Yes	****
Vancomicina vs. AMC	2.494	-2.750 to 7.738	No	ns
Vancomicina vs. MC	6.109	0.8655 to 11.35	Yes	*
Vancomicina vs. AM	20.45	15.21 to 25.69	Yes	****
Vancomicina vs. CA	-28.05	-33.29 to -22.80	Yes	****
AMC vs. MC	3.616	-0.6660 to 7.897	No	ns

---

AMC vs. AM	17.96	13.67 to 22.24	Yes	****
AMC vs. CA	-30.54	-34.82 to -26.26	Yes	****
MC vs. AM	14.34	10.06 to 18.62	Yes	****
MC vs. CA	-34.16	-38.44 to -29.87	Yes	****
AM vs. CA	-48.50	-52.78 to -44.22	Yes	****

Se determinó al comparar todos los agentes y mezclas, que se formaron algunos grupos que no presentaron una diferencia significativa entre ellos, con un valor  $p \geq 0,05$ . Es decir, que presentaron un efecto similar en el porcentaje de inhibición obtenido. Estos grupos corresponden al metronidazol - AM, cuyas actividades fueron las más bajas, la ciprofloxacina y vancomicina, la ciprofloxacina - AMC, AMC - vancomicina y las mezclas AMC - MC.

Para resaltar es importante tener en cuenta que todas las comparaciones realizadas con la amoxicilina arrojaron diferencias estadísticamente significativas con un valor  $p \leq 0,0001$ , lo cual la ubica en un grupo independiente y se confirma con los resultados gráficos de la regresión no lineal (**figura 8**).

De igual manera la mezcla CA se determinó como un grupo independiente, presentando una diferencia estadísticamente significativa entre ella y todas las demás, debido a que como se mencionó anteriormente obtuvo el segundo porcentaje de inhibición luego de la amoxicilina. Sin embargo, como se puede apreciar en la **tabla 8**, se determinó una diferencia estadísticamente significativa con un valor  $p \leq 0,0001$  entre ambos tratamientos,

lo cual dejó en primer lugar a la amoxicilina como el agente con el que se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición sobre *E. faecalis* en este estudio.

## 7. DISCUSIÓN

Las infecciones endodónticas persistentes se han reportado en su gran mayoría por la presencia del *Enterococcus faecalis* adherido a la dentina en el sistema de conductos radiculares (14). Es el patógeno endodóntico dominante resistente a los agentes antibacterianos, razón por la cual se utilizó como microorganismo objetivo en este estudio.

Numerosos artículos revelan que la pasta triple antibiótica, conformada por metronidazol, ciprofloxacina y minociclina, ha demostrado ser eficaz en la eliminación de dichas bacterias y ha reportado ser una buena alternativa como medicamento intraconducto complementando las técnicas de desinfección en el tratamiento de endodoncia (11,12,16,17,28–31).

Se desconoce la concentración óptima para el uso de antibióticos tópicos, por lo que con este estudio se sugirió determinar *In vitro* las concentraciones inhibitorias mínimas expresada en  $\mu\text{g/ml}$  sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*. La cepa planctónica de referencia fue la ATCC 29212, limitación evidente en este estudio ya que idealmente se requiere analizar las bacterias en biopelículas y en el entorno radicular como lo sugieren los estudios de Sholeh Ghabraei y R. Rafatjou (32,33), pues al ser una colonia estructurada de células bacterianas incrustadas en una matriz polimérica y adheridas a la superficie representan un mayor reto a la hora de su erradicación completa.

Se ha reportado que la principal desventaja del uso de la minociclina es la pigmentación dental (34–37). Se han establecido diversas combinaciones de antibióticos para reemplazar

la minociclina o eliminarla mediante DAP usando solos dos antibióticos (ciprofloxacina y metronidazol) (12) en lugar de la clásica TAP (38). Entre las combinaciones se encuentran las reportadas con: **amoxicilina** (39–41), cefaclor (41,42), cefroxadina, fosfomicina (41) o rokitamicina (12,43) y con rifampicina (29).

