



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**  
**MAESTRÍA EN ENDODONCIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL  
DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”**

Autor:

**M.E. KENIA DEYANIRA VÁZQUEZ BALIÑO**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
**MAESTRO EN ENDODONCIA**

DIRECTOR.....Amaury de Jesús Pozos Guillén, PhD

ASESOR.....María Verónica Méndez González, MSc

ASESOR.....Ana María González Amaro, MSc

San Luis Potosí, S.L.P., 12 de Julio del 2023



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA  
MAESTRÍA EN ENDODONCIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL  
DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”**

Autor:

**M.E. KENIA DEYANIRA VÁZQUEZ BALIÑO**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN ENDODONCIA**

*Junio del 2023, Maestría en Endodoncia, U.A.S.L.P., México. Todos los  
derechos reservados.*

San Luis Potosí, S.L.P., 12 de Julio del 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA  
MAESTRÍA EN ENDODONCIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL  
DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
**MAESTRO EN ENDODONCIA**

---

Julio 2023, Maestría en Endodoncia, UASLP, México, Todos los derechos reservados

DIRECTOR

**Amaury de Jesús Pozos Guillén, PhD**  
**Profesor – Investigador**  
**Laboratorio de Ciencias Básicas, UASLP.**  
**Facultad de Estomatología, UASLP.**  
**San Luis Potosí, San Luis Potosí, México**

ASESOR

**María Verónica Méndez González, MSc**  
**Profesor – Investigador**  
**Maestría en Endodoncia**  
**Facultad de Estomatología, UASLP.**  
**San Luis Potosí, San Luis Potosí, México**

ASESOR

**Ana María González Amaro, MSc**  
**Profesor – Investigador**  
**Maestría en Endodoncia**  
**Facultad de Estomatología, UASLP.**  
**San Luis Potosí, San Luis Potosí, Méxi**



## “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”

Autor:

**M.E. Kenia Deyanira Vázquez Baliño**

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por las siguientes autoridades:

---

---

**C.M.F. Ricardo Martínez Rider**

Director de la Facultad de Estomatología.

---

**PhD. Yolanda Hernández Molinar**

Jefe de la División de Posgrado de la Facultad de Estomatología

---

**MSc. María Verónica Méndez González**

Coordinadora de la Maestría en Endodoncia



## **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”**

Autor:

**M.E. Kenia Deyanira Vázquez Baliño**

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por los siguientes asesores:

---

**PhD. Amaury de Jesús Pozos Guillén**  
DIRECTOR DE TESIS

**MSc. María Verónica Méndez González**  
ASESORA

**MSc. Ana María González Amaro**  
ASESORA



## **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO”**

Autor:

**M.E. Kenia Deyanira Vázquez Baliño**

---

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por el siguiente jurado:

---

**M.C. Francisco Javier Ducoing Hernández**  
Presidente

---

**MSc. Aura Cárdenas Vázquez**  
Secretario

---

**Dra. Claudia Edith Dávila Pérez**  
Vocal

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme cumplir un sueño más en mi vida, por acompañarme y no soltarme de su mano.

A mi padre Aurelio Vázquez gracias por ser proveedor de todo lo requerido en la maestría, gracias por estar en mis momentos más difíciles en los cuales sentía que ya no podía más, el brindarme un consejo, por darme cariño durante las clases en línea, y siempre estar motivando y fomentando mi estudio día con día.

A mi madre Fernanda Baliño gracias por ser parte de esta experiencia y cuidar de mí en todos los aspectos de mi vida, gracias por consentirme en tiempos difíciles y siempre ayudar a no rendirme, por los festejos del día del dentista y hacerme sentir sumamente especial y una hija querida.

A mis tres hermanos, Claudia, Asai y Jesús por ser mi motivación de cada día, por escucharme y siempre estar presentes en los momentos mas difíciles de mi vida, por levantarme cuando caigo y estar siempre unidos.

A mis compañeras Paola y Katia gracias porque fueron parte de mi trayectoria en la maestría y fueron de gran apoyo para mi estancia dentro de la misma, por hacer de esos días pesados un día bonito, gracias por su confianza y consejos, por hacerme sentir especial y estar conmigo estos dos años y medio.

A mi compañera Zairita gracias por ser parte de mi crecimiento dentro de la maestría, por siempre estar a mi lado y apoyarme en trabajos, tareas y prestándome las cosas que se me olvidaban en clínica, por escuchar a este perico parlanchín siempre que iba a su cubículo de trabajo y por ser siempre una gran amiga, y el hacerme sentir especial con pequeños detalles.

A mis compañeros de la generación E-XXX gracias, porque sin duda alguna vivimos historias y momentos muy gratos donde la unión hacía la fuerza, aprendí tanto de cada uno de ustedes y me llevo recuerdos especiales de cada compañero, gracias por ser parte de mi vida.

A mi asesora la Dra. Verónica Méndez gracias, por formar de mí una alumna con características y cualidades de una gran Endodoncista, por apoyarme durante el proceso de mi tesis y a lo largo de mi carrera.

A mi asesora la Dra. Ana María gracias, por ser pieza importante durante toda mi estancia en la maestría, por sus buenos consejos, por ser siempre tan positiva y regalarme una sonrisa, por todo el apoyo incondicional que me brindó sin recibir nada a cambio, por regalarme una sonrisa todas las mañanas y hacer de mí una mejor estudiante, pero sobre todo una mejor persona.

A la Dra. Selene gracias, por estar siempre apoyándome en el laboratorio y ser muy entregada con los alumnos en todo momento, resolviendo dudas y ser más que una docente ser una buena compañera.

A mis amigos, Fernanda, Christopher, Crista y Karla por ser parte del proceso y siempre estar conmigo apoyándome moralmente y ser parte de mi vida durante más de diez años.

Gracias a todos aquellos pacientes que me permitieron aprender y me confiaron su boca para realizar tratamientos y así poder hacer este sueño realidad.

Y finalmente gracias a todo el personal que conforma el equipo de la Maestría en Endodoncia que día a día colocan un granito de arena para hacer funcional lo que ahora podemos llamar Maestría en Endodoncia.

“Evaluación de la actividad antimicrobiana del diclofenaco sobre un biofilm mixto” ©

2023 by Kenia Deyanira Vázquez Baliño is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO SOBRE UN BIOFILM MIXTO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO  
SOBRE UN BIOFILM MIXTO**

M.E. Kenia Deyanira Vázquez Baliño

Maestría en Endodoncia

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

2023, San Luis Potosí, México

**Introducción:** Uno de los objetivos de la terapia endodóntica es la reducción o eliminación de las bacterias y sus subproductos dentro del sistema del conducto radicular, esto a través de diversos métodos y técnicas para disminuir dichos microorganismos. Sin embargo en muchas ocasiones esto no se puede lograr por completo.

**Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana del Diclofenaco sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

**Metodología:** Se realizó un *biofilm* de *E. faecalis* y *C. albicans* por 30 días utilizando el método de flujo laminar, colocándole el Diclofenaco Sódico por 24 Hrs, para posterior conteo de UFC's y Microscopía Electrónica de Barrido.

**Resultados:** Se observó una disminución de la carga bacteriana estadísticamente significativa de la toma de muestra Preoperatoria y Postoperatoria, se observó disgregación del *biofilm* al colocarle Diclofenaco, lo que se comprobó mediante el conteo de UFC's y observación al MEB.

**Conclusión:** En este estudio se comprueba que el Diclofenaco Sódico posee capacidad antimicrobiana en cepas planctónicas de *C. albicans* y *E. faecalis* a concentraciones del 1.25%, sin embargo, en un biofilm maduro de 30 días demostró destrucción de los polímeros a concentraciones del 5%.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>MARCO TEORICO .....</b>	<b>3</b>
1.1	Endodoncia .....	3
1.2	Fracaso endodóntico.....	3
1.3	Enterococcus faecalis .....	5
1.4	Candida albicans.....	6
1.5	Células planctónicas y <i>Biofilm</i> .....	8
1.6	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	10
1.7	Hidróxido de calcio como medicación intraconducto .....	11
1.8	Antibióticos y su uso como medicamento intraconducto .....	15
1.9	AINEs y su capacidad antimicrobiana .....	19
1.10	Diclofenaco y sus propiedades antimicrobianas .....	22
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
2.1	Pregunta de investigación .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	Objetivo General: .....	28
3.2	Objetivos Específicos:.....	28
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>30</b>
5.1	Lugar de realización: .....	30
5.2	Tipo de Investigación: Mixta Diseño de estudio: Experimental <i>In vitro</i> . 30	
5.3	Criterios de selección.....	30
5.3.1	Criterios de inclusión: .....	30
5.3.2	Criterios de exclusión: .....	30
5.3.3	Criterios de eliminación: .....	30
5.4	Definición Conceptual y operacional de las Variables .....	31
5.4.1	Independiente.....	31
5.4.2	Dependiente .....	31
5.5	Análisis estadístico.....	32
5.6	Consideraciones éticas .....	32

5.7	Técnica o Fase experimental .....	33
6	<b>RESULTADOS</b> .....	49
	<i>Imágenes del microscopio estereoscópico; grupo control positivo postoperatorio</i> .....	59
	<i>Imágenes del microscopio estereoscópico; grupo experimental diclofenaco postoperatorio</i> .....	60
	<i>Imágenes del microscopio estereoscópico; grupo control negativo</i> .....	61
	<i>Imágenes del microscopio electrónico de barrido</i> .....	62
7	<b>DISCUSIÓN</b> .....	68
8	<b>CONCLUSIONES</b> .....	75
9	<b>REFERENCIAS</b> .....	76
10	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	82
11	<b>ANEXOS</b> .....	83

## INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la terapia endodóntica es la reducción o eliminación de las bacterias y sus subproductos dentro del sistema del conducto radicular, esto a través de diversos métodos y técnicas para disminuir dichos microorganismos. Sin embargo en muchas ocasiones esto no se puede lograr por completo. La persistencia de dichas bacterias resistentes dentro del conducto radicular está relacionado con el fracaso endodóntico, pues los microorganismos pueden permanecer dentro de los túbulos dentinarios, volviéndolos resistentes a la instrumentación y al hipoclorito de sodio. Autores como Nair Ramachandran menciona que uno de los principales factores que predisponen al fracaso endodóntico es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de conductos radiculares y/o en el área perirradicular. Se han realizado múltiples estudios donde se comprueba la persistencia de microorganismos dentro de las paredes y en los túbulos dentinarios, siendo reportados principalmente *E. faecalis*, *P. acnes* y *A. israelii*. Otro dato importante son los casos de tratamiento endodóntico fallido, donde *E. faecalis* se ha aislado con gran frecuencia en un (36,7%), de la misma manera levaduras de *C. albicans*, aisladas de un 1 - 17% en infecciones persistentes, en cultivos puros o junto con otras bacterias. Ante esta situación se ha implementado el uso de la medicación intraconducto, siendo el más utilizado el Hidróxido de calcio en diversas presentaciones, sin embargo se ha demostrado que las células de *C. albicans* y *E. faecalis* son altamente resistentes al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . En la búsqueda de poder solucionar y lograr una desinfección completa del sistema de conductos radiculares, se han probado diversos métodos y medicamentos.

Se ha reportado que algunos medicamentos de uso sistémico han sido probados como medicación intraconducto entre ellos los antibióticos teniendo resultados favorables en la eliminación, sin embargo presentan desventajas como pigmentación de la dentina o la resistencia a los mismos, motivo por el cual se ha indagado y buscado nuevas alternativas para la eliminación de estos patógenos, desde el año 1999 se han probado diversos AINEs como alternativa a esta resistencia a los antibióticos, estos han presentado tener poder antimicrobiano contra algunas cepas bacterianas y hongos, lo que puede llegar a ser una opción en endodoncia como medicación intraconducto.

Uno de ellos es el Diclofenaco Sódico, en diversos artículos se ha demostrado que posee capacidad antimicrobiana, siendo así, que en la presente investigación se evaluará su capacidad o acción antimicrobiana en patógenos endodónticos persistentes en el fracaso endodóntico y así se podrá corroborar los resultados presentados en diversas publicaciones sobre su poder antimicrobiano para su posible aplicación como medicación intraconducto.

# **1 MARCO TEORICO**

## **1.1 Endodoncia**

El tratamiento endodóntico está esencialmente dirigido a la prevención y control de infecciones pulpares y perirradiculares. La eliminación de los microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares involucra diferentes pasos durante el tratamiento endodóntico.

La preparación quimiomecánica conduce a una reducción significativa de la carga microbiana(1), pero el uso de medicación intraconducto es necesario en caso de infecciones persistentes ya que existen microorganismos refractarios que permanecen dentro de los túbulos dentinarios y áreas anatómicas complejas de difícil acceso al momento de la instrumentación y la irrigación.(2) Lo que conlleva un desafío importante para el operador en la eliminación de dichas bacterias. Lo cual sugiere la búsqueda de nuevos métodos para la eliminación completa de los microorganismos persistentes dentro del sistema de conducto radicular, para así lograr el éxito del tratamiento endodóntico.

## **1.2 Fracaso endodóntico**

Sin duda, los principales factores asociados con el fracaso endodóntico es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de conductos radiculares y/o en el área perirradicular, agentes asociados con el fracaso de la terapia endodóntica; incluyendo infección extrarradicular, reacciones a cuerpo extraño y quistes verdaderos. (3) Se sabe que los microorganismos que colonizan el sistema de conductos radiculares juegan un papel esencial en la patogénesis de las lesiones perirradiculares. Las influencias ambientales operan en el sistema de conductos radiculares durante el tratamiento, lo que permite que ciertos microorganismos sobrevivan y, dependiendo de estos factores, provoquen el fracaso.

Para sobrevivir en el conducto radicular, los microorganismos deben resistir las medidas de desinfección intraconducto y adaptarse a un entorno en el que hay pocos nutrientes disponibles. Por lo tanto, las pocas especies microbianas que tienen tal capacidad pueden estar involucradas en el fracaso del tratamiento del conducto radicular. Pues las bacterias ubicadas en áreas como istmos, ramificaciones, deltas, irregularidades y túbulos dentinarios a veces pueden no verse afectadas por los procedimientos de desinfección endodóntica.

Estudios han asociado la presencia de hongos con infecciones endodónticas resistentes a la terapia (3). Desde décadas atrás se han identificado la presencia de *C. albicans*. Autores como Waltimo et al. analizaron 692 muestras de periodontitis apical crónica resistente a la terapia, identificando 48 hongos en 47 (7%) muestras. (4) En otro estudio publicado por J. Craig Baumgartner et al. de las 20 muestras aisladas de levadura identificadas a nivel de especie, 16 (80 %) pertenecían a *C. albicans*. (5). Se ha reportado en la literatura que *C. albicans* tiene la capacidad de invadir los túbulos dentinarios; una vez dentro de ellos, la levadura puede protegerse de la acción letal de los agentes químicos porque las sustancias curativas son inactivadas por la capacidad amortiguadora de la dentina. (6)(1) De igual manera su capacidad de invasión, se ha demostrado que *C. albicans* es resistente a algunos medicamentos vía intraconducto después del contacto directo.(7) Weckwerth et al., en su estudio se identificó *C. albicans* en el 46,15% de los pacientes sometidos en el mismo estudio, lo que corrobora lo ya publicado en otros artículos sobre la alta incidencia de *C. albicans*.(8)

Cabe mencionar la importancia también de las infecciones secundarias que requieren en ocasiones la colocación de una medicación intraconducto, debido a que la diferencia que existe en infecciones endodónticas primarias, es su naturaleza polimicrobiana y dominadas por bacilos anaerobios Gram -, y en cambio los microorganismos implicados en infecciones secundarias están compuestos por una o pocas especies bacterianas generalmente bacterias grampositivas, sin predominio aparente de facultativas o anaerobias.(9)

Molander A et al., reportaron que del total de 100 dientes con obturación radicular con periodontitis apical muestreados, se informó que *E. faecalis* fue el organismo recuperado con mayor frecuencia (32 %).(10) En un estudio similar, publicado por Vytaute Peciuliene et al., donde se tomaron 25 muestras de dientes tratados con endodoncia y que requerían un nuevo tratamiento se encontró *E. faecalis* en 14 de esos 20 dientes con crecimiento bacteriano.(11) En otro estudio realizado con monos publicado por Lars Fabricius et al., se reporta que después de la inoculación de diferentes bacterias en el conducto radicular y la inducción de lesiones periapicales. Los dientes tratados endodónticamente y con un seguimiento de 2 a 2,5 años, se encontró que en los conductos radiculares cuando se retiró la obturación radicular, 30 de los 31 conductos tenían lesiones periapicales persistentes.(12) Es importante destacar que más de estas lesiones no curadas se asociaron con varias combinaciones de cepas bacterianas, es decir, infecciones mixtas.

### **1.3 Enterococcus faecalis**

Los Enterococos son cocos grampositivos que pueden aparecer solos, en parejas o como cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, que poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, sobreviven en ambientes muy hostiles que incluyen un pH alcalino extremo. *E. faecalis* se encuentra en 4 a 40% de las infecciones endodónticas primarias y se ha demostrado que la frecuencia de *E. faecalis* encontrada en lesiones perirradiculares persistentes es mucho mayor. De hecho, los casos de fracaso endodóntico tienen nueve veces más probabilidades de contener *E. faecalis* que las infecciones endodónticas primarias.(13)

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo comúnmente detectado en infecciones endodónticas persistentes asintomáticas y que, a pesar de que constituye una pequeña proporción de la flora en los conductos no tratados, juega un papel importante en la etiología de las lesiones perirradiculares persistentes después del tratamiento del conducto radicular.(13) Su prevalencia en este tipo de infecciones oscila entre el 24% y el 77%. Lo que puede explicarse por los factores de supervivencia y virulencia que

posee, incluida su capacidad para competir con otros microorganismos, invadir los túbulos dentinarios y resistir la privación nutricional.(14)

*E. faecalis* posee enzimas líticas, citolisina, sustancia de agregación, feromonas y ácido lipoteicoico, es capaz de suprimir la acción de los linfocitos, contribuyendo potencialmente al fracaso endodóntico, es capaz de compartir estos rasgos de virulencia entre especies, contribuyendo aún más a su supervivencia y capacidad para causar enfermedades.(15) Se encuentra comúnmente en un alto porcentaje de fallas del conducto radicular y es capaz de sobrevivir en el conducto radicular como un solo organismo o como un componente principal de la flora.(16)

Posee serina proteasa, gelatinasa y proteína de unión a colágeno (Ace), que lo ayudan a unirse a la dentina. Tiene la capacidad de soportar períodos prolongados de inanición hasta que se dispone de un suministro nutricional adecuado. El suero, que se origina en el hueso alveolar y el ligamento periodontal, también ayuda a que *E. faecalis* se una al colágeno tipo I. Es capaz de formar una biopelícula que le ayuda a resistir la destrucción al permitir que la bacteria se vuelva 1000 veces más resistente a la fagocitosis, los anticuerpos y los antimicrobianos.(16)

#### **1.4 Candida albicans**

*C. albicans* es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza.

Los factores de virulencia más estudiados incluyen la producción de proteinasas, como la colagenasa, las aminopeptidasas, la fosfatasa alcalina, la hialuronidasa y la condroitina sulfatasa, todas ellas con algún efecto sobre la degradación de las proteínas de la matriz extracelular.(17) Otros factores relacionados con la adherencia a las células huésped, así como la capacidad de morfogénesis y formación de biopelículas, también son determinantes importantes de la virulencia en la especie.(18)

En una revisión sistemática y un metanálisis mostraron que *Candida albicans* es el hongo aislado con mayor frecuencia de los conductos radiculares infectados, la podemos encontrar en infecciones endodónticas persistentes/refractarias. (19)

Tiene la capacidad de unirse a superficies bióticas y abióticas, es dentinófilo y coloniza las paredes dentinarias de los conductos radiculares, penetrando en los túbulos dentinarios y formando biopelículas. Su adherencia a las superficies está mediada por una pared celular gruesa, con una estructura central formada quitina,  $\beta$ -(1,3)-glucano y  $\beta$ -(1,6)-glucano. (Fig 1 ). Las células redondas de *C. albicans* se adhieren a las superficies de la dentina durante

60–90 min y después proliferan para formar una capa basal de biopelícula que madura en 24 h, éstas contienen múltiples capas de células polimórficas que consisten en formas de hifas y pseudohifas.