Otras más actualizadas, han realizado combinaciones de ciprofloxacina, metronidazol y doxicilina (30), otra se realizó con Augmentina (que es amoxicilina con ácido clavulánico) y tigeciclina (16,44) y finalmente una realizada con clindamicina (33). Casamassimo y col. (2013) recomendaron reemplazar la minociclina con clindamicina, ya que tiene menos complicaciones e interacciones medicamentosas en comparación con la eritromicina y la amoxicilina. Tiene una vida media más larga (2.5 h para clindamicina, 30 min para amoxicilina y 1,5 h para la eritromicina) y es eficaz contra una amplia variedad de anaerobios Gram positivos y Gram negativos. También penetra en la mayoría de los tejidos y abscesos (45).

En este estudio, se eligió reemplazar la minociclina por la amoxicilina ya que es un antibiótico de uso común que ha demostrado resultados óptimos (12,33,39–41). Además, se encuentra dentro del grupo permitido por la norma farmacológica donde se siguieron los parámetros de resistencia y susceptibilidad para cada uno de los antibióticos reportados en el suplemento M100- S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (26) para su utilización y combinación con los demás antibióticos evaluados pero que usualmente es catalogado por ser un medicamento que genera resistencia al ser utilizado de manera libre y errónea. Otra de las razones es que no hay suficiente evidencia científica que apoye la combinación descrita en este estudio: metronidazol, ciprofloxacina y amoxicilina y que

sobretudo, sea realizada de manera In vitro para comenzar fases iniciales de estudio que al finalizar pueda darse su aplicación directa en dientes permanentes, como lo reporta este estudio (46), y no solo en deciduos.

Thompson en un estudio clínico utilizó la TAP y reemplazó la minociclina con amoxicilina con el objetivo de regenerar premolares deciduos infectados obteniendo un tipo de apexogénesis (46). En 2014, Akcay demostró una pigmentación significativamente menor en caso de usar amoxicilina en lugar de minociclina, doxiciclina o cefaclor (35), ya que estas últimas a menudo causan pigmentación severa, mientras que la amoxicilina no lo hace incluso después de tres semanas. Sin embargo, a los 12 meses, la amoxicilina también causó una leve pigmentación grisácea en los dientes (47). En otro estudio, Kahler et al. (39) indicó que a pesar del reemplazo de la minociclina con amoxicilina, 10 de los 16 dientes que se sometieron a un tratamiento regenerativo mostraron pigmentación coronal (12).

Un primer experimento en este estudio fue evaluando las concentraciones de los tres antibióticos (80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ ) diluidos en solución salina, pero se observaron desviaciones considerables que indicaron la necesidad de repetir el experimento con otro solvente. A partir de este primer ensayo se reportó que la amoxicilina obtuvo un alto porcentaje de inhibición (80%) y que el metronidazol fue el antibiótico con menor actividad con un valor máximo inhibido del 20%. Otros estudios (33) analizaron concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  para el metronidazol pero decidieron no analizarlo de manera independiente pues se había reportado en estudios anteriores (48,49) que al usarlo solo, incluso en concentraciones más altas, indicaba 100% de ineficacia para la eliminación de los microorganismos responsables de las infecciones dentales lo que indica

la necesidad de medicamentos adicionales para potenciar su efecto. Únicamente lo combinaron con ciprofloxacina donde se observó que concentraciones de 100 µg/ml de la mezcla de ambos inhibió completamente el crecimiento y la proliferación de bacterias aerobias, contrario a las anaerobias donde disminuyó el crecimiento y la proliferación pero no llegaron a cero (33).

Se ha informado que el ornidazol tiene una mayor duración de acción, mejor eficacia y un metabolismo más lento en comparación con el metronidazol (49).

Se realizaron nuevas evaluaciones en este estudio utilizando otras casas comerciales de los antibióticos y otro disolvente como el dimetilsulfóxido (DMSO) donde se observó que cuando aumentaba la concentración se daba una diferencia en la respuesta. Los antibióticos se disolvieron mejor permitiendo estar totalmente expuestos a la bacteria. La amoxicilina logró nuevamente porcentajes superiores de inhibición (84%).

Era necesario evaluar la amoxicilina (más efectivo hasta el momento en este estudio), con uno de los otros antibióticos para verificar si era posible potenciar su acción o requería el cambio de antibiótico para alcanzar el 100% de inhibición. Estudios reportan que ninguno de los componentes antibióticos de TAP podría eliminar individualmente todos los microorganismos responsables de las infecciones dentales (33) y aunque en este estudio tampoco lo logró la amoxicilina, si consiguió un alto porcentaje de inhibición aun en concentraciones mínimas evaluadas.

Posteriormente se realizó en nuestro estudio el experimento mezclando los antibióticos (diluidos en DMSO). En este punto del experimento, la mezcla CA obtuvo porcentajes

superiores de inhibición incluso mayores al antibiótico control y a la mezcla de los tres: AMC. La mezcla AM obtuvo los porcentajes inferiores. Otros estudios que apoyaron la mezcla de los antibióticos concluyen que al mezclarlos, parecen poseer una eficacia bactericida potencialmente mejor que otros materiales antibacterianos (29)(30). La utilización de las pastas DAP incluyen ciprofloxacina y metronidazol. Se ha reportado que al eliminar la minociclina se evita la pigmentación dental y además por su bajo peso molecular parece penetrar mejor en los túbulos dentinarios, así como lo reporta este estudio indicando que ciprofloxacina y metronidazol pueden unirse de manera más eficiente a la dentina en comparación con la minociclina (50).

Un último experimento en el estudio aquí reportado consistió en las comparaciones totales, donde se evaluó la interacción de las mezclas de los antibióticos y los antibióticos como agentes independientes, resultando nuevamente en que el metronidazol reporta las actividades más bajas y la amoxicilina las más altas, así como la mezcla con ciprofloxacina. En nuestro estudio, la mezcla CA obtuvo porcentajes superiores de inhibición, lo cual podría sugerir futuras mezclas que obtengan de igual forma bajo peso molecular para la mejor penetración a la dentina como por ejemplo amoxicilina con clindamicina, que como vimos anteriormente ha sido el mejor reemplazo para la minociclina (45) y se eliminaría el metronidazol que no obtuvo tan buenos resultados, ni solo ni al combinarlo.

Como desventajas y respecto a las comparaciones totales realizadas y debido a que ninguno de los tratamientos alcanzó una inhibición completa, se sugiere la evaluación de otros agentes antibióticos que posiblemente puedan incrementar la actividad inhibitoria, puesto que como se observó en el caso de la ciprofloxacina y el metronidazol algunas

mezclas pueden tener un efecto sinérgico en lo que se refiere al incremento en el porcentaje de inhibición sobre la bacteria.

También, se pretende abrir camino para la siguiente fase del estudio que va direccionada a la selección de materias primas farmacéuticas adecuadas para el desarrollo del vehículo de la formulación antibiótica para el conducto radicular, analizada en este estudio, sin alterar su efectividad frente al *Enterococcus faecalis* y así poder ir resolviendo la problemática inicial presentada, además de conseguir la facilidad del producto para su reproducción y aplicación clínica.

## **8. AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la Universidad CES y al CECIF y al apoyo de Diego Fernando Rojas Vahos Jefe de Programa Química Farmacéutica Facultad Ciencias y Biotecnología y a Mónica Andrea Arias Londoño Coordinadora de Investigación Dirección de Investigación e Innovación.

## **9. CONFLICTOS DE INTERESES**

Los autores no tienen conflictos de intereses.

## **10. CONCLUSIONES**

El antibiótico amoxicilina mostró el mayor porcentaje de inhibición sobre la bacteria *E. faecalis* al utilizarse en su dosis EC 50, lo que indica que no se requiere una alta concentración del medicamento para inhibir al 50% de la población. Además, resaltando un efecto superior a los demás antibióticos y mezclas con las que se comparó.

Se determinó que la mezcla CA obtuvo un porcentaje de inhibición mayor en comparación a todas las otras mezclas, sin embargo, no fue superior a la amoxicilina utilizada independientemente.