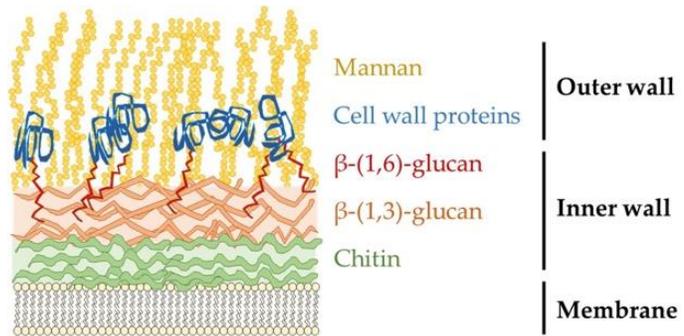


Figura 1. Componentes de la pared celular de *C. albicans*

*C. albicans* presenta resistencia a las respuestas inmunitarias del huésped y al tratamiento antimicótico, porque el crecimiento celular y el metabolismo son ralentizados y protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y algunos factores protectores.

Numerosos hongos patógenos, como *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*, pueden producir prostaglandinas junto con otros metabolitos del ácido araquidónico. (20) Recordando que las prostaglandinas son pequeñas moléculas lipídicas que tienen diversas actividades biológicas, incluyendo la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped. El ácido araquidónico (AA) se libera de las células huésped infectadas durante la infección por *Candida albicans* y puede servir como fuente de carbono para el crecimiento de la levadura y como precursor para la producción de eicosanoides biológicamente activos, como la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). (21) Ahora se sabe que son producidas por hongos patógenos, así como por células de mamíferos

siendo así que la PGE<sub>2</sub> de *C. albicans* es biológicamente activa en las células de los mamíferos, ya que inhibe la proliferación de los globulos blancos y disminuye su producción de TNF $\alpha$  mientras estimula la secreción de IL-10.(22) Además, la PGE<sub>2</sub> modula la morfogénesis de *C. albicans*, lo que respalda aún más el papel de las prostaglandinas fúngicas como posibles factores de virulencia.

Los eicosanoides están involucrados en la infección por *C. albicans*, afectando las respuestas inmunitarias del huésped, mejorando la permeabilidad vascular y facilitando la invasión de las células/tejidos del huésped.(23) En un estudio realizado por John R. Erb-Downward Mckenzie, et al., 2007 habla sobre la biosíntesis de prostaglandinas en *Candida* spp., y describe como el gen de la oxidasa multicobre FET<sub>3</sub> y el gen de la estearil-CoA desaturasa OLE<sub>2</sub> están involucrados en la síntesis de PGE<sub>2</sub> en *C. albicans*.(24)

Componentes de la pared celular como quitina, glucano o mananos, ADN, ARN y detección de quórum moléculas en *C. albicans*, están involucradas en el reconocimiento por monocitos y macrófagos. Pues el fosfolipomanano en *C. albicans* es reconocido por TLR2 en macrófagos que activan el núcleo factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y producen el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ . Así también *C. albicans* afecta la activación de los macrófagos y modula el metabolismo de la arginasa para evitar la muerte.(19)(23)

## **1.5 Células planctónicas y *Biofilm***

Ahora existe una literatura significativa que demuestra que la fisiología de una bacteria en cultivo planctónico es completamente diferente de la del mismo organismo que crece en una superficie en una biopelícula.(25) El término biopelícula se introdujo para designar las condensaciones en capas delgadas de microorganismos que pueden ocurrir en varias estructuras superficiales en la naturaleza y a diferencia de esta los microorganismos planctónicos son las bacterias flotantes que existen en un ambiente acuoso, que son fundamentales para la formación de biopelículas.(26) Tales películas

pueden así establecerse sobre cualquier sustrato superficial orgánico o inorgánico donde predominen los microorganismos planctónicos en una solución a base de agua.

Las bacterias planctónicas son más sensibles a los agentes antimicrobianos debido a su fácil difusión dentro del fluido a granel, mientras que las bacterias del *biofilm* son notablemente resistentes a estos agentes.(27) En comparación con las bacterias en estado planctónico, las biopelículas bien establecidas tienen varias propiedades protectoras adicionales contra los agentes antimicrobianos. Estas propiedades incluyen una matriz de biopelícula, tasa de crecimiento alterada de organismos en el *biofilm* y otros cambios fisiológicos causados por el modo de crecimiento del *biofilm*(28)

Las biopelículas se forman cuando las bacterias planctónicas en una fase líquida natural se depositan sobre una superficie que contiene una matriz polimérica acondicionadora orgánica o “película acondicionadora”.(29) En este proceso dinámico, muchos otros organismos se adhieren conjuntamente a la superficie y crecen con algunas células que se desprenden de la biopelícula con el tiempo. Svensäter et al., plantearon la hipótesis de la formación de biopelículas en los conductos radiculares, ésta probablemente se inicia en algún momento después de la primera invasión de la cámara pulpar por organismos orales planctónicos después de alguna ruptura tisular. En este punto, el frente de la lesión inflamatoria que se mueve sucesivamente hacia el ápice proporcionará el vehículo fluido para los organismos planctónicos invasores para que estos puedan multiplicarse y continuar adhiriéndose a las paredes del conducto radicular.(26)

La excreción de sustancias adhesivas como polisacáridos y proteínas es crucial para la adhesión inicial de los organismos, así como para mantener unidas las bacterias del *biofilm* esta estructura brindará protección y podrá permitir una mejor resistencia a las influencias externas adversas para los organismos incorporados en comparación con el estado planctónico. (30) Fenotípicamente, los organismos también pueden adoptar un carácter diferente. Las sustancias poliméricas extracelulares que constituyen esta

matriz presentan una barrera de difusión al afectar la tasa de transporte de los agentes en el *biofilm* o inhiben los agentes directamente por unión y dilución.

Las etapas de desarrollo de un *biofilm* incluyen la deposición de una película acondicionadora, adhesión y colonización de microorganismos planctónicos en una matriz polimérica, co-adhesión de otros organismos y desprendimiento de microorganismos del biofilm al entorno.(26)(Fig 2.)

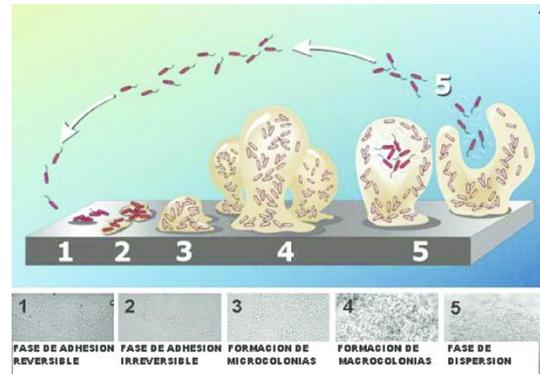


Fig 2. Etapas de desarrollo de un biofilm

Se ha propuesto otro mecanismo para la resistencia a los agentes antimicrobianos del *biofilm*, la razón puede ser que las células asociadas al *biofilm* crecen significativamente más lentamente que las células planctónicas y, como resultado, absorben los agentes antimicrobianos más lentamente. (31) Autores como Nathalie Brändle et al., han reportado que los microorganismos planctónicos son más susceptibles a la solución saturada de hidróxido de calcio en comparación a microorganismos suspendidos en biofilm o en estado polimicrobiano. Reportan que la formación de biopelículas multiespecies también mejoró la supervivencia de *E. faecalis* en comparación con las células planctónicas o adherentes. (31) También se observó que la adhesión a la dentina fue el factor principal en la mejora de la resistencia de *E. faecalis*. Cabe destacar que la base del enfoque ecológico de las infecciones endodónticas sugiere que el "patógeno" más peligroso no es una especie individual, sino una entidad polimicrobiana que sufre cambios fisiológicos y genéticos desencadenados por cambios en el entorno del conducto radicular. (28)

## 1.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La CMI, o concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo de una

determinada cepa bacteriana después de 24 horas de incubación a 37°C (este período se extiende para organismos como los anaerobios, que requieren una incubación prolongada para el crecimiento).(32) Permite determinar de forma precisa la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno. La CMI se ha establecido como “estándar de oro” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. (32)

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas).

La CMI y CMB no se determina cuando los requisitos de crecimiento de ciertos organismos exigen que la prueba de sensibilidad se realice por otro método (Kirby-Bauer o disco-placa). El CLSI no dispone de criterios interpretativos. En tales casos, los antibióticos recomendados se basarán normalmente en estudios de eficacia clínica, también cuando se trata de antibióticos que no están comercialmente disponibles y cuando se sabe que el fármaco es clínicamente ineficaz contra el microorganismo, con independencia de los resultados in vitro. (32)

## **1.7 Hidróxido de calcio como medicación intraconducto**

Grossman en 1978 menciona que la preparación mecánica y la desinfección química del conducto radicular del diente afectado siguen siendo los procedimientos más importantes en la terapia endodóntica. Sin embargo, existen microorganismos que pueden llegar a penetrar los tubulillos dentinarios haciendo difícil su eliminación. La preparación quimiomecánica completa puede considerarse un paso esencial en la desinfección del conducto radicular.(33) Sin embargo, la eliminación total de bacterias es difícil de lograr.

Un medicamento intraconducto se usa para: Eliminar las bacterias que quedan después de la instrumentación del conducto, reducir la inflamación de los tejidos periapicales y los restos pulpares, de igual manera hacer que el contenido del conducto sea inerte y neutralizar los restos de tejido, actuar como una barrera contra las fugas del relleno temporal y ayudar a secar los conductos persistentemente húmedos.

Los agentes desinfectantes se utilizan como irrigantes o como medicación intraconducto entre citas, comúnmente se utiliza una amplia variedad de medicamentos. Las pruebas in vitro han demostrado que las bacterias generalmente mueren rápidamente cuando están en contacto indirecto con varios medicamentos, incluso en diluciones altas. En un estudio clínico realizado por Sjogren et al, la mitad de los conductos radiculares infectados quedaron libres de bacterias cuando se utilizó un irrigante antibacteriano durante la instrumentación del conducto radicular.(34) Y las bacterias que sobrevivieron fueron eliminadas mediante la aplicación de un medicamento intraconducto.

Dentro de los medicamentos intraconducto más utilizados está el hidróxido de calcio, introducido en el año de 1920 por Hermann, es una sustancia alcalina fuerte, que tiene un pH de aproximadamente 12,5.(35) En una solución acuosa, y su éxito como un limpiador intraconducto es debido a su efecto iónico, observado por la disociación química en iones oxidrilo y calcio y su acción sobre los tejidos y microorganismos. Los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que muestran una reactividad extrema, reaccionando con varias biomoléculas.(35)

Sus efectos biológicos y antisépticos dependen de la alcalinidad y la liberación de iones de calcio. Sus efectos letales sobre las células bacterianas probablemente se deban a sus mecanismos en el daño a la membrana citoplasmática bacteriana, que está es muy importante en las funciones del microorganismo ya que posee funciones importantes para la supervivencia de la célula, tales como: permeabilidad selectiva y transporte de solutos, transporte de electrones y fosforilación oxidativa en especies aeróbicas, excreción de exoenzimas hidrolíticas, portadores de enzimas y moléculas

transportadoras que funcionan en la biosíntesis de ADN, polímeros de la pared celular y lípidos de membrana; y llevar los receptores y otras proteínas de la quimiotáctica y otros sistemas de transducción sensorial.(35)

También los iones hidroxilo inducen la peroxidación lipídica, lo que resulta en la destrucción de los fosfolípidos, componentes estructurales de la membrana celular, eliminando los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados,(36) generando así un radical lipídico libre el cual reacciona con el oxígeno, dando como resultado la formación de un radical peróxido lipídico, que elimina otro átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso, generando otro peróxido lipídico. Por lo tanto, los peróxidos en sí mismos actúan como radicales libres, iniciando una reacción en cadena autocatalítica y dando como resultado una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y un daño extenso de la membrana.(36)

También actúa sobre la desnaturalización de las enzimas ya que la alcalinización proporcionada por el hidróxido de calcio induce la ruptura de los enlaces iónicos que mantienen la estructura terciaria de las proteínas. Como consecuencia, la enzima mantiene su estructura covalente pero la cadena polipeptídica se desenreda al azar en una conformación espacial variable e irregular. Estos cambios frecuentemente dan como resultado la pérdida de la actividad biológica de la enzima y la interrupción del metabolismo celular. De igual manera los iones de hidroxilo pueden reaccionar con el ADN bacteriano e inducen la división de las hebras. Los genes entonces se pierden y en consecuencia, se inhibe la replicación del ADN y se altera la actividad celular. Los radicales libres también pueden inducir mutaciones letales.(16,36)

Su capacidad para estimular la reparación tisular a través de la inducción de la mineralización confirma la acción biológica del hidróxido de calcio.(35) El posible efecto terapéutico de los iones calcio no se comprende tan bien, pero al parecer ejercería un efecto estimulante sobre ciertas fosfatasa alcalinas, que son enzimas vinculadas con la formación de tejidos duros, por estas características lo hacen la medicación intraconducto mayor empleado en el área de endodoncia. Sin embargo, se

ha demostrado que el hidróxido de calcio, es un medicamento intraconducto de uso común, pero es ineficaz para matar *E. faecalis* por sí solo, especialmente cuando no se mantiene un pH alto.(37–39)

Se han propuesto las siguientes razones para explicar por qué *E. faecalis* es capaz de sobrevivir al tratamiento intraconducto con hidróxido de calcio: 1: *E. faecalis* mantiene pasivamente la homeostasis del pH. Esto ocurre como resultado de la penetración de iones en la membrana celular, así como de la capacidad amortiguadora del citoplasma. 2: *E. faecalis* tiene una bomba de protones que proporciona un medio adicional para mantener la homeostasis del pH. Esto se logra mediante el "bombeo" de protones en la célula para reducir el pH interno. 3: A un pH de 11,5 o superior, *E. faecalis* no puede sobrevivir. Sin embargo, como resultado de la capacidad amortiguadora de la dentina, es muy poco probable que se pueda mantener un pH de 11,5 en los túbulos dentinarios con las técnicas actuales de utilización de hidróxido de calcio.(39)

Los estudios que utilizan el modelo de polvo de dentina han demostrado que la presencia de dentina tiene un efecto inhibitor sobre varias concentraciones de medicamentos para el conducto radicular, incluidos hidróxido de calcio, hipoclorito de sodio, clorhexidina y yoduro de potasio.(40) Diversos componentes de la dentina, incluida la matriz de dentina, el colágeno tipo I, la hidroxiapatita y el suero, son responsables de alterar los efectos antibacterianos de estos medicamentos.

En un estudio realizado por Henrique Weckwerth et al., donde evalúan la susceptibilidad in vitro de cepas orales de *Candida albicans* a diferentes niveles de pH y solución acuosa saturada de hidróxido de calcio, obtuvieron resultados donde la recuperación del cultivo disminuyó a un pH 11,5 y se inhibió por completo a pH 12,5, sin embargo hubo una diferencia significativa entre el pH 12,5 y otros valores de pH, siendo que a valores de pHs de 9.5 y 10.5 no inhibieron las cepas en ningún momento experimental. (8) *C. albicans* presenta altos niveles de actividad de fosfolipasa y proteasa, afectando la degradación de la matriz extracelular. Esta actividad enzimática podría dar como resultado la liberación de sustancias minerales, como el calcio, lo que

permite que las hifas penetren en los túbulos dentinarios y sea difícil su eliminación.(41) Waltimo T et. al, también reporta que incluso las especies más resistentes, como *E. faecalis* y *C. albicans*, sobreviven solo períodos de tiempo limitados en el alto pH de 12,5 de una solución acuosa saturada de hidróxido de calcio.(7)

Por otro lado una revisión de ensayos clínicos ha sugerido una eficacia limitada del hidróxido de calcio en la erradicación de microorganismos de los conductos radiculares infectados después de la instrumentación e irrigación con una solución de hipoclorito de sodio. (42) Se ha demostrado que *Enterococcus faecalis*, uno de los microorganismos involucrados en infecciones persistentes (predominantemente en fallas endodónticas) presenta resistencia a la terapia con hidróxido de calcio. (43) La resistencia de este microorganismo al hidróxido de calcio está relacionada con la presencia de una bomba de protones principalmente.(16)

## **1.8 Antibióticos y su uso como medicamento intraconducto**

El descubrimiento de la penicilina en 1929 y su posterior introducción en la clínica supuso una verdadera revolución en el tratamiento de la patología infecciosa. Desde entonces, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. Para que los antimicrobianos alcancen su diana deben atravesar la cubierta bacteriana, excepto cuando la diana es la propia envoltura externa de los gramnegativos. Con excepción de la pared celular, la práctica totalidad del resto de las dianas de los antimicrobianos se encuentra en células eucariotas.(44) Las bacterias gramnegativas ofrecen mayor resistencia que las grampositivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Dicha membrana es una bicapa de lipídica que, a diferencia de las membranas eucariotas, contiene lipolisacárido, y desempeñan un papel importante de barrera frente a determinados antimicrobianos(45)

Existen un gran número de proteínas, que representan 40% de su peso total, entre las cuales se encuentran las porinas, proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos y que permiten el acceso al peptidoglucano. A través de estos poros difunden de forma pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas, pero se impide el paso de otras mayores, por ejemplo los glucopéptidos.(44)

Por el contrario, los antibióticos más lipofílicos difunden a través de la bicapa lipídica, y algunos utilizan un mecanismo de transporte con gasto de energía. En las bacterias grampositivas, que carecen de membrana externa, se estima que el límite de exclusión es de 100 kDa, mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos.(44,45)

En cuanto al mecanismo de acción de los antibióticos desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos. Existen también otros antimicrobianos cuya función es proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de b-lactamasas.

Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas o bacteriostáticos.(44) En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucosidos. Y estos a su vez se pueden clasificar de acuerdo a sus mecanismos de acción en: Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana donde encontramos a los B-lactámicos, los que ejercen alguna alteración de la membrana citoplásmica como polimixinas, lipopéptidos, formadores de poros entre otros, después encontramos los que causan una inhibición de la síntesis proteica como las tetraciclinas, otro mecanismo de acción son los que alteran el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos, los

que actúan bloqueando la síntesis de factores metabólicos, y finalmente encontramos los inhibidores de B-lactamasas.(44,45)

Sabiendo esto la “era dorada” de los antibióticos abarcó desde la década de 1930 hasta la década de 1960, lo que dio lugar a muchos antibióticos. Desafortunadamente, esta era terminó porque los investigadores no pudieron mantener el ritmo del descubrimiento de antibióticos ante la aparición de patógenos resistentes.(46)

Los géneros Bacteroides, Actinomyces, Fusobacterium y Enterococcus se han convertido en hallazgos más destacados en infecciones pulpares y periapicales. Desde una perspectiva clínica, incluso más importante que saber qué organismos participan en una infección es saber qué antibióticos los matarán.(47) Las infecciones odontogénicas, incluidas las infecciones endodónticas, son polimicrobianas que involucran una combinación de anaerobios facultativos grampositivos, gramnegativos y anaerobios estrictos(48). Jungermann et al. menciona que las bacterias cuando se vuelven resistentes a los antibióticos, también adquieren la capacidad de intercambiar esta resistencia.(49) El riesgo de efectos adversos después de la aplicación sistémica y la ineficacia de los antibióticos sistémicos en algunas afecciones pulpares y periapicales ha llevado al uso de antibióticos aplicados localmente en el tratamiento del conducto radicular, es decir, dentro del sistema de conductos radiculares. (50)

Grossman et al., fue el primero en usar los antibióticos de uso local en una pasta poliantibiótica que contenía penicilina, bacitracina, estreptomina y caprilato de sodio.(51), Las PBSC contenían penicilina para detectar organismos grampositivos, bacitracina para cepas resistentes a la penicilina, estreptomina para organismos gramnegativos y caprilato de sodio para detectar levaduras, que después es reemplazado por la nistatina.

También se han propuesto el uso de tetraciclinas (tetraciclina-HCl, minociclina, demeclociclina, doxiciclina) debido a que las infecciones endodónticas son polimicrobianas, ya que son un grupo de antibióticos de amplio espectro que son

eficaces contra una amplia gama de microorganismos. Sato et al. (1996) demostraron la penetración a través de la dentina y la eficacia antibacteriana de una mezcla de minociclina, una tetraciclina, con ciprofloxacino y metronidazol, colocada en conductos radiculares previamente irrigados por ultrasonidos. Sin embargo su desventaja principal es la pigmentación dental y aunado a esto se ha demostrado que las tetraciclinas pueden promover el crecimiento de hongos.(52)

Otro compuesto comercial también propuesto como irrigante final, introducido por presentado por Torabinejad et al., en el año 2003 es el BioPure MTAD (Dentsply Sirona, Saltzburg, Austria), una mezcla de doxiciclina, ácido cítrico y un detergente (Tween 80), debido a sus numerosas propiedades: actividad antimicrobiana, disolución de la capa de frotis y de la pulpa. Sin embargo, uno de las desventajas principales es que los microorganismos aislados de los conductos radiculares se ha demostrado que tienen resistencia contra este grupo de antibióticos.(53) Sin embargo, Tay et al., encontraron que cuando se aplica MTAD a la dentina irrigada con NaOCl al 1,3 %, se reduce su sustentividad antimicrobiana.

Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggib w), Italia), como MTAD, es una mezcla de un antibiótico, un ácido y un detergente. Sin embargo, la concentración de antibiótico (50 mg/ml de doxiciclina) y el tipo de detergente (polipropilenglicol) son diferentes a los de MTAD, pero en un artículo publicado por Giardino et al., concluyen que a pesar que el Tetraclean tiene mayor actividad antimicrobiana que el MTAD no es comparable con la irrigación por si sola del NaOCl al 5.25%.(54)

Otro producto comercial también utilizado como medicación intraconducto encontramos a la pasta Ledermix; es un compuesto glucocorticosteroide antibiótico desarrollada por Schroeder y Triadan en el año de 1960, y Lederle Pharmaceuticals la lanzó a la venta en Europa en el año de 1962 con objetivo principal de controlar el dolor y la inflamación. La única razón para agregar el componente antibiótico a Ledermix fue para compensar lo que se percibía como una posible reducción inducida por corticoides en la respuesta inmune del huésped.(55) El antibiótico utilizado en esta

pasta es demeclociclina (en una concentración de 3,2%) y un corticoesteroide, acetónido de triamcinolona, en una base de polietilenglicol, estos dos medicamentos son capaces de difundirse a través de los túbulos dentinarios y el cemento para alcanzar los tejidos periodontales y periapicales, sin embargo su principal inconveniente es que la concentración de demeclociclina dentro del conducto radicular es lo suficientemente alta como para ser efectiva contra las especies sensibles de bacterias. Sin embargo, dentro de las partes periféricas de la dentina y en los tejidos periradiculares, la concentración se logra a través de la difusión en cantidades insuficientes para inactivar las bacterias.(55)

Otro producto es Septomixine forte (Septodont, Saint-Maur-des-fossé, Francia) otro producto comercial para uso intraconducto que contiene dos antibióticos, neomicina y sulfato de polimixina B, pero el efecto contra los microorganismos de origen endodóntico no es comparable con la medicación intraconducto con hidróxido de calcio.(56)

La pasta triantibiótica es la combinación que parece ser más prometedora ya que consiste en metronidazol, ciprofloxacino y minociclina, sin embargo, los antibióticos sistémicos parecen ser clínicamente efectivos como complemento en ciertos casos de endodoncia, su administración no está exenta del riesgo potencial de efectos sistémicos adversos, en particular la posibilidad de reacciones alérgicas, toxicidad, efectos secundarios y desarrollo de cepas resistentes.

## **1.9 AINEs y su capacidad antimicrobiana**

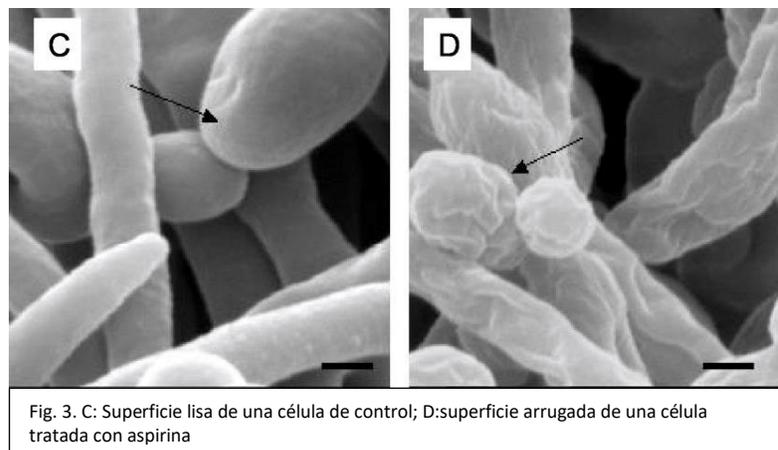
Todos los inhibidores de COX probados se clasifican como medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Estos bloquean específicamente la biosíntesis de prostaglandinas de mamíferos al inhibir una o ambas isoenzimas COX, COX-1 y COX-2.

Se ha demostrado que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como el flurbiprofeno y el ibuprofeno, inhiben la inflamación y la pérdida ósea alveolar

asociadas con la enfermedad periodontal destructiva crónica. EV Hersh et al., en 1991 realizan un estudio donde evaluaron la actividad antimicrobiana del ibuprofeno y flurbiprofeno in vitro en seis patógenos periodontales comúnmente aislados (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Wolinella recta*) y demostraron que tanto el flurbiprofeno como el ibuprofeno a dosis mayores de 250g poseen capacidad antimicrobiana. En otro estudio publicado por el autor S. Muñoz et. al., en el año 1996 se evaluó la capacidad antimicrobiana in vitro de diversos AINE´s (ácido acetilsalicílico, piroxicam, indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno, sulindac y diclofenaco) contra 62 cepas de *Brucella* spp. y como resultados obtuvieron que el Diclofenaco fue el más activo de los agentes antiinflamatorios (MIC90 = 16 µg/mL). (57) Ellos justifican la efectividad de estos AINE´s en comparación con algunos fármacos, como las quinolonas fluoradas, y se debe a que las quinolonas demuestran ser muy activas in vitro contra *Brucella* en condiciones estándar, pero su actividad se gravemente afectada por las modificaciones del pH. Esta reducción de la actividad se correlaciona con una alta incidencia de recaídas clínicas. Sin embargo algunos AINE´s y la mayoría de los fármacos psiquiátricos, excepto la flufenazina, exhiben, según el estudio, la misma actividad inhibitoria en condiciones estándar (pH 7), a pH 5 y a pH 4, factor que no parecen alterar la actividad de estos fármacos.(57)

W H Wang et al., estudia el efeco antimicrobiano de la Aspirina sobre *H. pylori* y observaron que la aspirina a una concentración de 100 µg/mL comenzó a mostrar un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *H. pylori* en comparación con el vehículo de control, mientras que una concentración de aspirina de 400 µg/mL resulta letal para *H. pylori*, en cuanto a los estudios morfológicos realizados por tinción de Gram revelaron la lisis completa de las células incubadas con 400 µg/mL de aspirina durante 48 horas.(58) Autores como Mohammed A. S. Alem et al. 2004, demuestran que los inhibidores de la COX etodolaco, diclofenaco y, en particular, la aspirina disminuyen drásticamente la producción de biopelículas por parte de *C. albicans*. También demuestran que algunos inhibidores de la COX bloquean completamente la formación de hifas por biopelículas, estos resultados apuntan a la existencia de al menos una vía

dependiente de COX en *C. albicans* y sugieren que las prostaglandinas fúngicas descubiertas recientemente pueden estar involucradas en el desarrollo de biopelículas. (59) Mohammed A. S. Alem et. al. explican la relación que tienen los efectos de los inhibidores de la COX en la formación de biopelículas. Ellos evaluaron algunos medicamentos inhibidores de la COX en ensayos de biopelícula con tres cepas de *C. albicans* donde la aspirina, el etodolaco (un inhibidor de la COX-2) y el diclofenaco produjeron los mayores efectos; la aspirina inhibía la formación de biopelículas hasta en un 95%. (60)(Fig 3).



Andreza Urba et. al., demuestran como algunos AINEs como el ibuprofeno, el ácido acetilsalicílico y la indometacina pueden tener esta capacidad antifúngica pues en su estudio demuestran que tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. albicans* de manera dependiente de la dosis. De igual manera en otro estudio publicado por Pina-Vaz et al., se ha comprobado que a dosis altas, el ibuprofeno provoca un efecto fungicida al dañar la célula membrana de *C. albicans*, mientras que a dosis bajas sólo tiene un efecto fungistático in vitro.(61) Al igual que en el tratamiento de las infecciones por *C. albicans* con el inhibidor de la COX indometacina ha demostrado su reducción significativa en la viabilidad de los organismos y la producción de prostaglandinas, lo que sugiere que una enzima COX esencial podría ser responsable de la síntesis de prostaglandinas fúngicas. (22).

## 1.10 Diclofenaco y sus propiedades antimicrobianas

El Diclofenaco es un fármaco inhibidor relativamente no selectivo de la ciclooxigenasa y miembro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Presenta la siguiente fórmula química:  $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ , (Fig. 4). El mecanismo de acción consiste en evitar la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX). Posee una preferencia baja a moderada a bloquear la isoenzima COX<sub>2</sub>. Existen evidencias de que el diclofenaco inhibe las funciones de la lipooxigenasa, por lo que reduce la formación de leucotrienos.

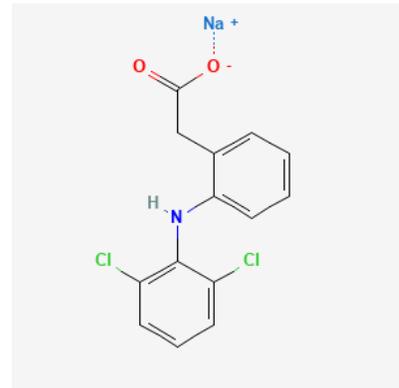


Fig. 4. Estructura química del Diclofenaco

Annadurai S et al., 1998 evalúa en su estudio la propiedad antimicrobiana de diez fármacos antiinflamatorios que se probaron con once bacterias sensibles pertenecientes a los tipos Gram positivo y Gram negativo. Encontró que la mayoría de las bacterias eran moderadamente sensibles al diclofenaco (Dc), este compuesto se probó in vitro contra 397 bacterias, la mayoría de las cuales fueron inhibidas por el diclofenaco a un nivel de 50-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .(62) Cuando se probó in vivo, Dc a 1,5 y 3,0  $\mu\text{g}/\text{g}$  de peso corporal de una cepa suiza de ratones blancos, se observó que podía proteger significativamente a los animales desafiados con *Salmonella typhimurium* siendo los datos in vivo muy significativos ( $P < 0,001$ ). (62) El diclofenaco sódico demostró además una eliminación significativa de las bacterias patógenas desafiadas del hígado y el bazo.(62)

En otro artículo publicado por Sujata G. Dastidar et al., reporta actividad antimicrobiana del diclofenaco frente a *S. aureus* a una CMI de 50  $\text{mg}/\text{l}$ ., esto se evaluó en diversos tiempos, llegando a las 18Hrs donde ya no hubo cepas bacterianas vivas, reportando que la principal diana donde el diclofenaco atacó fue en el ADN del microorganismo, degradandolo.(63) Punto importante al momento de discutir la forma que se podría relacionar su efecto antimicrobiano con la de los antibióticos, pues todas las células bacterianas dependen de la síntesis de ADN para su crecimiento, mientras que el ARN

es necesario para la transcripción y el suministro de información de la que depende la síntesis de proteínas y diversas enzimas.(64) Por lo tanto, cualquier interferencia con la síntesis de ADN o ARN puede bloquear el crecimiento de una bacteria. Los compuestos que se unen al ADN o al ARN de tal manera que su mensaje no se puede leer, también son inhibidores, un ejemplo son las quinolonas y las fluoroquinolonas que inhiben la síntesis de ADN microbiano al bloquear la girasa de ADN.

Autores como Rafaela Pignatti et al., evaluaron la actividad antimicrobiana de la combinación de Diclofenaco con pasta de hidróxido de calcio contra un *biofilm* de *E. faecalis* y reportaron que los grupos que presentaron la adición de AINE aumentaron la efectividad de la acción antimicrobiana en el *biofilm* e interfirieron en el pH de la pasta de hidróxido de calcio. Sus resultados mostraron que las pastas de hidróxido de calcio que contenían los fármacos redujeron significativamente el porcentaje de bacterias vivas en la biopelícula, un hecho que no se observó con las pastas de hidróxido de calcio puro. En cuanto a la evaluación de los valores del pH los más bajos se encontraron para la pasta de hidróxido de calcio que contenía diclofenaco de sodio que lo disminuyó al cabo del séptimo día. Mientras que en los otros grupos fue arriba de 10.

Amin Salem y col., también estudio dicho este mismo mecanismo antibacteriano comparando el Diclofenaco con antibióticos como lo son la amoxicilina y la gentamicina que tienen la mayor actividad antibacteriana, sin embargo reportan que en cuanto a su poder antimicrobiano de dicho medicamentos probados le sigue los AINE (ibuprofeno, diclofenaco) y en comparación con el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  no se comparán ya que este no mostró actividad antibacteriana contra *E. faecalis*.(65)

Dutta et al. demostraron que la CMI del diclofenaco sódico contra 45 cepas de micobacterias es de 10-25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que es mucho mayor (5-6 veces) que la CIM de los fármacos antimicobacterianos convencionales. Se ha utilizado el Diclofenaco en *S. aureus* reportando que su MIC de Diclofenaco frente a 78 cepas de *S. aureus* es de

50 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .(66) Y se ha demostrado que logra tener buen sinergismo con otros medicamentos.(Fig 5) (66)

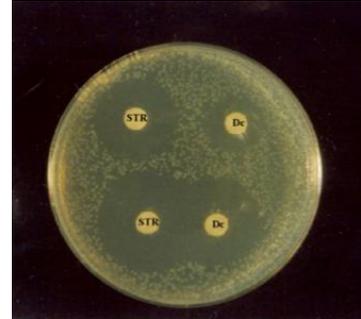


Fig. 5. Sinergismo entre estreptomicina y Diclofenaco

La acción antimicrobiana del diclofenaco sódico, el ibuprofeno y la ciprofloxacina se ha demostrado mediante el ensayo de difusión radial. (65) Por otro lado también se ha evaluado Diclofenaco en cepas de *C. albicans* que su morfología principalmente era en forma de hifas y se ha demostrado que cuando se añade diclofenaco sódico a una concentración de 500  $\text{mg}/\text{mL}$  a la suspensión celular, se puede observar la inhibición completa de la formación de tubos germinales de las cepas de *C. albicans*.(67) También se ha demostrado que las expresiones de ARNm de EFG1, CYR1 y RAS1 se reducen con 500  $\text{mg}/\text{mL}$  de diclofenaco sódico, así para las expresiones relativas de ARNm de ALS1, ALS3, CDC42 a la misma concentración. (67)Y se ha reportado que *C. albicans* en medios sólidos normalmente inducen el crecimiento filamentososo después de 5 días. Sin embargo, al estar en exposición directa con el Diclofenaco sódico resultan presentarse defectuosas para el crecimiento filamentosos presentando colonias con bordes completamente lisas y en forma de levadura en ciernes. Pues la expresión de los genes diana de EFG1 es reprimida por el diclofenaco sódico.(67) Se sugiere que el diclofenaco sódico interrumpe la vía cAMP-EFG1.

En los últimos estudios publicados sobre el efecto antimicrobiano del Diclofenaco aplicado en el área de Endodoncia es un artículo publicado por Carmen María Ferrer et al., donde se compara los efectos antibiofilm de una solución triple antibiótica (TAS); una solución antibiótica doble (DAS); y soluciones de diclofenaco (DCS) en concentraciones que iban del 5%, 2,5% y 1,25% contra un *biofilm* de *Enterococcus faecalis*. (68)Obteniendo como resultados que las soluciones de diclofenaco al 5 % y

al 2,5 % dieron el porcentaje de células viables más bajo y que los grupos de la solución triple antibiótica y doble antibiótica mostraron valores intermedios sin diferencias significativas entre ellos. Concluyendo que el diclofenaco a concentraciones de al 5% y al 2,5% tienen mayor efecto antimicrobiano que el TAS y el DAS, lo que puede llegar a considerarse una alternativa válida para el control de la infección de los dientes con periodontitis apical.(68)

## 2 JUSTIFICACIÓN

Estudios han informado que las bacterias pueden permanecer viables dentro del conducto radicular incluso después de una preparación quimiomecánica completa y por lo tanto, disminuir la probabilidad del éxito en el tratamiento endodóntico. Se ha demostrado que el uso de la medicación intraconducto favorece la eliminación de microorganismos persistentes, siendo el más utilizado el  $\text{Ca(OH)}_2$ , no obstante dentro del conducto radicular y en túbulos dentinarios infectados no presenta acción antimicrobiana sobre *E. faecalis*, y *C. albicans*, esto debido a los cambios químicos que sufre el  $\text{Ca(OH)}_2$  dentro de la dentina. Actualmente el medicamento intraconducto ideal no ha sido encontrado, por lo que es importante buscar nuevas opciones terapéuticas, que nos ayuden a resolver dichos problemas. El uso de medicamentos como los AINE's, recientemente se han propuesto como alternativa a las desventajas que poseen los antibióticos, se ha reportado que presentan actividades antimicrobianas y antifúngicas. Uno de ellos es el Diclofenaco sódico, un medicamento ciertamente de uso analgésico pero con propiedades bactericidas y potencializador de otros antibióticos, el usar este medicamento se promueve como antimicrobiano para la eliminación de microorganismos persistentes y resistentes al hidróxido de calcio, el comprobar tal efecto, puede llegar a revolucionar el empleo del mismo como medicación intraconducto y colateralmente llegar a poder obtener otros beneficios en la terapia endodóntica.

Además es de relevancia clínica si se demuestra que dicho medicamento tiene potencial antimicrobiano sobre un biofilm de patógenos aislados comúnmente en el fracaso endodóntico; ya que al ser colocado como medicación intraconducto en tratamientos con falló en la terapia endodóntica por la persistencia de *E. faecalis* y *C. albicans* puede mejorar el pronóstico del diente antes de tomar la decisión de realizar algún otro tratamiento como cirugía apical, recordando que uno de los objetivos principales de la terapia endodóntica es la prevención y control de infecciones perirradiculares para así lograr una cicatrización del área periradicular, aunado a esto en casos de pacientes con odontalgia y diagnóstico pulpar de pulpitis irreversible sintomática que implique mas de una sesión puede ser una opción.

## 2.1 Pregunta de investigación

1. ¿El Diclofenaco Sódico tiene actividad antimicrobiana sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana del Diclofenaco sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Establecer la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del Diclofenaco sobre *E. faecalis*.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del Diclofenaco sobre *C. albicans*.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del Diclofenaco sobre un cultivo mixto de *C. albicans* y *E. faecalis*.
- Determinar el efecto antimicrobiano del Diclofenaco Sódico sobre un Biofilm mixto de *E. faecalis* y *C. albicans* a 30 días por MEB.

## 4 HIPÓTESIS

### ***Hipótesis I:***

El Diclofenaco Sódico presenta actividad antimicrobiana sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis*, y *Candida albicans*.

### ***Hipótesis 0:***

El Diclofenaco Sódico no presenta actividad antimicrobiana sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis*, y *Candida albicans*.

## **5 METOLOGÍA**

### **5.1 Lugar de realización:**

- Preclínica de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.
- Laboratorio Multidisciplinario de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.
- Doctorado de Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatología, UASLP.

### **5.2 Tipo de Investigación: Mixta Diseño de estudio: Experimental *In vitro*.**

### **5.3 Criterios de selección**

#### **5.3.1 Criterios de inclusión:**

- Raíces rectas
- Raíces intactas

#### **5.3.2 Criterios de exclusión:**

- Raíces con calcificación
- Raíces con anatomía aberrante
- Raíces con ápice abierto
- Raíces con más de un conducto
- Raíces con tx endodóntico previo
- Raíces con reabsorción radicular
- Raíces con fractura de instrumentos

#### **5.3.3 Criterios de eliminación:**

- Muestras contaminadas
- Raíces sin formación del Biofilm
- Muestras mal procesadas

## 5.4 Definición Conceptual y operacional de las Variables

### 5.4.1 Independiente

#### Diclofenaco Sódico

Conceptual: Es un fármaco inhibidor relativamente no selectivo de la ciclooxigenasa y miembro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El mecanismo de acción consiste en evitar la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX).

Operacional: Se pesan diferentes gramajes de Diclofenaco sódico en la balanza analítica, se preparan tubos de ensayo con Diclofenaco a distintas concentraciones disuelto en agua destilada estéril. Para posteriormente colocarse como medicación intraconducto.

Escala de medición: Continua de Razón

### 5.4.2 Dependiente

#### UFCs/mL

Conceptual: Es definida como la concentración menor de antimicrobiano que elimina el 99% o más de los microorganismos de un cultivo después de un tiempo determinado de incubación.

Operacional:

En placas de agar de medio de cultivo específico para *E.faecalis* y *C. albicans* se inoculan 100 µL del post de los dos grupos: Experimental y control por 24 Hrs a 35°C ± 2°C en la estufa bacteriológica Felisa® y posteriormente se realiza el conteo de colonias.

Escala de Medición: Continua de Razón

#### Biofilm Mixto

Conceptual: Se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

Operacional: En dos matraces Erlenmeyer con caldo mixto de *E.faecalis* y *C. albicans* se colocan 10 raices en cada matraz y se inocula *E.faecalis* y *C. albicans* en una proporción de 1:2 y se realizan recambios del medio de cultivo cada 48 Hrs por 30 días.

Escala de Medición: Dicotomica

## 5.5 Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación antibacteriana se realizaron en el programa estadístico IBM SPSS STATISTICS Versión 23 (SPSS para Windows; SPSS inc, Chicago, IL) donde se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para la normalidad y homogeneidad de varianzas. Se calculó la media de los valores de log 10 CFU/mL y la desviación estándar y se utilizó la prueba de t de student para la comparación de medias. El índice de confianza fue del 95%. Todos los valores se representan a través de estadística descriptiva, utilizando gráficas y tablas, que muestran las medidas de tendencia central y variabilidad.

## 5.6 Consideraciones éticas

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Maestría en Endodoncia, siguiendo todos los procedimientos y lineamientos de bioseguridad, bajo los protocolos COVID establecidos por la Facultad de Estomatología de la UASLP, con el apoyo y supervisión de los profesores responsables del proyecto, que fué aprobado por el comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología, UASLP con la clave..... Los residuos peligrosos biológico-infecciosos generados, fueron manejados y dispuestos, según lo indica el reglamento que rige el laboratorio multidisciplinario de la institución, que a su vez esta basado en la Norma Oficial Mexicana, en el apartado NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de protección ambiental, salud ambiental, residuos biológico infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. Este proyecto tiene un grado de riesgo I, de acuerdo con el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. El financiamiento de este proyecto fue a cargo de CONACYT y recursos propios del posgrado.

## 5.7 Técnica o Fase experimental

La fase experimental se dividió en las siguientes Etapas:

### Fase 1. Preclínica

- Estandarización del conducto.
- Limpieza y esterilización.

### Fase 2. Microbiológica

- Reactivación de las Cepas.
- Preparación de medios de cultivos específicos.
- Acción en ampulla vs *E. faecalis*, *C. albicans* y cultivo mixto.
- Determinación de la CMI – CMB del Diclofenaco a concentraciones de 5%, 2.5%, 1.25%
- Formación del Biofilm (Método flujo laminar por 30 días).
- Conteo de UFC's pre y post operatorio.

### Fase 3. Observación Microscópica

- Observación en el Microscopio Electrónico de Barrido.
- Observación en el Microscopio Estereoscópico.

## FASE 1. PRECLÍNICA

### a) Estandarización del conducto:

Las raíces fueron lavadas de forma manual con una solución de NaOCl al 0.05%, posteriormente las raíces fueron estandarizadas a una longitud de 10-12 mm (Fig. 6) con la ayuda de un vernier. Se seccionó la corona de cada diente con un disco de diamante y con la ayuda de una pieza de baja velocidad, se patentizaron los conductos radiculares con limas K#10 y K#15 de 21mm (Dentsply Maillefer) y se amplió el ápice a 0.35mm con una lima rotatoria Medium de 21mm (35/06, WaveOne® Gold).

### b) Limpieza y esterilización.

A las muestras se les realizó el protocolo de Haapasalo NaOCl al 5.25%, Agua destilada, EDTA 17% (todos por 4 min), se colocaron las raíces en bolsas para esterilizar (5 1/4x11) y se metieron a la autoclave a 121°C a 14 lbs de presión durante 20 min. Finalmente las raíces se mantuvieron almacenadas hasta su uso (Fig. 7).



Fig. 6 Raíces estandarizadas a longitud de 10-12mm



Fig. 7 Piezas almacenadas hasta su uso

## FASE 2. MICROBIÓLOGICA:

### a) Reactivación de las Cepas.

A partir del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Maestría en Endodoncia de la U.A.S.L.P., se seleccionarán cepas de *E. faecalis* y *C. albicans*.



Fig. 8 *E. faecalis*

Se realizó un cultivo de las cepas en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) y caldo de Dextrosa Sabouraud (DS) respectivamente y se incubaron durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®. Posterior a esto se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo.



Fig. 9 *C. albicans*

De los tubos de ensayo que contenían las cepas ya activadas, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo respectivamente y se colocaron en una placa de agar de Infusión Cerebro Corazón (BHI) para *E. faecalis* (Fig. 8) y en una placa de agar de Dextrosa Sabouraud (DS) para *C. albicans* (Fig. 9) y se incubaron durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica

Felisa®.

### b) Preparación de medios de cultivos específicos.

Se realizaron los medios de cultivo en caldo de Infusión Cerebro Corazón (Fig. 11) en base a la siguiente fórmula: 1000mL – 37g/50mL, para los medios de cultivo en caldo de Dextrosa Saboraud:1000mL – 30g/50mL. Para los medios de cultivo en agar de Infusión Cerebro Corazón (Fig.10) se utilizó la siguiente fórmula: 1000mL – 52g/400mL, para los medios de cultivo en agar de Dextrosa Saboraud: 1000mL – 65g/400mL. Y finalmeto los medios de cultivo en caldo y agar mixto de BHI-DS se realizaron en base a las previas fórmulas ya mencionadas pero en una proporción BHI-DS (2:1)



Fig. 10 Medio de cultivo para la preparación de agares (BHI, DS y BHI-DS)

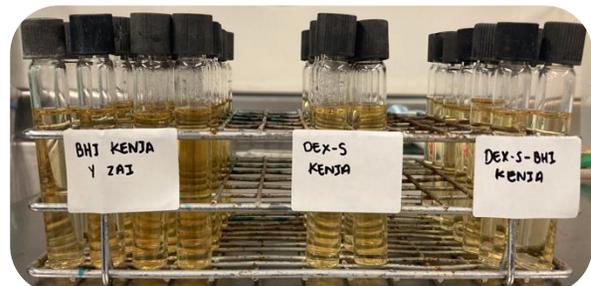


Fig. 11 Medio de cultivo ya preparado en caldo (BHI, DS y BHI-DS)

Teniendo preparados previamente los medios de cultivo con su proceso de esterilización, se vertieron en los tubos de ensayo los caldos y los agares en cajas petri esterilizadas bajo la campana de flujo laminar (Labconco®), se dejaron enfriar, se emplearon y se metieron al refrigerador para su posterior uso.

### c) Exposición de la Ámpula Diclofenaco sódico contra *E. faecalis*, *C. albicans* y cepas mixtas

Antes de que llegara la sustancia activa; se decidió probar la Ámpula del medicamento Diclofenaco Sódico que contenía una solución de 75mg/3mL.

1. En tubos de ensayo previamente estériles con puntas para micropipetas se colocó 1mL de la ámpula del Diclofenaco Sódico, seguido de 1mL de *E. faecalis* con exposición directa de 1:1. Lo mismo se realizó para *C. albicans* y después para el mixto de *E. faecalis* y *C. albicans* (Fig. 12). Y se midió el tiempo de exposición a la 1H, 2Hrs y 24Hrs de todas las muestras.



Fig. 12 Exposición directa 1:1 de los microorganismos: *C. albicans*, *E. faecalis* y Mixto

2. Para el grupo control negativo en tubos de ensayo previamente estériles se colocó con puntas para micropipetas 1mL de NaOCl al 5.25%, y 1mL de cada espécimen según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto.
3. Para el grupo control positivo en tubos de ensayo previamente estériles se colocó 1mL de agua destilada estéril y 1mL de cada espécimen según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto.
4. Cuando pasó la hora se tomó 100µL de cada tubo y se colocaron en placas de agar de BHI, DS y BHI-DS con la ayuda de un asa en L y se realizó la siembra, cada uno con su respectivo

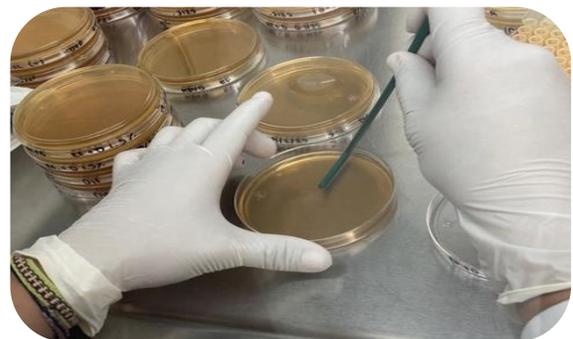


Fig. 13 Siembra en placas de agar de los microorganismos: *C. albicans*, *E. faecalis* y Mixto

microorganismo; *E. faecalis* para BHI, *C. albicans* para DS y mixto para BHI-DS (Fig. 13) y se incubaron todas las muestras en la estufa bacteriológica Felisa® durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Así mismo cuando pasaron 2Hrs y 24Hrs. Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®). Esto se realizó por triplicado.

**d) Conteo de UFC's:**

1. A las 24 Hrs se realizó la tinción Gram de cada placa de agar y se realizó el conteo de UFC's mediante el contador de colonias (Felisa®) de cada placa de agar incubada (Fig. 14).



Fig. 14 Contador de colonias (Felisa®)

Al analizar los componentes de la Ámpula del Diclofenaco Sódico surgió la duda de su capacidad antimicrobiana por el alcohol bencílico que contiene, por lo cual para evitar errores o sesgos se decidió analizar este componente y hacer lo mismo una exposición de 1:1 sobre *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto.

**e) Exposición del Alcohol Bencílico contra *E. faecalis*, *C. albicans* y cepas mixtas**

1. En tubos de ensayo previamente estériles se colocó con puntas para micropipetas 1mL de alcohol bencílico y se le añadió 1mL de *E. faecalis* con exposición directa de 1:1. El mismo procedimiento se realizó para *C. albicans* con exposición directa de 1:1 y el cultivo mixto de *C. albicans* y *E. faecalis* (Fig. 15).
2. Para el grupo control negativo se colocó 1mL de NaOCl al 5.25%, y 1mL de cada espécimen según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto. Y finalmente para el grupo control positivo se colocó 1mL de agua destilada estéril y 1mL de cada espécimen

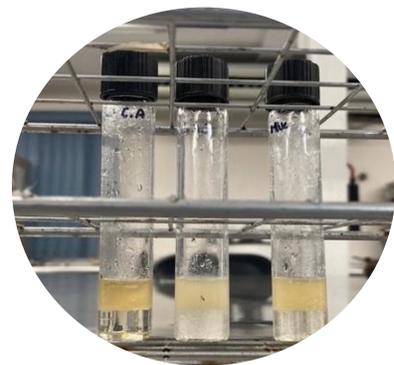


Fig. 15 Alcohol Bencílico exposición 1:1, *E. faecalis*, *C. albicans*, Mixto

según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto. Y se incubaron los dos controles durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®). Y se incubaron las muestras

- Después de las 24Hrs se tomó 100µL de cada muestra los cuales se colocaron en placas de agar, con la ayuda de un asa en L se realizó la siembra (Fig. 16), cada uno con su respectivo microorganismo; *E. faecalis* para BHI, *C. albicans* para DS y mixto para BHI-DS. Se incubaron todas las muestras en la estufa bacteriológica Felisa® durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®). Esto se realizó por triplicado.

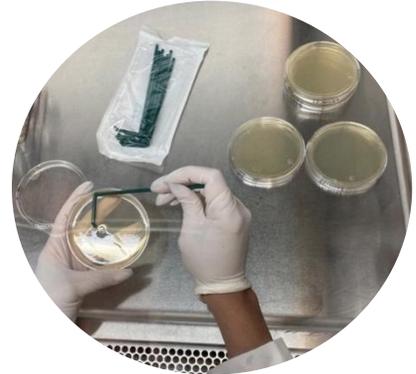


Fig. 16 Siembra a las 24 Hrs

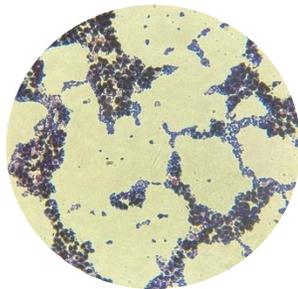


Fig. 17 Tinción Gram; *E. faecalis* + *C. albicans*.

#### f) **Conteo de UFC's:**

1. A las 24Hrs se realizó la tinción Gram (Fig. 17) de cada placa de agar y se realizó el conteo de UFC's mediante el contador de colonias (Felisa®) de cada placa de agar incubada.

- g) Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida por el método de dilución en caldo de la sustancia activa del Diclofenaco Sódico.**

En este estudio, se buscó la CMI y CMB por medio de la técnica de macrodilución.

#### h) **Preparación de la Medicación del Diclofenaco Sódico**

- Se pesaron diversos gramajes de la sustancia activa del Diclofenaco en la balanza analítica (Fig. 20) al 5% (200mg), 2.5% (100mg), 1.25% (50mg), 0.625% (25mg), 0.312% (12.5mg).



Fig. 20 Balanza Analítica



Fig. 21 Sustancia activa del Diclofenaco Sódico en diferentes concentraciones: 5%, 2.25% y 1.25%

2. En tubos de ensayo previamente estériles se colocó 1mL de agua destilada estéril y los diferentes gramajes por tubo del Diclofenaco Sódico. Cada tubo de ensayo que contenía la medicación se colocó en un Analog Vortex Mixer (Thomas Scientific) (Fig. 22) para formar una solución homogénea (Fig. 23).
3. Se prepararon los tubos de ensayo con sus respectivas cepas para cada muestra, *E. faecalis*, *C. albicans* y Mixto en una escala de Mc. Farland de 0.5 ( $1 \times 10^8$ ) (Fig. 24). Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®).

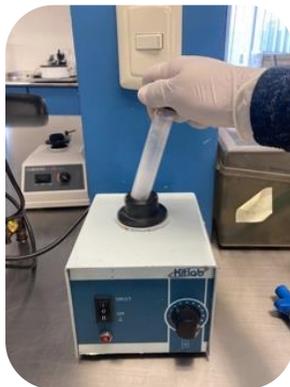


Fig. 22 Dilución del Diclofenaco en agua destilada para la obtención de una mezcla homogénea.

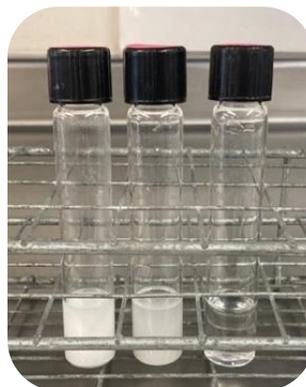


Fig. 23 Diclofenaco + Agua destilada al 5%, 2.5% y 1.25%



Fig. 24 Inoculo ajustado al 0.5 en escala de McFarland ( $1 \times 10^8$ )

4. En tubos de ensayo previamente estériles se colocó 1mL de la mezcla del Diclofenaco Sódico ya preparado a diversas concentraciones, 1mL de caldo de BHI y 100µL de *E. faecalis*. Para *C. albicans* fue 1mL de DS y 100µL de *C.*

*albicans*. Y para el mixto fue 100µL de *C. albicans* y *E. faecalis* con 1mL de BHI-DS (Figs. 25-27). Esto se realizó por triplicado.



Fig. 25 Exposición *C. albicans*, *E. faecalis*, Mixto + Diclofenaco al 5% respectivamente

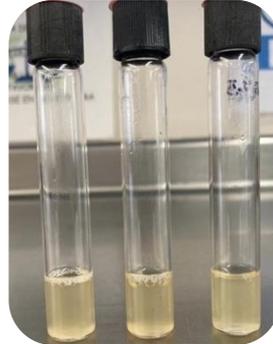


Fig. 26 Exposición *C. albicans*, *E. faecalis*, Mixto + Diclofenaco al 2.5%

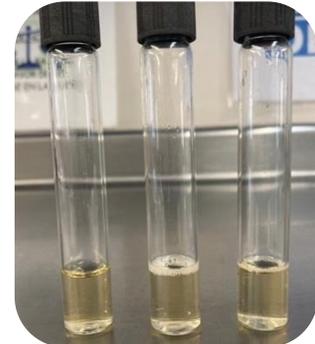


Fig. 27 Exposición *C. albicans*, *E. faecalis*, Mixto + Diclofenaco al 1.25%

5. Para el grupo control negativo en tubos de ensayo previamente estériles se colocó con puntas para micropipetas 1mL de NaOCl al 5.25%, y 100µL de cada espécimen según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto. Y Para el grupo control positivo fue 1mL de agua destilada estéril y 1mL de cada espécimen según su grupo: *E. faecalis*, *C. albicans* y mixto. Se incubaron todas las muestras durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todo se realizó bajo la campana de flujo la minar (Labconco®).

4. Pasadas las 24 Hrs se tomó 100µL de cada tubo y se colocaron en placas de agar de BHI, DS y BHI-DS con la ayuda de un asa en L y se realizó la siembra, cada uno con su respectivo microorganismo; *E. faecalis* para BHI, *C. albicans* para DS, mixto para BHI-DS y sus grupos controles, se incubaron todas las muestras en la estufa bacteriológica Felisa® durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®).

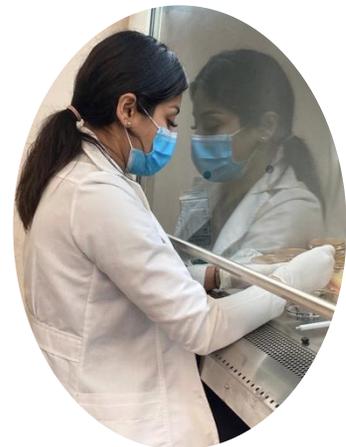


Fig. 28 Siembra a las 24Hrs en campana de flujo laminar

**i) Conteo de UFC's:**

1. A las 24Hrs se realizó la tinción Gram de cada placa de agar y se realizó el conteo de UFC's mediante el contador de colonias (Felisa®) de cada placa de agar incubada (Figs. 28-30)

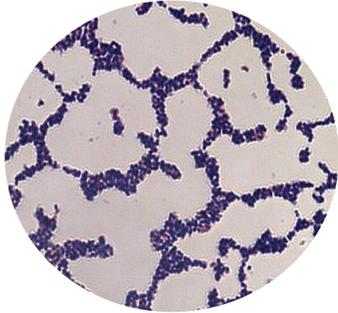


Fig. 28 E.



Fig. 29 C. albicans

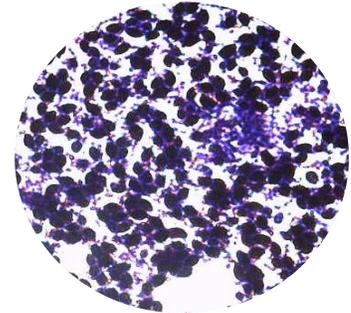


Fig. 30 E. faecalis + C. albicans

**j) Formación del biofilm**

**GRUPO DE ESTUDIO**

	Medicación	N= de muestra	Formación de Biofilm	Concentración
Grupo A	S/Diclofenaco	10	30 días	5%
Grupo B	Diclofenaco	10	30 días	5%
Grupo C (-)	Estéril	5	-	-

1. En dos matraces Erlenmeyer de 500mL que contenían medio de cultivo en caldo estéril de Dextrosa Saboraud con Infusión Cerebro Corazón, cada uno destinado para el grupo A (Control) y el grupo B (Experimental) se procedió a colocar las raíces esterilizadas y se inocularon ahí mismo las cepas de *C. albicans* y *E. faecalis* en una proporción 2:1 de las cepas ya reactivadas anteriormente, se sellaron los matraces. Las raíces para el control

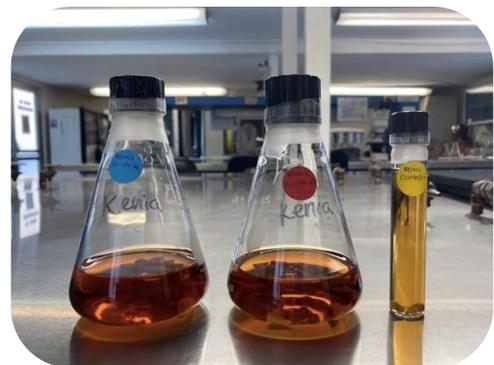


Fig. 33 Medios de cultivo con sus raíces correspondientes y con inoculación de *C. albicans* y *E. faecalis*

negativo se colocaron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo en caldo BHI-DS previamente estéril y de igual manera se sellaron ambos tubos (Fig. 33).