En general el metronidazol y sus mezclas obtuvieron los resultados de inhibición más bajos, a menos que estuviera en presencia de ciprofloxacina, lo cual podría indicar un efecto sinérgico.

Se demostró una relación directamente proporcional entre el aumento de la concentración de cada antibiótico y su efecto en el porcentaje de inhibición de la bacteria *E. faecalis*.

La resistencia que la cepa mostró hacia las concentraciones utilizadas de metronidazol y ciprofloxacina, nos habla de la posible resistencia adquirida de esta clase de microorganismos hacia antibióticos de uso común, o a una posible concentración desestimada de estos agentes.

Posteriores evaluaciones son necesarias para determinar un efecto compuesto de moléculas antibióticas adicionales que contribuyan a alcanzar una inhibición completa o más efectiva.

## **11. REFERENCIAS**

1. Grossman LI. Endodontic practice, 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970.
2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am. 1974 Apr;18(2):269–96.

3. Venturi M, Prati C, Capelli G, Falconi M, Breschi L. A preliminary analysis of the morphology of lateral canals after root canal filling using a tooth-clearing technique. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):54–63.
4. Ahmed HMA, Dummer PMH. A new system for classifying tooth, root and canal anomalies. *Int Endod J.* 2018 Apr;51(4):389–404.
5. Zandi H, Rodrigues RCV, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, et al. Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2016 Sep;42(9):1307–13.
6. Xu J, He J, Shen Y, Zhou X, Huang D, Gao Y, et al. Influence of Endodontic Procedure on the Adherence of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2019 Jul;45(7):943–9.
7. Brito PRR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, De-Deus G, Lopes HP, et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1422–7.
8. Urban K, Donnermeyer D, Schäfer E, Bürklein S. Canal cleanliness using different irrigation activation systems: a SEM evaluation. *Clin Oral Investig.* 2017 Dec;21(9):2681–7.
9. Betancourt P, Merlos A, Sierra JM, Arnabat-Dominguez J, Viñas M. Er,Cr:YSGG Laser-Activated Irrigation and Passive Ultrasonic Irrigation: Comparison of Two

Strategies for Root Canal Disinfection. *Photobiomodulation Photomed Laser Surg.* 2020 Feb;38(2):91–7.

10. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc* 1939. 1966 Jan;72(1):87–93.
11. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. 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.
12. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs of bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Jun;8(3):172–6.
13. Cochrane S, Burrow M, Parashos P. Effect on the mechanical properties of human and bovine dentine of intracanal medicaments and irrigants. *Aust Dent J.* 2019 Mar;64(1):35–42.
14. Sun X, Wang S, Yang Y, Luo C, Hou B. Study of invasion and colonization of *E. faecalis* in microtubes by a novel device. *Biomed Microdevices* [Internet]. 2016 Oct [cited 2020 Apr 16];18(5). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10544-016-0108-5>
15. Sahar-Helft S, Sarp ASK, Stabholtz A, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Comparison of Positive-Pressure, Passive Ultrasonic, and Laser-Activated Irrigations

- on Smear-Layer Removal from the Root Canal Surface. *Photomed Laser Surg.* 2015 Mar;33(3):129–35.
16. AlSaeed T, Nosrat A, Melo MA, Wang P, Romberg E, Xu H, et al. Antibacterial Efficacy and Discoloration Potential of Endodontic Topical Antibiotics. *J Endod.* 2018 Jul;44(7):1110–4.
  17. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.* 2004 Feb;37(2):132–8.
  18. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2002 Sep;94(3):281–93.
  19. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):361–9.
  20. Ahmed HMA, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PMH. A new system for classifying root and root canal morphology. *Int Endod J.* 2017 Aug;50(8):761–70.
  21. Fouad AF. The Microbial Challenge to Pulp Regeneration. *Adv Dent Res.* 2011 Jul 1;23(3):285–9.
  22. Roche Y. In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Sep 1;40(3):353–7.