2. Todos los grupos tanto A, B y el grupo control negativo se incubaron durante 48Hrs a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®.

3. Pasadas las 48Hrs se realizaban los recambios de los medios de cultivo en caldo, todo esto durante 30 días para lograr la formación de un *biofilm* maduro. Todo se realizó bajo la campana de flujo laminar (Labconco®).



Fig 34 Realización de tinción Gram

4. Se realizaban tinciones Gram después de cada recambio (Figs. 34-36)

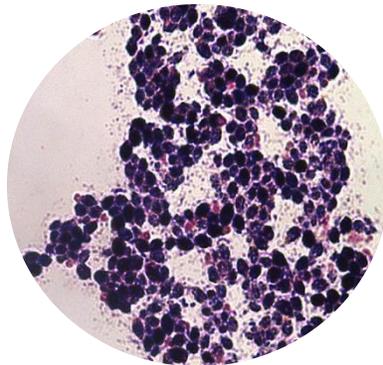


Fig. 35 Tinción Gram del Grupo Control: *E. faecalis* + *C. albicans*.

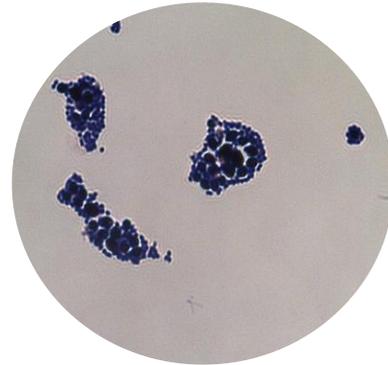


Fig. 36 Tinción Gram del Grupo Experimental: *E. faecalis* + *C. albicans*.

### **k) Elaboración de la medicación intraconducto del Diclofenaco Sódico**

1. De la sustancia activa del Diclofenaco se pesó en la balanza analítica una concentración del 5% (200mg).
2. En tubos de ensayo previamente estériles se colocó 1mL de agua destilada estéril y los diferentes gramajes por tubo del Diclofenaco Sódico. Cada tubo de

ensayo que contenía la medicación se colocó en un Analog Vortex Mixer (Thomas Scientific) para formar una solución homogénea (Fig. 37)



Fig. 37 Tubos con medicación en Analog Vortex Mixer (Thomas Scientific) para formar una mezcla homogénea.

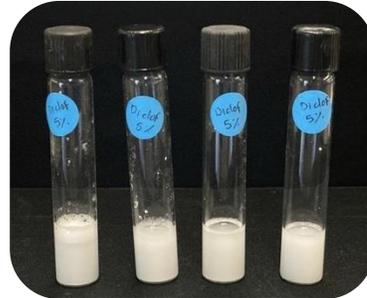


Fig. 38 Diclofenaco al 5%

## I) Toma de Muestra Preoperatorio

1. Se sacaron las raíces de cada Matraz Erlenmeyer (Fig. 39) y se lavaron con solución salina estéril (Fig. 40).



Fig. 39 Medios de cultivo con raíces inoculadas durante 30 días para la formación del biofilm de *E. faecalis* y *C. albicans*



Fig. 40 Se lavan las raíces con solución salina estéril

2. Se colocaron tanto las raíces del grupo A como el grupo B en una repiza adaptada para la posición de las mismas, previamente desinfectada.

3. Se colocó el campo operatorio; un aislamiento absoluto (Fig. 41), se desinfectó dique del centro a la periferia con una torunda de algodón con NaOCl al 5.25% por 1min. Después, se colocó el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% con una torunda de algodón por 1min. Posterior al paso anterior se utilizó Tiosulfato de Sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) al 10%, con una torunda de algodón y se colocó en el campo operatorio de igual manera del centro a la periferia, con la finalidad de desactivar las soluciones pasadas.



Fig. 41 Materiales requeridos para la toma de muestra con aislamiento absoluto



Fig. 42 Toma de muestra PRE Medicación

4. Se realizó la toma de muestra con puntas estériles del #35, 3 puntas por raíz durante 30" cada punta dentro del conducto. Esto se realizó en todas las muestras de ambos grupos (Fig. 42).

5. Las puntas se colocaron en medio de cultivo mixto estéril (Figs. 43 y 44) y se incubaron durante 24H a 35°C ± 2°C en la estufa bacteriológica Felisa®.



Fig. 43 Toma de muestra, Puntas premedicación en caldo mixto de BHI-DS, Grupo A

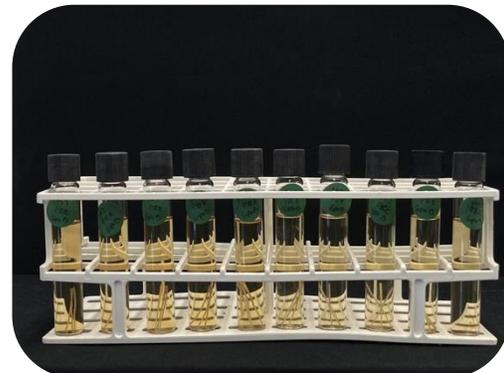


Fig. 44 Toma de muestra, Puntas premedicación en caldo mixto de BHI-DS, Grupo B

- Posteriormente se sellaron los ápices de todas muestras con cianocrilato para evitar la filtración del medicamento. Y se volvieron aislar las raíces del grupo A (Control) y con una jeringa hipodérmica estéril se colocó solución salina, se seguido de algodón estéril y provisit (Fig. 46). De igual manera se aislaron las raíces del grupo B (Experimental) y con una jeringa hipodérmica estéril se colocó dentro del conducto la medicación del Diclofenaco (Fig. 45), seguido de algodón y provisit.



Fig. 45 Colocación del Diclofenaco intraconducto



Fig. 46 Colocación de Provisit como barrera protectora durante las 24Hrs de incubación.

- Ambos grupos se incubaron en humedad (Fig. 47) durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®.

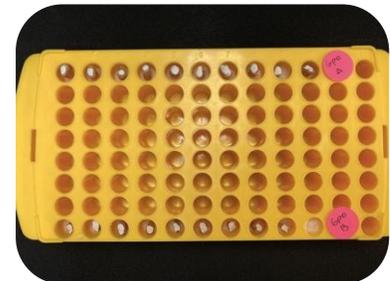


Fig. 47 Se incubaron las muestras en presencia de humedad con algodón húmedo

### m) Toma de Muestra Postoperatorio



Fig. 48 Toma de muestra POST Medicación

- Se colocaron tanto las raíces del grupo A como el grupo B en una repiza adaptada para la posición de las mismas, previamente desinfectada. Se colocó el campo operatorio; un aislamiento absoluto, se desinfectó el dique como ya se mencionó anteriormente. Se realizó la remoción del provisit del grupo A y se procedió a la toma de

muestra con puntas estériles del #35 (Fig. 48), 3 puntas por raíz durante 30" cada punta dentro del conducto. De igual manera esto se realizó en todas las muestras del grupo B.

2. Las puntas se colocaron su respectivo medio de cultivo mixto estéril (Figs 49-50) y se incubaron durante 24H a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®.

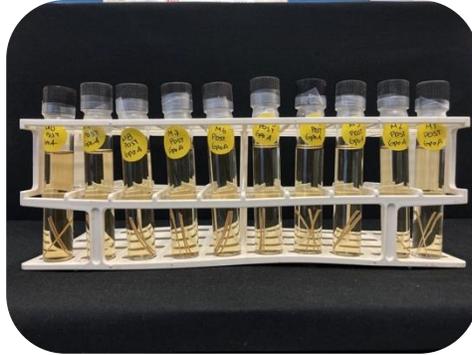


Fig. 49 Toma de muestra PRE del grupo control

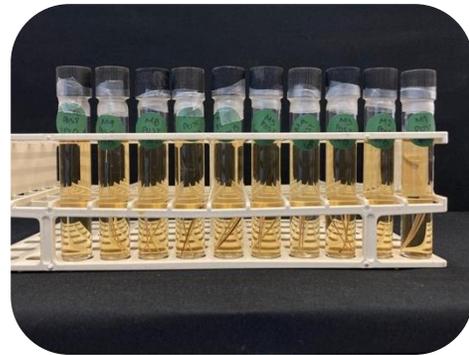


Fig. 50 Toma de muestra PRE del grupo Experimental

3. Pasadas las 24Hrs de la toma de muestra PRE medicación se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a la dilución  $1:10 = 10^{-9}$  (Fig. 51-53). Y se hizo la descarga en las placas de agar mixto de cada tubo de ensayo de ambos grupos y se incubaron por 24Hrs a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®.



Fig. 52 Grupo Control, después de las 24Hrs de su incubación

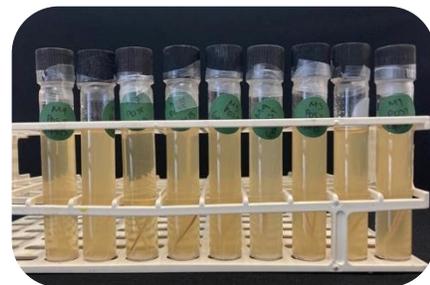


Fig. 53 Grupo Control, después de las 24Hrs de su incubación



Fig. 51 Realización de las diluciones seriadas PRE del Grupo: Control, Grupo Experimental  $1 \times 10^{-9}$

4. Pasadas las 24Hrs de la toma de muestra POST medicación se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$  (Fig. 54). Se hizo la descarga en las placas de agar mixto de cada tubo de ensayo de ambos grupos y se incubaron por 24Hrs a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la estufa bacteriológica Felisa®. Todo lo Anterior se realizó por Triplicado.



Fig. 54 Realización de las diluciones seriadas del Grupo: Control, Grupo Experimental  $1 \times 10^{-9}$

#### n) Conteo de UFC's

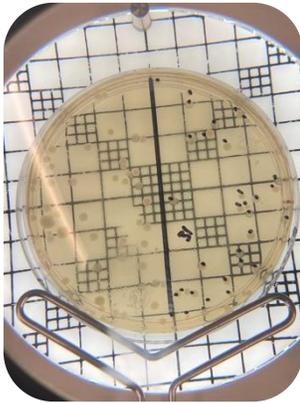


Fig. 55 Conteo de colonias del grupo Experimental POST colocación del Diclofenaco

1. Pasadas las 24Hrs de la toma de muestra PRE medicación intraconduto se realizaron las tinciones Gram de cada placa de agar y se realizó el conteo de UFC's mediante el contador de colonias (Felisa®).
2. Pasadas las 24Hrs de la toma de muestra POST medicación intraconduto se realizaron las tinciones Gram de cada placa de agar y se realizó el conteo de UFC's mediante el contador de colonias (Felisa®) (Fig. 55).

### FASE 3. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

#### a) Observación al Microscopio Estereoscópico

1. Se realizó el corte de las raíces corono-apical (Fig. 56) para seleccionar las muestras para la visualización del Microscopio Estereoscópico y MEB. Esto se realizó con la ayuda de un cincel y martillo.



Fig. 56 Raíces cortadas corono-apical para su posterior preparación para su visualización en el MEB

2. Se seleccionaron las muestras y se observaron al Microscopio Estereocópico y se tomaron sus respectivas fotografías.

### b) Observación al Microscopio Electrónico de Barrido

1. Se fijaron las muestras en Glutaraldehído + Azul de alcian (Fig. 57) y se guardan a 4°C por 24Hrs. Pasadas las 24 Hrs se realizó la deshidratación en alcoholes crecientes: 20%, 40%, 60%, 80%, 90% por 10 min (Fig. 58). Se llevan las muestras a secado punto crítico.



Fig. 57 Tubos Eppendorf con Glutaraldehído + azul de alcian



Fig. 58 Tubos Eppendorf con Glutaraldehído + azul de alcian

2. Se realizó un recubrimiento de oro; las muestras fueron colocadas y selladas con cinta de carbón en dispositivos de lectura con placas de doble carbón para recubrirse en oro por 2 min (Figs. 59-61) y se procede con la lectura al MEB (JEOL JMS-6510LV, Japón) bajo magnificación variable y toma de fotografías.



Fig. 59 Mitad de raíces colocadas para el baño de oro

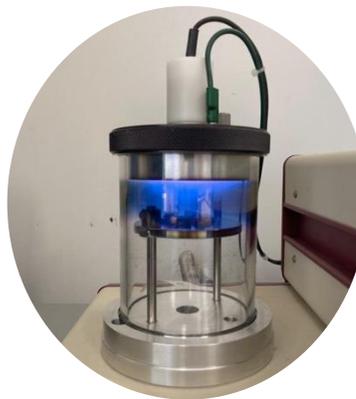


Fig. 60 SPI-MODULE™ Sputter Coater)



Fig. 61 Raíces después del baño de oro

## 6 RESULTADOS

### PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO (AMPOLLETA) CON SUS CONTROLES DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A 1 HORA DEL EXPERIMENTO



*E. faecalis* + Sol. Salina estéril: 1 H



*C. albicans* + Sol. Salina estéril: 1 H



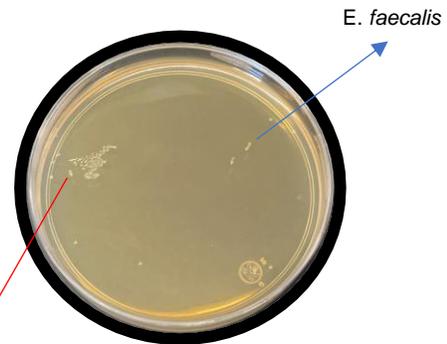
*E. faecalis* + *C. albicans* + Sol. Salina estéril: 1 H



*E. faecalis* + Diclofenaco (Amp): 1 H



*C. albicans* + Diclofenaco (Amp): 1 H



*E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco (Amp): 1 H

*C. albicans*

*E. faecalis*

### PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL HIPOCLORITO DE SODIO OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA



*E. faecalis* + Hipoclorito de Sodio



*C. albicans* + Hipoclorito de Sodio



*E. faecalis* + *C. albicans* + Hipoclorito de Sodio

PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO (AMPOLLETA) CON SUS CONTROLES DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A 2 HORAS DEL EXPERIMENTO



*E. faecalis* + Sol. Salina estéril: 2 Hrs



*C. albicans* + Sol. Salina estéril: 2 Hrs



*E. faecalis* + *C. albicans* + Sol. Salina estéril: 2 Hrs



*E. faecalis* + Diclofenaco (Amp): 2 H



*C. albicans* + Diclofenaco (Amp): 2 H



*E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco (Amp): 2 H

PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DICLOFENACO (AMPOLLETA) CON SUS CONTROLES DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A 24 HORAS DEL EXPERIMENTO



*E. faecalis* + Sol. Salina estéril: 24 Hrs



*C. albicans* + Sol. Salina estéril: 24 Hrs



*E. faecalis* + *C. albicans* + Sol. Salina estéril: 24 Hrs

Evaluación de la actividad antimicrobiana del Diclofenaco sobre un biofilm mixto



*E. faecalis* + Diclofenaco (Amp): 24 Hrs



*C. albicans* + Diclofenaco (Amp): 24 Hrs



*E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco  
(Amp): 24 Hrs

PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ALCOHOL BENCÍLICO CON SUS CONTROLES DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A 24 HORAS DEL EXPERIMENTO



*E. faecalis* + Sol. Salina estéril: 24 Hrs



*C. albicans* + Sol. Salina estéril: 24 Hrs



*E. faecalis* + *C. albicans* + Sol. Salina  
estéril: 24 Hrs



*E. faecalis* + Alcohol Bencílico: 24 Hrs



*C. albicans* + Alcohol Bencílico: 24 Hrs



*E. faecalis* + *C. albicans* + Alcohol  
Bencílico: 24 Hrs

## Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida de la Sustancia activa del Diclofenaco Sódico

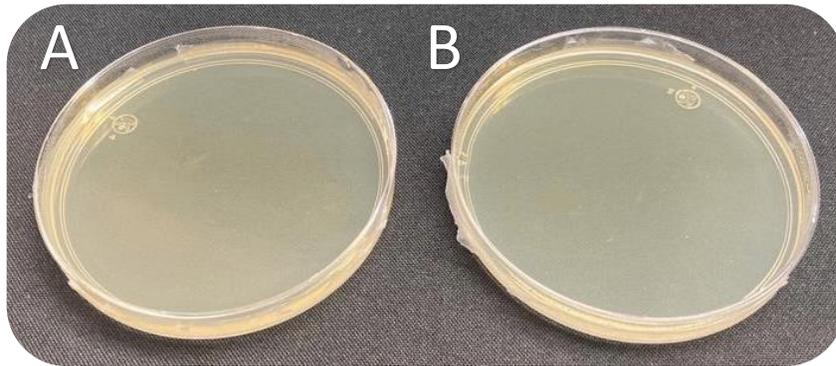


Imagen 62. A) *E. faecalis* + Diclofenaco Sódico al 5%; a las 24Hrs de exposición.  
B) *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 5%; a las 24 Hrs de exposición.

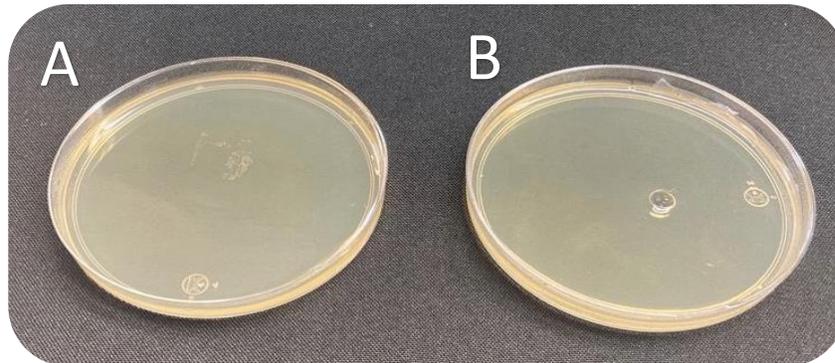


Imagen 63. A) *E. faecalis* + Diclofenaco Sódico al 2.5%; a las 24Hrs de exposición.  
B) *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 2.5%; a las 24 Hrs de exposición.

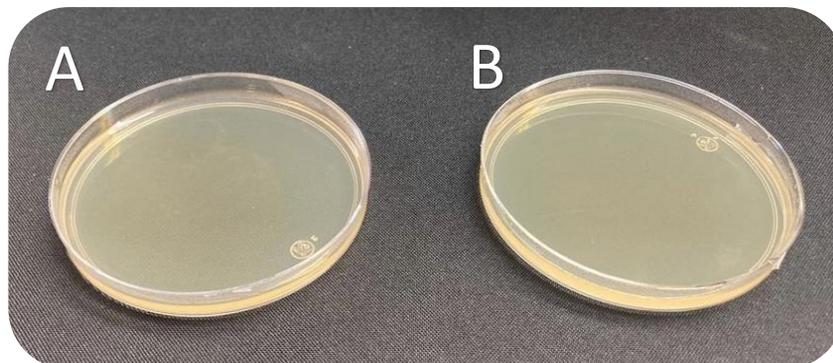


Imagen 64. A) *E. faecalis* + Diclofenaco Sódico al 1.25%; a las 24Hrs de exposición.  
B) *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 1.25%; a las 24 Hrs de exposición.