23. Ritter AL de S, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol.* 2004 Apr;20(2):75–84.
24. Molina-Santiago C, Ramos JL. Bactericidal and bacteriostatic antibiotics and the Fenton reaction: Toxic chemicals. *Microb Biotechnol.* 2014 May;7(3):194–5.
25. Ocampo PS, Lázár V, Papp B, Arnoldini M, Abel zur Wiesch P, Busa-Fekete R, et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4573–82.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22 32(3):75-77.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. M07-A9 32(2):18-20.
28. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.* 1996 Mar;29(2):118–24.
29. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Kota K, Iwaku M, Noda T. Bactericidal Efficacy of a Mixture of Ciprofloxacin, Metronidazole, Minocycline and Rifampicin against

Bacteria of Carious and Endodontic Lesions of Human Deciduous Teeth *In Vitro*.

Microb Ecol Health Dis. 1992 Jan;5(4):171–7.

30. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod*. 2005 Jun;31(6):439–43.
31. Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis*. *Iran Endod J*. 2012;7(3):149–55.
32. Ghabraei S, Marvi M, Bolhari B, Bagheri P. Minimum Intracanal Dressing Time of Triple Antibiotic Paste to Eliminate *Enterococcus Faecalis* (ATCC 29212) and Determination of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration: An Ex Vivo Study. *J Dent Tehran Iran*. 2018 Jan;15(1):1–9.
33. Rafatjou R, Yousefimashouf R, Farhadian M, Afzalsoltani S. Evaluation of the antimicrobial efficacy of two combinations of drugs on bacteria taken from infected primary teeth (in vitro). *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent*. 2019 Dec;20(6):609–15.
34. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study: Discoloration from endodontic materials. *Int Endod J*. 2012 Oct;45(10):942–9.

35. Akcay M, Arslan H, Yasa B, Kavrik F, Yasa E. Spectrophotometric Analysis of Crown Discoloration Induced by Various Antibiotic Pastes Used in Revascularization. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):845–8.
36. Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B. Spectrophotometric Analysis of Coronal Tooth Discoloration Induced by Various Bioceramic Cements and Other Endodontic Materials. *J Endod.* 2015 Nov;41(11):1862–6.
37. Kim J-H, Kim Y, Shin S-J, Park J-W, Jung I-Y. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010 Jun;36(6):1086–91.
38. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J.* 2010 Dec;55(4):446–52.
39. Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *J Endod.* 2014 Mar;40(3):333–8.
40. Adl A, Hamed S, Sedigh Shams M, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J.* 2014;9(2):123–6.

41. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007 Feb;29(1):47–50.
42. Saber SE-DM, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent*. 2012 Jan;6(1):43–50.
43. Kayalvizhi G, Subramaniyan B, Suganya G. Topical application of antibiotics in primary teeth: an overview. *J Dent Child Chic Ill*. 2013 Aug;80(2):71–9.
44. Nosrat A, Li KL, Vir K, Hicks ML, Fouad AF. Is pulp regeneration necessary for root maturation? *J Endod*. 2013 Oct;39(10):1291–5.
45. Casamassimo PS, McTigue DJ, et al. *Pediatric dentistry: infancy through adolescence*. 5th ed. China: Linda Duncan; 2013.
46. Finn SB. *Pulpal treatment of primary teeth. Clinical pedodontics*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1995.
47. Trairatvorakul C, Detsomboonrat P. Success rates of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline antibiotics used in the non-instrumentation endodontic treatment of mandibular primary molars with carious pulpal involvement. *Int J Paediatr Dent*. 2012 May;22(3):217–27.

48. Hoshino E, Kota K, Sato M, Iwaku M. Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vitro. *Caries Res.* 1988;22(5):280–2.
49. Nanda R, Koul M, Srivastava S, Upadhyay V, Dwivedi R. Clinical evaluation of 3 Mix and Other Mix in non-instrumental endodontic treatment of necrosed primary teeth. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2014 Aug;4(2):114–9.
50. Sabrah AHA, Yassen GH, Spolnik KJ, Hara AT, Platt JA, Gregory RL. Evaluation of Residual Antibacterial Effect of Human Radicular Dentin Treated with Triple and Double Antibiotic Pastes. *J Endod.* 2015 Jul;41(7):1081–4.