Imagen 65. A) *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 5%, B) *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 2.25%, C) *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco Sódico al 1.25%, D) *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco Sódico 0.625%

**Grupo control positivo; *C. albicans* y *E. faecalis* en biofilm**



Imagen 66. A) Toma de muestra Preoperatorio; Grupo: Control: *E. faecalis* + *C. albicans*, 24Hrs de incubación



Imagen 67. B) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Control: *E. faecalis* + *C. albicans*, 24Hrs de incubación

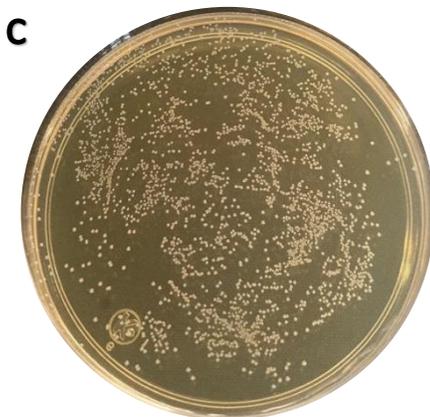


Imagen 68. C) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Control: *E. faecalis* + *C. albicans*, 24Hrs de incubación, dilución  $1 \times 10^8$

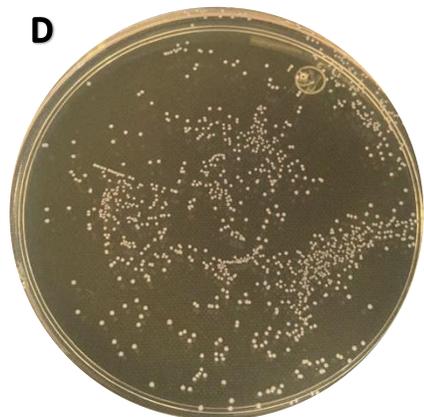


Imagen 69. D) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Control: *E. faecalis* + *C. albicans*, 24Hrs de incubación, dilución  $1 \times 10^9$

Exposición del Diclofenaco Sódico al 5% sobre *C. albicans* y *E. faecalis* en biofilm

**A**

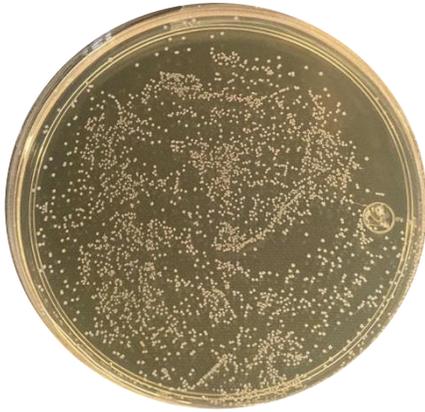


Imagen 70. A) Toma de muestra Preoperatorio; Grupo: Experimental: *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco, 24Hrs de incubación.

**B**

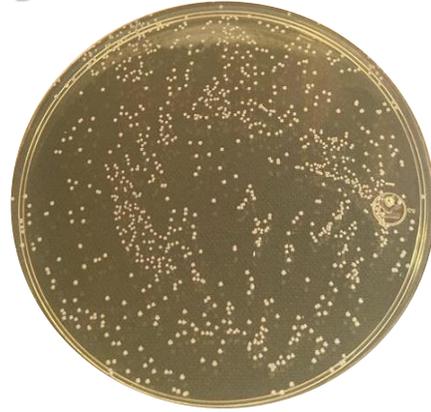


Imagen 71. B) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Experimental: *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco, 24Hrs de incubación.

**C**



Imagen 72. C) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Experimental: *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco, 24Hrs de incubación, dilución  $1 \times 10^8$

**D**

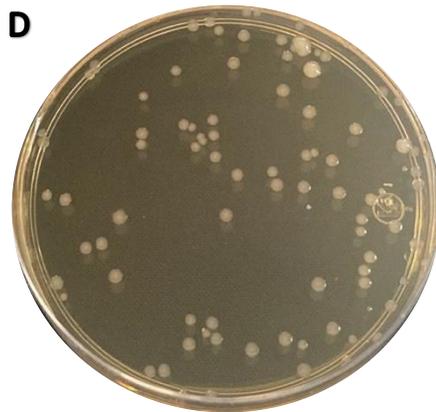


Imagen 73. D) Toma de muestra Postoperatorio; Grupo: Experimental: *E. faecalis* + *C. albicans* + Diclofenaco, 24Hrs de incubación, dilución  $1 \times 10^9$

## RECOLECCIÓN DE DATOS Y SU ANÁLISIS ESTADÍSTICO

GRUPO EXP	PRE	POST	Log Red	%	GRUPO CONTROL	PRE	POST	Log Red	%
1	11.50	10.74	0.76	82.62	1	11.55	11.24	0.31	51.02
2	11.40	10.59	0.81	84.51	2	11.22	11.56	0.00	0.00
3	11.62	10.50	1.12	92.41	3	11.23	12.47	0.00	0.00
4	11.23	10.69	0.54	71.16	4	11.20	11.07	0.13	25.87
5	11.49	10.49	1.00	90.00	5	11.18	11.00	0.18	33.93
6	11.30	10.71	0.59	74.30	6	10.50	12.51	0.00	0.00
7	11.54	10.65	0.89	87.12	7	11.45	12.46	0.00	0.00
8	11.25	10.50	0.75	82.22	8	11.27	11.26	0.01	2.28
9	11.34	10.46	0.88	86.82	9	11.29	11.30	0.00	0.00
10	11.17	10.74	0.43	62.85	10	11.36	11.34	0.02	4.50
11	11.30	10.54	0.76	82.62	11	11.65	11.34	0.31	51.02
12	11.50	10.69	0.81	84.51	12	11.42	11.76	0.00	0.00
13	11.72	10.60	1.12	92.41	13	11.23	12.47	0.00	0.00
14	11.33	10.79	0.54	71.16	14	11.20	11.07	0.13	25.87
15	11.49	10.49	1.00	90.00	15	11.18	11.00	0.18	33.93
16	11.30	10.71	0.59	74.30	16	10.70	12.71	0.00	0.00
17	11.54	10.65	0.89	87.12	17	11.45	12.46	0.00	0.00
18	11.25	10.50	0.75	82.22	18	11.27	11.26	0.01	2.28
19	11.34	10.46	0.88	86.82	19	11.29	11.30	0.00	0.00
20	11.17	10.74	0.43	62.85	20	11.36	11.34	0.02	4.50
21	11.50	10.74	0.76	82.62	21	11.65	11.34	0.31	51.02
22	11.40	10.59	0.81	84.51	22	11.22	11.56	0.00	0.00
23	11.62	10.50	1.12	92.41	23	11.23	12.47	0.00	0.00
24	11.23	10.69	0.54	71.16	24	11.20	11.07	0.13	25.87
25	11.49	10.49	1.00	90.00	25	11.18	11.00	0.18	33.93
26	11.30	10.71	0.59	74.30	26	10.50	12.51	0.00	0.00
27	11.54	10.65	0.89	87.12	27	11.45	12.46	0.00	0.00
28	11.25	10.50	0.75	82.22	28	11.27	11.26	0.01	2.28
29	11.34	10.46	0.88	86.82	29	11.29	11.30	0.00	0.00
30	11.27	10.84	0.43	62.85	30	11.36	11.34	0.02	4.50

Tabla 1. Recolección de datos de las 10 muestras estudiadas de cada grupo. En esta tabla se observan los resultados obtenidos en el conteo de UFC's de la toma de muestra Pre y Post operatorio de ambos grupos; Por triplicado.

## PRUEBAS DE NORMALIDAD

**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
UFC Log Reduction	.147	60	.095

Tabla 2. Correlación de significación de Lilliefors.  
 p=0.095 (Distribución normal)  
 Datos paramétricos

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba t para la igualdad de medias						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
UFC Log Se Reduction asumen varianzas iguales	- 95.109	58	.001	-10.84400	.11402	- 11.07223	- 10.61577
No se asumen varianzas iguales	- 95.109	35.870	.001	-10.84400	.11402	- 11.07526	- 10.61274

Tabla 3. P=0.001 Representa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos. Es decir, el grupo del Diclofenaco Sódico tuvo mayor eliminación de microorganismos en comparación al grupo Control (+).

## ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

	Grupo		Estadístico
UFC Log Reduction	Diclofenaco	Media	.7770
		Desviación estándar	.20454
		Mínimo	.43
		Máximo	1.12
	Control	Media	0.065
		Desviación estándar	0.104
		Mínimo	0.00
		Máximo	0.31

Tabla 3. Para el grupo del Diclofenaco la media fue de .7770 con una desviación estándar de .20454, el valor mínimo que se obtuvo para este grupo fue de .43 y el máximo de 1.12. Para el grupo Control (+) la media fue de 0.065 con una desviación estándar de 0.104, el valor mínimo que se obtuvo para este grupo fue de 0.00 y el máximo de 0.31.

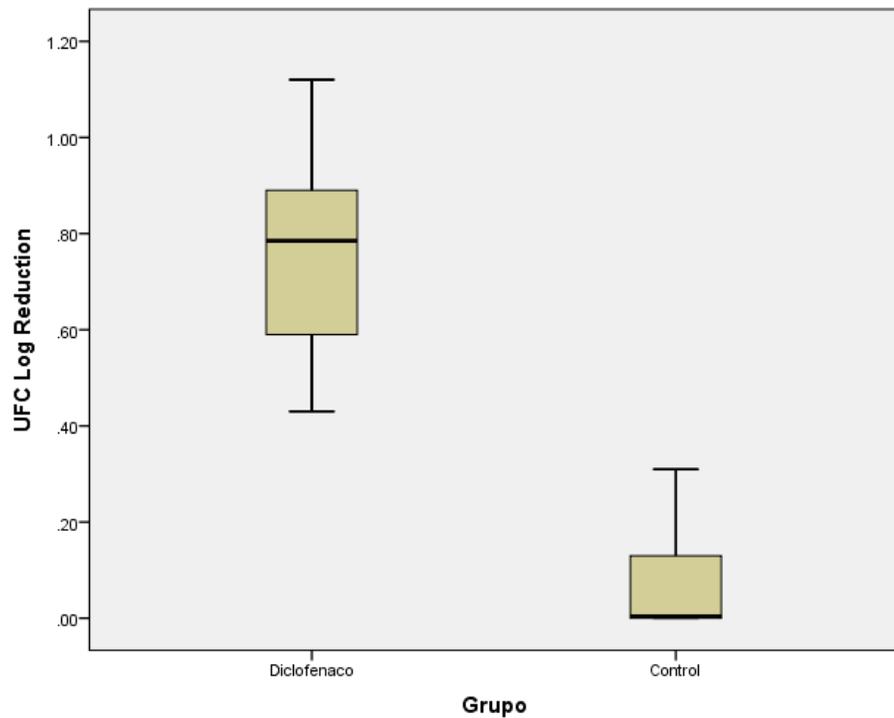


Gráfico 1. Representa la Media de los datos

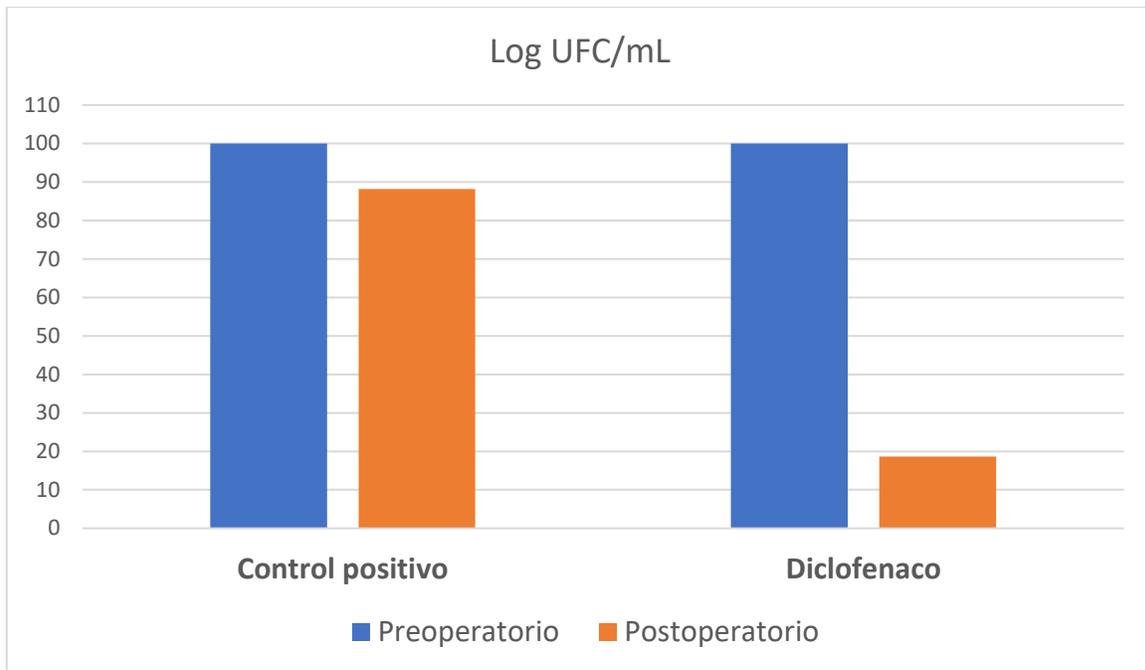


Gráfico 3. En está gráfica se ven representado en porcentajes la cantidad de microorganismos pre y postoperatorio. El preoperatorio del Diclofenaco arroja de todos los valores un total de 11.391%, y del postoperatorio un 10.614% lo que equivale a una reducción de microorganismos a un 81.4%. En el preoperatorio del grupo control (+) arroja de todos los valores un total de 11.245% y del postoperatorio un 11.641% lo que equivale a una reducción de microorganismos a un 11.760%.

## IMÁGENES DEL MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO; GRUPO CONTROL POSITIVO POSTOPERATORIO



Fig. 1 Muestra de la porción apical del grupo control positivo, se aprecia presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico que obliteran el conducto radicular.



Fig. 2 Muestra de la porción media del grupo control positivo, se aprecia presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico, pero en mayor cantidad comparado con apical



Fig. 3 Muestra de la porción cervical del grupo control positivo, se aprecia presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico, pero en menor cantidad comparado con tercio medio y apical

## IMÁGENES DEL MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO; GRUPO EXPERIMENTAL DICLOFENACO POSTOPERATORIO



Fig. 1 Muestra de la porción apical del grupo experimental Diclofenaco, se aprecia presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico, pero en menor cantidad que el control positivo, se puede apreciar el conducto radicular y con ligeros destellos de material brillante probablemente sea el Diclofenaco.



Fig. 2 Muestra de la porción media del grupo experimental Diclofenaco, se aprecia presencia de acúmulos de material de color blanquecino en forma de sal que oblitera todo el conducto en la porción media, se puede apreciar ligeros destellos de material brillante pertenecientes al Diclofenaco, con una grieta en el centro



Fig. 3 Muestra de la porción cervical del grupo experimental Diclofenaco, se aprecia presencia de acúmulos de material de color blanquecino en forma de sal que oblitera todo el conducto, se aprecian ligeros destellos de material brillante pertenecientes al Diclofenaco, con la continuación de la grieta encontrada en la porción media.

## IMÁGENES DEL MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO; GRUPO CONTROL NEGATIVO



Fig. 1 Muestra de la porción apical del grupo control (-), se aprecia completamente el conducto radicular en la porción apical sin presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico, se observa el conducto radicular completamente limpio



Fig. 2 Muestra de la porción media del grupo control (-), se aprecia completamente el conducto radicular sin presencia de acúmulos de material orgánico, se observa el conducto radicular limpio, lo que se aprecia en el centro posiblemente sea dentina desprendida al momento de realizar el corte



Fig. 3 Muestra de la porción cervical del grupo control (-), se aprecia completamente el conducto radicular en la sin presencia de acúmulos de material orgánico e inorgánico, se observa el conducto radicular completamente limpio

## IMÁGENES DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

### CONTROL NEGATIVO

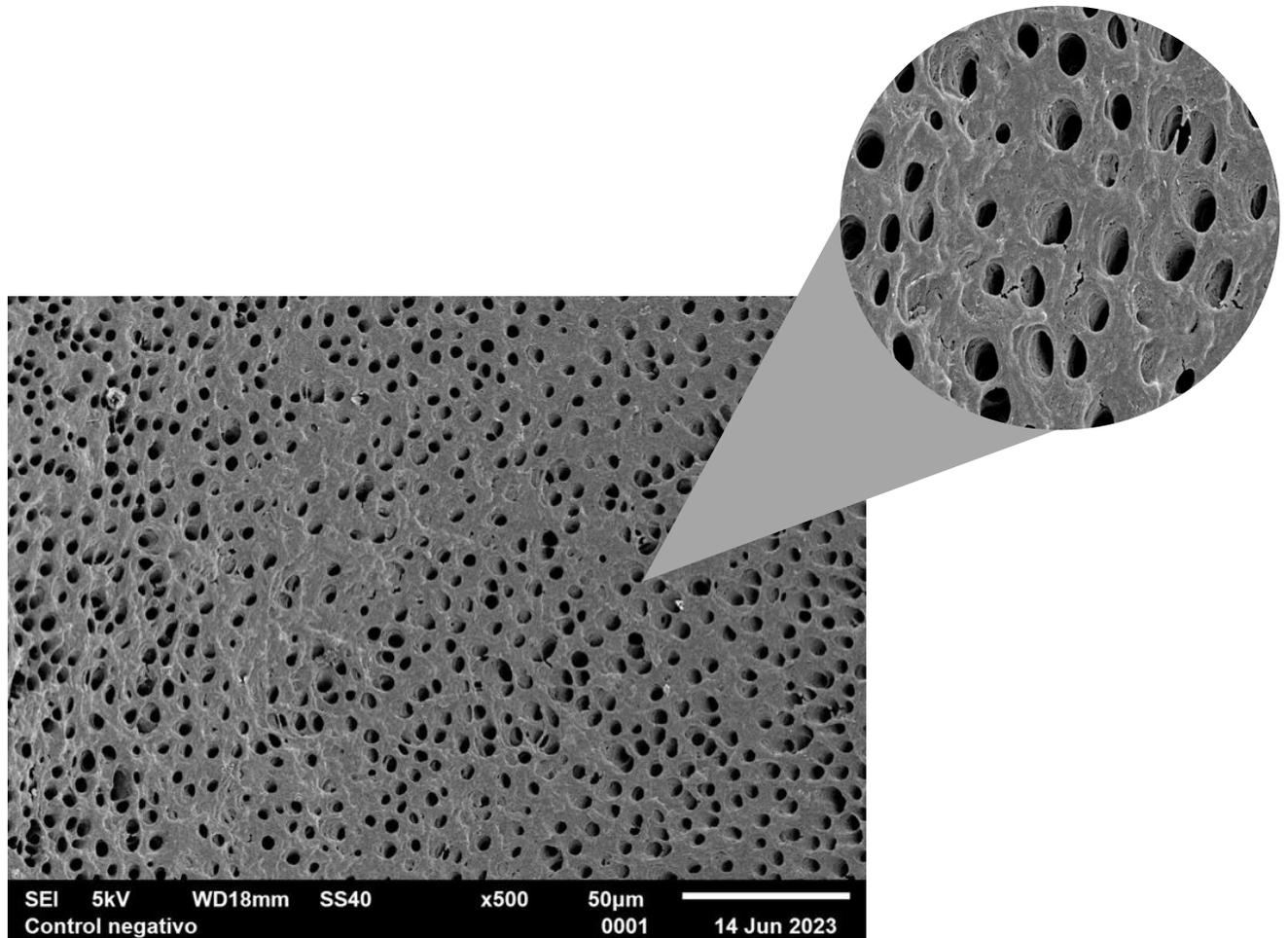


Fig 1. Se observa completa limpieza de los tubulos dentinarios, sin presencia de bacterias y ausencia de barrillo dentinario, los tubulillos dentinarios se ven permeables. En una magnificación de x2000 presentada en el círculo derecho se observa una mejor visión de la permeabilidad de los tubulillos dentinarios.

## GRUPO CONTROL POSITIVO

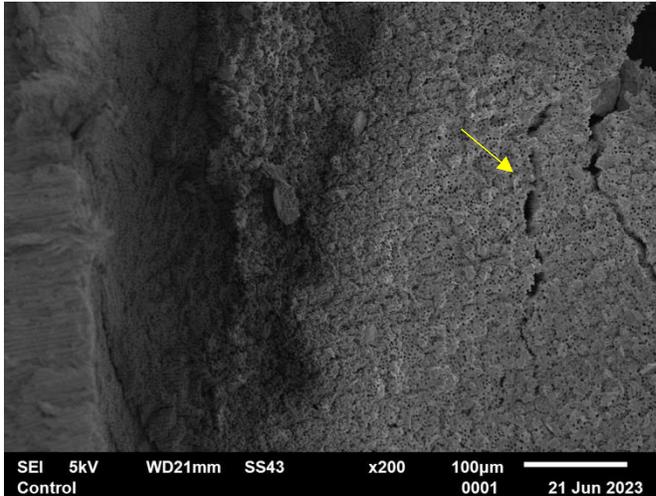


Fig 1. M1: Se observa una placa gruesa de biofilm agrietado

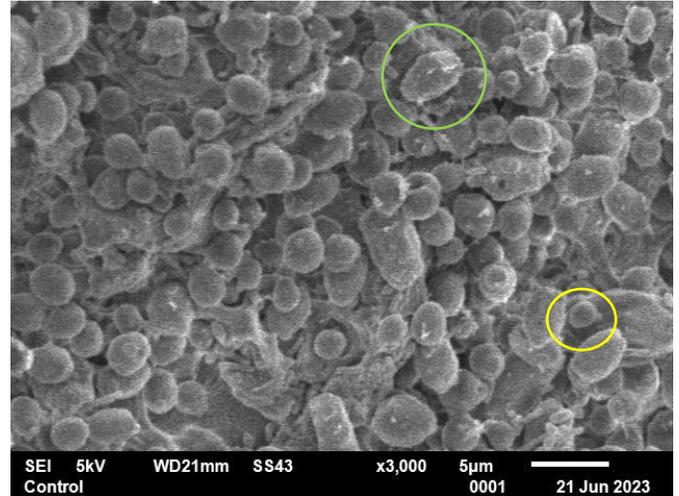


Fig 2. M1: Se logra ver presencia de cocos (Círculo amarillo) en compañía de *C. albicans* (Círculo verde)

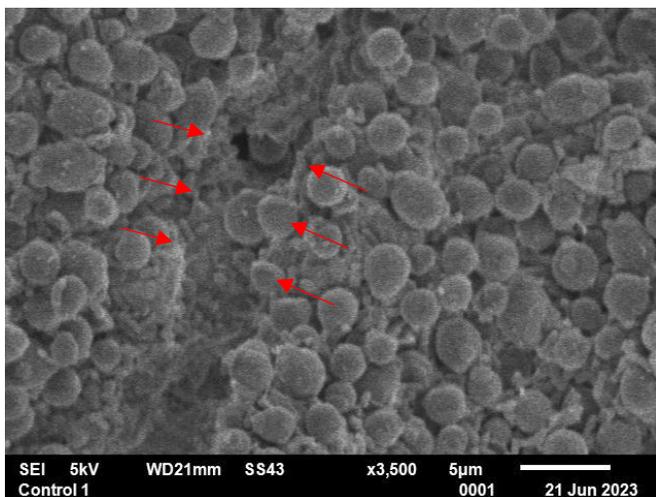


Fig 3. M2: Se observa una capa gruesa en forma de surco (delimitado por las flechas de color rojo) correspondiente al biofilm colonizado por encima de el por cocos y *C. albicans*.

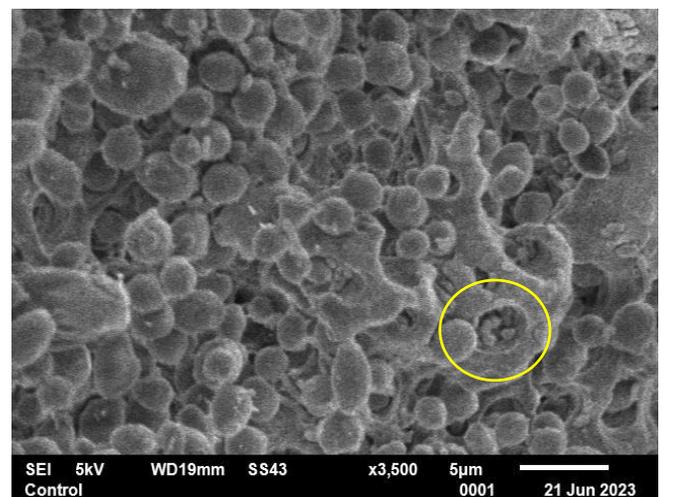


Fig 4. M3: Se observa tubulos dentinarios colonizados por cocos (circulo color amarillo) y *C. albicans*.

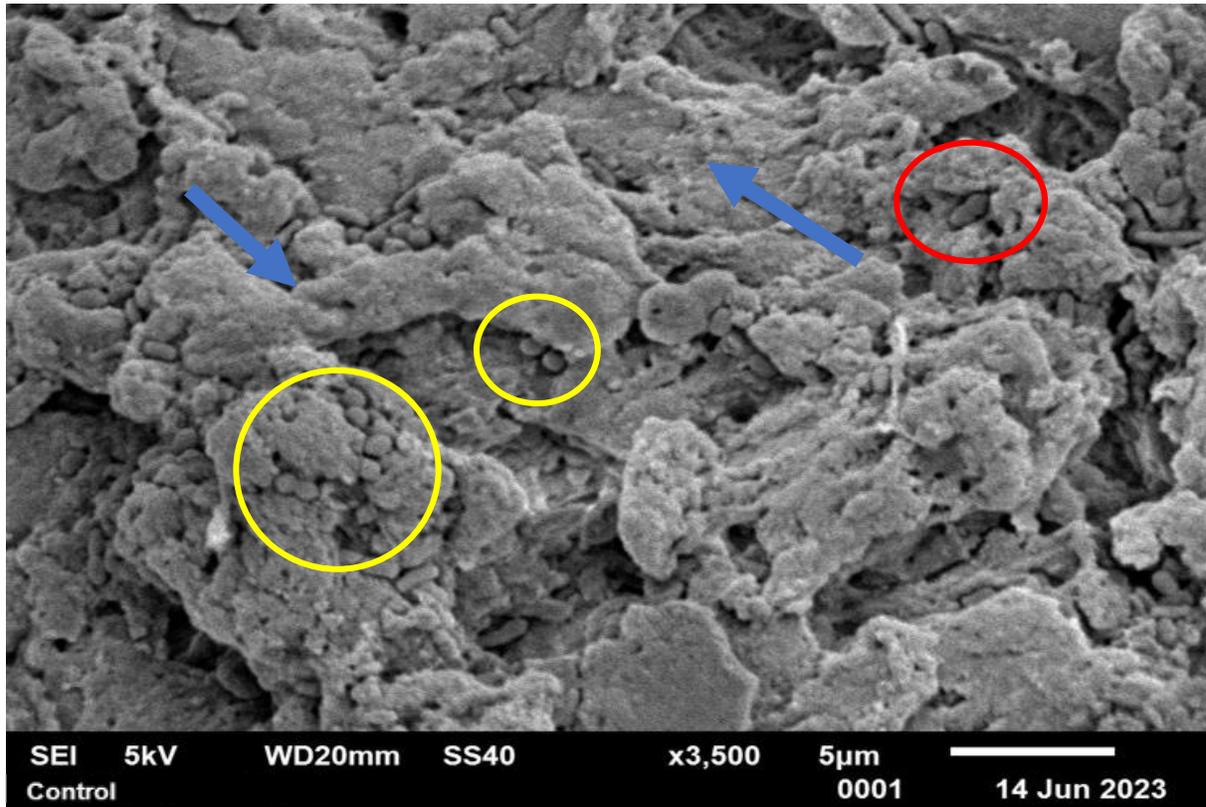


Fig 5. M4: Se observa capas gruesas de biofilm maduro (flechas azules), presencia de *C. albicans* en proceso de gemación (circulo rojo) y conglomerados de cocos envueltos en el biofilm (círculos amarillos).

## GRUPO EXPERIMENTAL DICLOFENACO

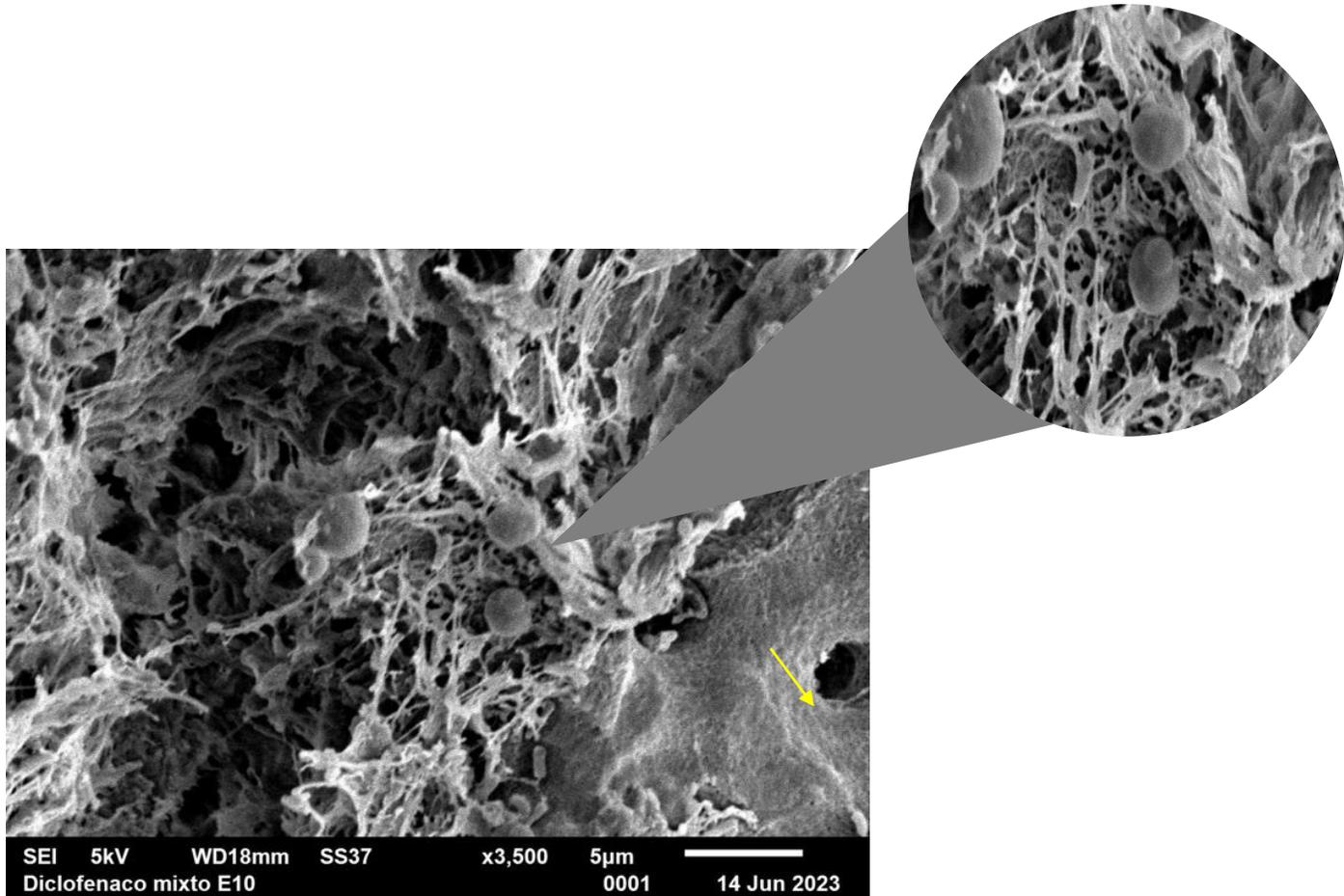


Fig 1. M1: Se aprecia tubulos dentinarios permeables y una capa protectora de biofilm que cubre el contorno de los tubulos dentinarios (flecha amarilla), también se presenta este biofilm en otra forma como fibras alargadas por polímeros que han sido degradados, se logra ver presencia de *C. albicans* pero ausencia de *E. faecalis*. En una magnificación de x7500 se aprecian más las redes de polímero degradado y *C. albicans* en proceso de gemación.

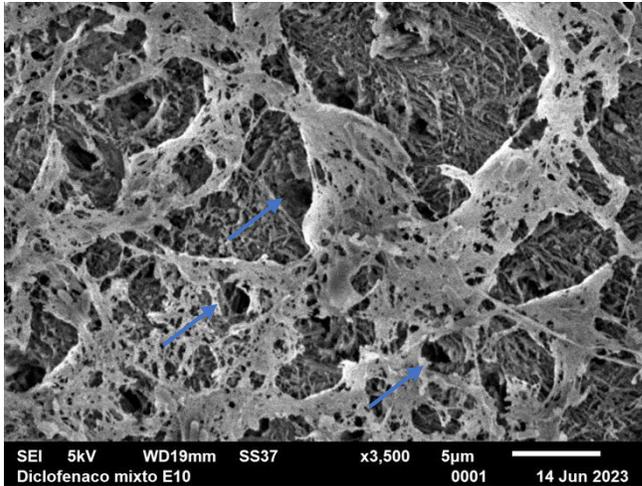


Fig 2. M10: Se observa el rompimiento de todos los polímeros que constituyen la capa de biofilm y no se logra observar formas microbianas. Se observan algunos tubulillos dentinarios debajo de estas fibras (flecha azul).

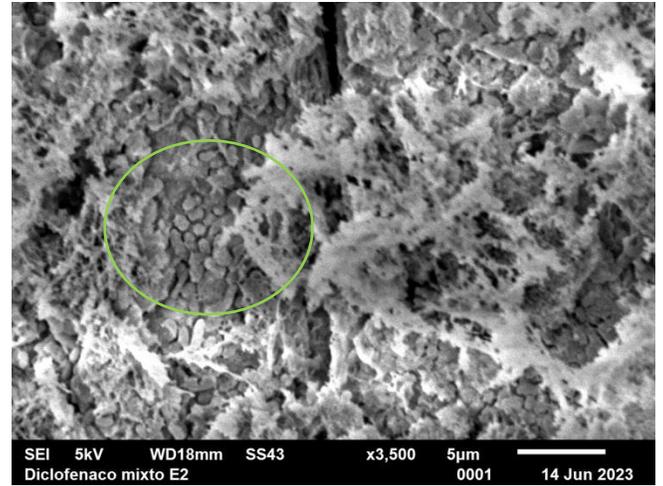


Fig 3. M2: Se observa el rompimiento de todos los polímeros y fracturas del biofilm y se observa presencia de cocos adheridos al biofilm (circulo verde).

## GRUPO EXPERIMENTAL DICLOFENACO POR TERCIOS

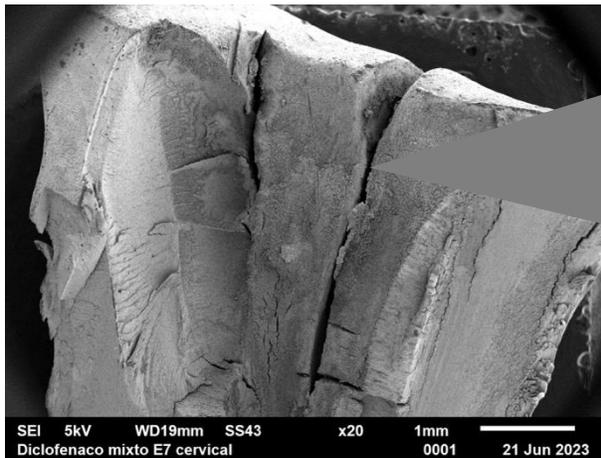


Fig 1. M7: Se observa grietas en la superficie del conducto radicular, a una magnificación de x3500 en la porción cervical se logra apreciar tubulos dentinarios y encima de ellos presencia de fibras del mismo biofilm degradado, no se observan colonias.

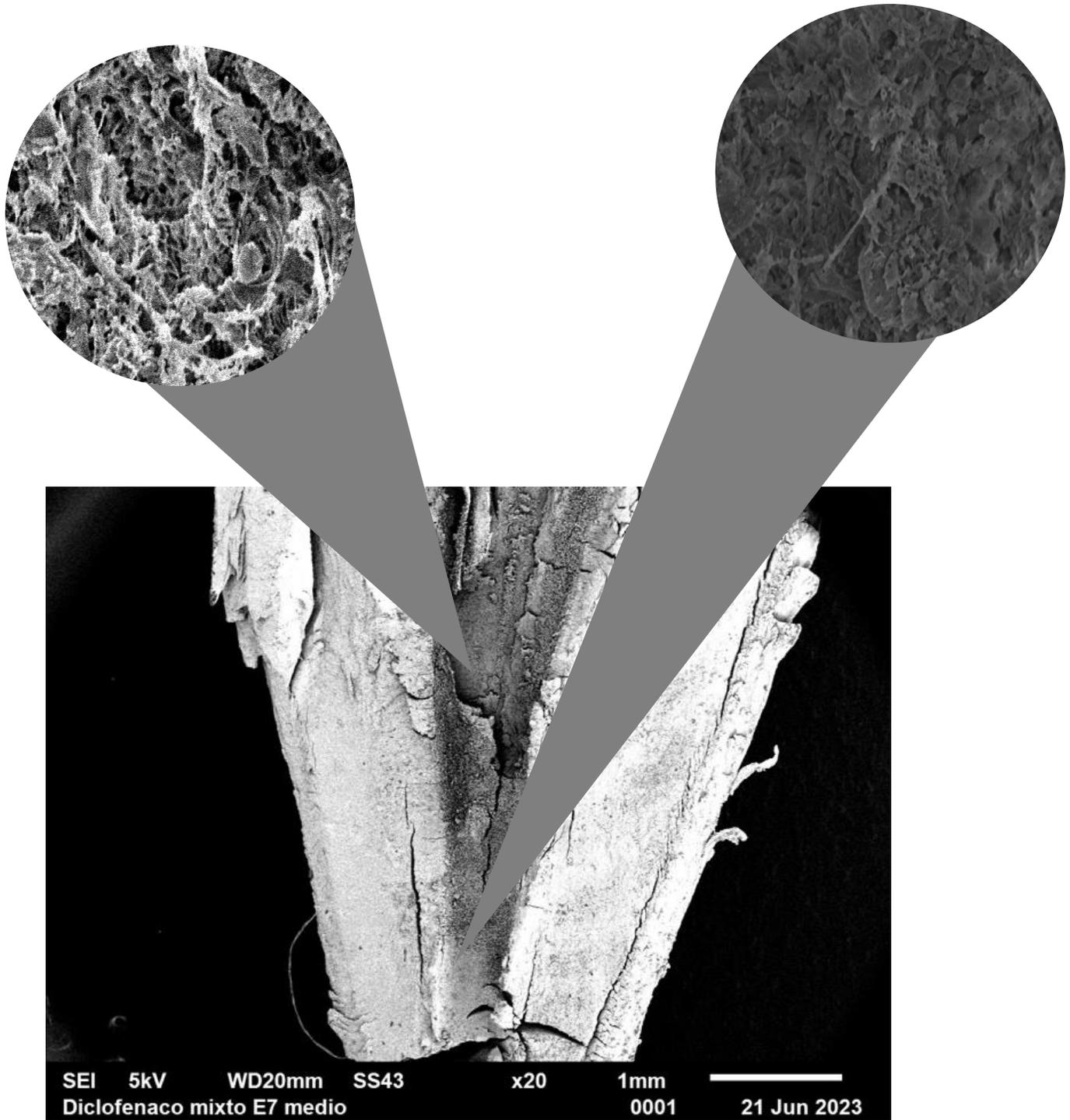


Fig 1. M7: Se observa grietas en la superficie del conducto radicular, a una magnificación de x3500 en la porción media se logra apreciar la destrucción del mismo biofilm y presencia de una sola *C. albicans*, en la porción apical en una magnificación de x3500 se observa de igual manera destrucción del biofilm y degradación de los polímeros sin embargo en menor proporción que coronal.

## 7 DISCUSIÓN

El tratamiento endodóntico según el autor Cohen et al. se dirige principalmente a un objetivo o un conjunto de objetivos específicos: que tienen como finalidad curar o prevenir la periodontitis periradicular. En diversos artículos se ha reportado que el tratamiento endodóntico habitualmente es un procedimiento que refleja resultados favorables en la patología pulpar y una tasa de éxito razonablemente alta. Sin embargo en patologías pulpares que involucran la zona periradicular existe una frecuencia alta en la presencia de lesiones periradiculares que desarrollan un ecosistema bacteriano con sinergismos y antagonismos, las cuales conllevan interacciones que desempeñan un papel importante en el curso de la enfermedad, cuando se desarrollan biofilms y las bacterias logran penetrar los túbulos dentinarios.

Actualmente se van desarrollando nuevas técnicas y materiales enfocados en la eliminación de estas bacterias residuales de la zona periradicular y así mejorar el pronóstico del tratamiento endodóntico, sin embargo no han demostrado un impacto estadísticamente significativo sobre los resultados del tratamiento. Esto plantea un problema real en la presente era de tratamientos basados en la evidencia científica ya que una técnica terapéutica nueva debe proporcionar mejores resultados que los procedimientos estándar en las pruebas clínicas.

Autores como Chávez de la Paz mencionan que la persistencia de microorganismos y su resistencia a la limpieza, desinfección y conformación del conducto pueden afectar el proceso de cicatrización de la periodontitis apical(69), lo que parece ser un factor pronóstico importante que reduce la probabilidad de éxito del tratamiento del conducto radicular. La resistencia al hidróxido de calcio de algunos microorganismos presentes en el conducto radicular en infecciones secundarias como *E. faecalis* y *C. albicans*; y actualmente el problema que presenta la resistencia antibiótica a nivel mundial se ha considerado buscar nuevas alternativas para la eliminación de estos microorganismos; estudios recientes han demostrado que algunos medicamentos tienen actividad antibacteriana además de su función principal, incluidos los AINE's. (70–72).

El Diclofenaco Sódico es un medicamento que posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas con buenos efectos gastrointestinales. Su modo de acción incluye una potente inhibición de la ciclooxigenasa y la modulación de la liberación y captación de ácido araquidónico, lo que tiene como resultado un efecto dual sobre la vía de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa.(73) El mismo que ha sido estudiado probando su capacidad antimicrobiana; obteniendo resultados comprometedores.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del Diclofenaco sobre un biofilm mixto de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Con el fin de evaluar su utilidad como posible medicación intraconducto. Para probar su actividad antimicrobiana de la sustancia activa del Diclofenaco Sódico, propiedades antes reportadas por autores como: Zahra Rashki, Rafela Pignatti, Amin Salem entre otros, en este estudio se decidió empezar por determinar la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida sobre cepas en estado planctónico. Se decidió seleccionar cepas silvestres de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* provenientes de pacientes con patología pulpar con la finalidad de darle un enfoque más real al estudio. Y así poder hacer comparativas con los resultados de otros autores.

Se inició con la selección de los gramajes a estudiar a partir de algunas concentraciones que corresponden a la mayor parte de la bibliografía estudiada. El efecto antimicrobiano que presenta el diclofenaco contra *E. faecalis* en estado pláctonico se plantea en concentraciones mínimas inhibitorias que van desde 50µg/mL.(65) Dutta et al. demostraron que la CMI del diclofenaco sódico contra 45 cepas de micobacterias es de 10-25 µg/ml, que es mucho mayor (5-6 veces) que la CIM de los fármacos antimicobacterianos convencionales.(66) Dastidar et al. demostraron que el crecimiento de *E. coli* en concentraciones de 100 µg/mL produce efecto inhibitorio. John T Riordan et al. reportan efecto antimicrobiano en concentraciones de 80 µg/ml de diclofenaco a cultivos exponenciales de la cepa de *S. aureus*.

En cuanto a *C. albicans*, autores como Zahra Rashki et al. exponen al diclofenaco en concentraciones de 50, 100, 200 y 500mg/mL sobre cepas de *C. albicans*; obteniendo

resultados de inhibición completa de la formación de tubos germinales de las cepas de *C. albicans* en exposición de 2Hrs, afectando su crecimiento y morfogénesis. En cambio a dosis más bajas de 75-100mg/mL produjo solo el 30% de inhibición. Autores como Cidália Pina et al. reportan gramajes del Ibuprofeno con actividad antifúngica de 20-25mg/mL y actividad fungiestática de 5mg/mL a una exposición en tiempo de 5 a 30 min(61). Mohammed A.S. et al. en su estudio utiliza concentraciones de 1, 10, 50, 75 y 100  $\mu$ M reportando una inhibición superior al 70% a concentraciones de aspirina entre 100  $\mu$ M y 1 mM, las concentraciones más bajas (de 50 a 75  $\mu$ M) produjeron solo alrededor de un 20% de inhibición, mientras que la aspirina a 10  $\mu$ M no tiene ningún efecto sobre la formación de biopelículas.(60)

La mayor parte de concentraciones utilizadas en los diversos estudios reportados entran en los rangos de concentración que se tomaron para la determinación de la CMI y CMB de este estudio, sin embargo fue de gran importancia demostrar su efecto antimicrobiano del Diclofenaco en *E. faecalis* y *C. albicans* porque ningún estudio realiza la exposición de estos microorganismos planteando o el mismo medicamento o sobre el mismo microorganismo, este estudio decidió determinar la concentración en ambas especies en estado planctónico para ver si presentaban el mismo comportamiento a los mismos gramajes.

El efecto antimicrobiano que se le atribuye al Diclofenaco se informa que es a nivel del ADN de las bacterias ya que las cepas bacterianas al entrar en contacto con el Diclofenaco producen degradación del ADN celular.(62) Debido a que todas las células bacterianas dependen de la síntesis de ADN para su crecimiento, mientras que el ARN es necesario para la transcripción y el suministro de información de la que depende la síntesis de proteínas y diversas enzimas; cualquier interferencia con la síntesis de ADN o ARN puede bloquear el crecimiento de una bacteria.

Dastidar et al. demostraron que el crecimiento de *E. coli* se ve afectado en la presencia del diclofenaco este mismo reduce la tasa de incorporación de Ci (3H) desoxitimidina en el ADN, lo que indica que el diclofenaco puede tener como objetivo la biosíntesis

del ADN.(62) Sin embargo aunque Dastidar et al. reportarán estos hallazgos en la degradación del ADN bacteriano se necesita más información para determinar si el diclofenaco se une directamente al ADN de las células que se multiplican activamente o si induce la degradación del ADN. (62)

Por otro lado Mazumdar et al. Reporta que el Diclofenaco mostró tener una acción antimicrobiana moderada que daña la membrana en *Listeria*, diclofenaco inhibió preferentemente la incorporación de precursores en [metil-3H] timidina, lo que sugiere su actividad antilistérica in vitro mediante la inhibición de la síntesis de ADN.(71)

Se han sugerido otros conceptos para justificar su acción antimicrobiana como el deterioro de la actividad de la membrana(66), la actividad antiplásmido, la alteración en las proteínas de transporte/unión codificadoras de genes y la regulación negativa de las bombas de flujo. John T Riordan reporta una alteración en el transcriptoma de *S. aureus*, donde la adición de diclofenaco a cultivos exponenciales de la cepa de *S. aureus* da como resultado una alteración significativa en la expresión de  $\geq 2$  veces de 458 genes, lo que representa el 16,8 % (458/2723) de los ORF del genoma.(72) A través del análisis de micromatrices de expresión génica que se utiliza para medir alteraciones de transcriptoma en respuesta al crecimiento en presencia de una concentración subinhibitoria de ciertos medicamentos en este caso el Diclofenaco, se observa que el diclofenaco en *S. aureus* altera sus expresión genica, los genes involucrados eran genes que se encargaban del transporte, la unión y síntesis de las proteínas como de la envoltura celular.(72) De igual manera varios genes de la envoltura celular relacionados con la resistencia a los antibióticos se alteraron en respuesta al diclofenaco. Esto incluyó la regulación de los genes *pbpB* y *pbp4* de la proteína de unión a penicilina, que están implicados en la biosíntesis de peptidoglucanos y el crecimiento celular.(72)

En cuanto a la acción que posee el Diclofenaco sobre *C. albicans* se ha mencionado sobre los factores que afectan la morfología de los hongos son diversos. El pH, la temperatura, concentraciones de oxígeno y glucosa; estrés ambiental, son los

principales estímulos que activan los programas genéticos que involucran la expresión de genes específicos(74) y la síntesis de proteínas y enzimas reguladoras que forman la base bioquímica del crecimiento dimórfico. Cambiando el equilibrio enzimático en la célula, provocando un reordenamiento metabólico y promoviendo la adaptación de la variante morfológica. (67) El cambio morfológico de levadura a hifa es una de las características biológicas más importantes que permiten a *C. albicans* colonizar, invadir y sobrevivir en los tejidos del huésped durante la infección.

Se ha demostrado que la transformación de las hifas es inducida por la activación de la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) y la vía del AMPc, que están controladas por la proteína RAS; bajo esta proteína encontramos a EFG1 que es un factor de transcripción importante para la formación de hifas lo cual quiere decir que cualquier hongo careciente de este factor no podrá formar hifas. A su vez las proteínas específicas de hifas que se encuentran en la pared celular de *C. albicans* (Ece1, Als1, Hwp1 y Als3) son reguladas por EFG1. Reiterando que la familia de los genes ALS están relacionados con el crecimiento y morfología de *C. albicans* y Hwp1 es necesaria para la adherencia de las células fúngicas a las células epiteliales, así como para la formación normal de biopelículas e hifas.(67) Lo que corrobora lo antes descrito y visto en las imágenes del Microscopio Electrónico de Barrido presentadas en este proyecto donde se logra observar a *Candida albicans* en forma de levadura y no de hifa en el biofilm.

El efecto antifúngico y fungiestático revisado en los siguientes artículos sugiere que el principal blanco de los AINE´s sobre *C. albicans* es que actúan en la inhibición de las prostaglandinas que secreta *Candida albicans* y afectando su cambio de morfología al igual que la expresión de ciertos genes morfolopatógenos principales y específicos, las expresiones del ARNm de EFG1, CYR1 y RAS1 se ven reducidas en concentraciones de 500 mg/mL de diclofenaco sódico.(67) Y las expresiones del ARNm de ALS1, ALS3, CDC42, ECE1, HWP1 y RBT1 se reducen de igual manera con 500 mg/mL de diclofenaco sódico y se induce la expresión relativa de NRG1.

Zahra Rashki et al. Reportan que las colonias revisadas en su estudio los bordes se encontraban completamente lisos y todas las células examinadas estaban en forma de levadura en ciernes.

En cuanto a la formación del biofilm y su efecto del diclofenaco sobre el mismo, Mohammed A.S. et al. mencionan que la adición de la aspirina en un biofilm maduro a un biofilm inmaduro muestra diferencia significativa en la inhibición del mismo ya que se mostró mayor reducción del biofilm entre un 20 y un 80 %, cuando se le añade el medicamento al biofilm maduro, lo que sugiere que la aspirina podría tener un efecto inhibitorio significativo sobre los biofilms maduros in vivo. Y a su vez se podría relacionar con el efecto que llegó a tener el Diclofenaco con el biofilm maduro de treinta días creado en este proyecto de investigación.

En cuanto a la formación de biofilm de *Candida albicans*; el modo de acción del diclofenaco sódico está estrechamente relacionado con su efecto sobre la filamentación de *C. albicans*.(75)

Mohammed A. et al. ha reportado que los inhibidores de la COX como el medicamento etodolaco, diclofenaco y, en particular, la aspirina disminuyen drásticamente la producción de biopelículas por parte de *C. albicans*. Ya que estos AINE's bloquean específicamente la biosíntesis de prostaglandinas al inhibir una o ambas isoenzimas COX-1 y COX-2.(60) En ese mismo estudio se demostró que cuando se añade PGE<sub>2</sub> al desarrollo de biopelículas de *C. albicans* en el tiempo cero, la formación de biopelículas aumenta ligeramente. Reportan que la aspirina es capaz de inhibir la formación del biofilm hasta de un 95% al suprimir la transcripción del gen COX-2.(70)

El estudio del diclofenaco como medicación intraconducto se justifica en este proyecto debido a los resultados que ha mostrado *E. faecalis* en una alta resistencia a los medicamentos utilizados durante el tratamiento y es uno de los pocos microorganismos que ha demostrado resistir el efecto antibacteriano in vitro del hidróxido de calcio.

En estudios comparativos del uso de AINE´s y el Hidróxido de calcio, los resultados proporcionados por la pasta de hidróxido de calcio; se observa una menor eficacia antibacteriana contra los resultados que reportan diversos artículos sobre el efecto antimicrobiano de algunos AINE´s(13). Además de *E. faecalis*, otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis* han mostrado sensibilidad a los AINE´s (14), lo que resulta un campo muy llamativo en la manera que se le puede ofrecer al paciente un mejor pronóstico en su tratamiento. Carmen Ferrer et al. realiza una comparativa de los efectos antibiofilm de una solución triple antibiótica (TAS); una solución antibiótica doble (DAS); y soluciones de diclofenaco (DCS) al 5%, 2,5% y 1,25% contra el biofilm de *Enterococcus faecalis*, obteniendo como resultados que el porcentaje de reducción de unidades formadoras de colonias osciló entre 62,98 y 98,62, respectivamente, para TAS y 5% DCS cifras similares a las reportadas en este estudio, resultados que resaltan aún más la capacidad del Diclofenaco para eliminar microorganismos. El uso del Hidróxido de calcio no resulta ser suplido si no que se puede llegar a utilizar como complemento ya que la asociación del diclofenaco con la pasta de hidróxido de calcio ha demostrado un aumento en la acción antimicrobiana contra un biofilm de *E. faecalis* porque ayuda a mantener el pH alcalino de la pasta.(76) Lo cual podría ser una alternativa en la eliminación bacteriana en dientes con periodontitis apical crónica que pueden llegar a necesitar varias citas en el tratamiento endodóntico.

En las imágenes presentadas del microscopio Electrónico de Barrido se reafirma la incapacidad de *C.albicans* de formar hifas al ser inhibida por el Diclofenaco sódico puesto que en todas las muestras presenta forma redonda u ovalada. En cuanto a la disgregación del biofilm por la acción del Diclofenaco se corrobora en la presencia de la degradación de los polímeros del biofilm.

## 8 CONCLUSIONES

En este estudio se comprueba que el Diclofenaco Sódico posee capacidad antimicrobiana en cepas planctónicas de *C. albicans* y *E. faecalis* a concentraciones del 1.25%, sin embargo, en un biofilm maduro de 30 días demostró destrucción de los polímeros a concentraciones del 5%.

## 9 REFERENCIAS

1. Siqueira JF, Rô C , As IN, Lopes P, Elias CN, De Uzeda M. Fungal Infection of the Radicular Dentin. 2002.
2. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2005 Feb;99(2):231–52.
3. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U, Australia M. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Vol. 85. 1998.
5. Craig Baumgartner J, Watts CM, Xia T. SCIENTIFIC ARTICLES Occurrence of *Candida albicans* in Infections of Endodontic Origin. 2000.
6. Haapasalo HK, Sire EK, Waltimo TMT, Érstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study.
7. Waltimo TMT, Sire Å N EK, Érstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro.
9. Craig Baumgartner J, Falkler WA. Bacteria in the Apical 5 mm of Infected Root Canals. Vol. 17. 1991.
11. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in Previously Root-Filled Canals in a Lithuanian Population. 2000.
12. Fabricius L, Dahløen G, Sundqvist G, Happonen RP, Møller JR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth.
13. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. Vol. 32, *Journal of Endodontics*. 2006. p. 93–8.
15. Rô C , As IN, Siqueira JF, Tia K, Santos RN. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. 2004.

16. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor & D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Vol. 35, International Endodontic Journal. 2002.
19. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. Vol. 8, Microorganisms. MDPI AG; 2020. p. 1–18.
20. Noverr MC, Toews GB, Huffnagle GB. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect Immun*. 2002;70(1):400–2.
21. Ells R, Kock JLF, Albertyn J, Kemp G, Pohl CH. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on prostaglandin E<sub>2</sub> production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms. *Med Microbiol Immunol*. 2011 Feb;200(1):23–8.
22. Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun*. 2001;69(5):2957–63.
23. Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Role of oxylipins and other lipid mediators in fungal pathogenesis. Vol. 1, Future microbiology. 2006. p. 219–27.
24. Grózer Z, Tóth A, Tóth R, Kecskeméti A, Vágvölgyi C, Nosanchuk JD, et al. *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and OLE2 is not required for their synthesis. *Virulence*. 2015 Feb 5;6(1):85–92.
25. Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer ' D, Caldwell D, Korber D, James2 G. MINIREVIEW Biofilms, the Customized Microniche. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1994.
27. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. Vol. 11, Advances in dental research. 1997. p. 160–7.
28. de Paz LC. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. *J Endod*. 2007;33(6):652–62.
29. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun*. 1996;64(3):1035–8.
30. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Vol. 45, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001. p. 999–1007.

31. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of Growth Conditions on Susceptibility of Five Microbial Species to Alkaline Stress. *J Endod.* 2008 May;34(5):579–82.
33. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial Quantification in Teeth with Apical Periodontitis Related to Instrumentation and Different Intracanal Medications: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2007 Feb;33(2):114–8.
35. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review.
36. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts [Internet]. Available from: [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)
38. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. Vol. 66, *J Dent Res.* 1987.
39. Tronstad L. SCIENTIFIC ARTICLES pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide.
40. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo & M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. Vol. 34, *International Endodontic Journal.* 2001.
41. Hakan B, Safavi KE, Spfingberg LSW, Farmington C. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Vol. 84. 1997.
42. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: A systematic review and meta-analysis. Vol. 40, *International Endodontic Journal.* 2007. p. 2–10.
43. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor & D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Vol. 35, *International Endodontic Journal.* 2002.
44. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Jan;27(1):44–52.
45. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2003 Dec;67(4):593–656.

46. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Vol. 11, *Infection and Drug Resistance*. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 1645–58.
47. Slaton KP, Huffer MD, Wikle EJ, Zhang J, Morrow CD, Rhodes SC, et al. 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing to Evaluate the Effects of 6 Commonly Prescribed Antibiotics. *J Endod*. 2017 Dec 1;43(12):1984–9.
48. Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Vol. 55, *International Endodontic Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 512–30.
49. Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1337–44.
50. Systemic, prophylactic and local applications of antimicrobials in endodontics: an update review Zahed Mohammadi.
51. GROSSMAN LI. Polyantibiotic treatment of pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*. 1951;43(3):265–78.
52. Macneilp S, Rindler' E, Walker' A, Brown^ AR, Cobb' CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans* An in vitro study. *J Clin Periodontol*. 1997;997:753–60.
53. Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Antibiotics in Endodontics: a review. Vol. 50, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1169–84.
54. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):852–5.
55. Systemic, prophylactic and local applications of antimicrobials in endodontics: an update review Zahed Mohammadi.
56. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either

- calcium hydroxide or Septomixine [Internet]. Vol. 10, Oral Diseases. 2004. Available from: <http://www.blackwellmunksgaard.com>
57. Mufioz-Criado S, Mufioz-Bellido JL, Garcfa-Rodrfuez JA. In Vitro Activity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents, Phenotiazines, and Antidepressants against Brucella Species.
  58. Wang WH, Wong M, Dailidene D, Berg DE, Gu Q, Lai C, et al. Aspirin inhibits the growth of Helicobacter pylori and enhances its susceptibility to antimicrobial agents [Internet]. Available from: [www.gutjnl.com](http://www.gutjnl.com)
  59. Dannhardt G, Kiefer W. Review Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. Vol. 36, Eur. J. Med. Chem. 2001.
  60. Alem MAS, Douglas LJ. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan;48(1):41–7.
  61. Â Lia Pina-vaz Ã C, Sansonetty F, Â Cio Rodrigues Ã AG, Martinez-de-oliveira J, Â Nio Fonseca Ã AF, Ê Rdh P anders M. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with  $\bar{u}$ conazole against Candida species.
  62. Dastidar SG, Ganguly K, Chaudhuri K, Chakrabarty AN. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis [Internet]. Vol. 14, International Journal of Antimicrobial Agents. 2000. Available from: [www.ischemo.org](http://www.ischemo.org)
  65. Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S, Moosavi Z, Abdollahi A, Zakeri-Milani P, et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on Enterococcus faecalis [Internet]. Vol. 10. 2013. Available from: [www.jdt.tums.ac.ir](http://www.jdt.tums.ac.ir)
  66. Dutta NK, Annadurai S, Mazumdar K, Dastidar SG, Kristiansen JE, Molnar J, et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. Int J Antimicrob Agents. 2007 Sep;30(3):242–9.
  67. Rashki Ghalehnoo Z, Rashki A, Najimi M, Dominguez A. The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in Candida albicans. Microb Pathog. 2010 Mar;48(3–4):110–5.

68. Ferrer-Luque CM, Baca P, Solana C, Rodríguez-Archilla A, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M. Antibiofilm Activity of Diclofenac and Antibiotic Solutions in Endodontic Therapy. *J Endod.* 2021 Jul 1;47(7):1138–43.
69. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):70–7.
70. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate [Internet]. Vol. 96. 1999. Available from: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
71. Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH, Dutta NK. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: An antibacterial drug target. Vol. 28, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2009. p. 881–91.
72. Riordan JT, Dupre JAM, Cantore-Matyi SA, Kumar-Singh A, Song Y, Zaman S, et al. Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2011 Jul 21;10.
73. Scholer DW, Boettcher I, Ku EC, Schweizer A. Pharmacology of diclofenac sodium (Voltaren®). *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 1985;15(2):61–4.
74. Ghormade V, Deshpande M V. Fungal spore germination into yeast or mycelium: possible implications of dimorphism in evolution and human pathogenesis. Vol. 87, *Naturwissenschaften.* Springer-Verlag; 2000.
75. Alem MAS, Douglas LJ. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):41–7.
76. de Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte MAH, et al. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. *J Endod.* 2017 Jan 1;43(1):131–4.

## 10 PERSPECTIVAS

Se propone analizar a los componentes del *biofilm* que ataca específicamente el Diclofenaco Sódico al 5%.

## **11 ANEXOS**