



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Efecto de la combinación de ondas de choque y Daktarin en el debilitamiento de biopelícula de *Candida albicans* en prótesis totales

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Diploma de la

ESPECIALIDAD EN REHABILITACIÓN BUCAL

Presenta:

L.O Giezi Velázquez Carreto

Dirigido por:

MSD. Manuel Enrique Peña Cámara

Co-Director:

Dra. Blanca Edith Millán Chiu

Querétaro, Qro. a 3 de mayo de 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Rehabilitación Bucal

Análisis del efecto combinado del antimicótico en gel (Daktarin) y la aplicación de ondas de choque en el debilitamiento de biopelículas de *Candida albicans* desarrolladas *in vitro* en prótesis totales

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la
Especialidad en Rehabilitación Bucal

Presenta:

Lic. En Odont. Giezi Velázquez Carreto

Dirigido por:

Dr. Manuel Enrique Peña Cámara

Co-dirigido por:

Dra. Blanca Edith Millán Chiu

Dr. Enrique Peña Cámara
Presidente

Dra. Blanca Edith Millán Chiu
Secretario

Dr. Abel Tavares De La Cruz
Vocal

Dr. José Antonio Guerrero Guzmán
Suplente

Dr. Daniel Alejandro Montalván Aguilar
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Mayo 2022
México

Resumen

Introducción: La pérdida total de los órganos dentarios es un problema de salud con alto porcentaje de prevalencia en México, donde la mayor parte de individuos que la padece, recurre al remplazo de las estructuras perdidas mediante prótesis completas de acrílico. La formación y adherencia de biopelículas a las prótesis de acrílico termocurable es muy alta, de acuerdo a lo reportado en la literatura ocasionando diversos pormenores.

Es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que dentro de las biopelículas, la candidiasis causada por la *Candida Albicans* es la enfermedad fúngica bucal con mayor prevalencia en adultos de más de 60 años; Adicionalmente, se he demostrado una alta incidencia de enfermedades respiratorias en adultos mayores debido a la aspiración de microorganismos capaces de generar una patología pulmonar.

La presente investigación se enfocó en estudiar *in vitro* el efecto de las ondas de choque únicas y en combinación con Daktarin gel, un antifúngico comúnmente utilizado en odontología, sobre la biopelícula de *Candida Albicans*.

Este tipo de estudio resulta necesario debido al potencial que presentan las ondas de choque en el campo de la odontología, en especial la descripción del efecto que tienen sobre las biopelículas de *C. albicans*, y el posible debilitamiento de éstas incrementando así el alcance y efecto de los antimicóticos.

Objetivo: Evaluar el efecto de las ondas de choque únicas y en combinación con el antifúngico oral Daktarin gel sobre biopelículas de *C. albicans* desarrolladas *in vitro* sobre moldes de acrílico termocurable utilizado para la producción de prótesis totales.

Material y métodos: 30 especímenes de acrílico termocurable de 5 mm de largo con un grosor de 2 mm, los cuales fueron distribuidos tanto en grupos de control como en grupos de prueba que serán tratados ya sea con ondas de choque, o con antimicótico Daktarin gel o con ambas formas anteriores combinadas, según se detalla en la sección correspondiente al estudio experimental *in vitro*.

Resultados: Los acrílicos producidos presentaron una capacidad de flexión de hasta 110.94 MPa \pm 14.69 MPa. Resistieron la presión de las ondas de choque en densidades bajas y medianas sin presentar daños o evidencia de cavitación.

Se establecieron las condiciones para la formación de biopelícula de *C. albicans in vitro*, sobre fragmentos de acrílico. Las ondas de choque actuaron de manera efectiva en la remoción de las biopelículas formadas por *C. albicans*, mientras que el antimicótico actuó sobre la viabilidad celular. En ambos casos, se observó disminución en la cantidad de levaduras que quedaron adheridas al material odontológico. Sin embargo, cuando los tratamientos se aplicaron combinados no

se obtuvo un efecto significativo en la disminución de células fúngicas en comparación con las otras pruebas.

Discusión y conclusiones: Los acrílicos utilizados presentaron una capacidad de flexión que va de acuerdo con la norma de calidad. Fueron resistentes a la presión inducida por las ondas de choque.

Los resultados de esta investigación confirmaron la alta posibilidad y capacidad de adherencia que tiene *C. albicans* a los acrílicos termocurables.

Las ondas de choque tuvieron un efecto positivo en el debilitamiento de la biopelícula. Esto se atribuyó al fenómeno de cavitación acústica, la cual causó remoción mecánica de las células y matriz extracelular.

Las muestras que recibieron tratamiento con el antimicótico mostraron disminuida la viabilidad. Aunque la biopelícula no se eliminó completamente, un efecto común por la poca penetración del antimicótico o debido a la protección ejercida por la matriz extracelular.

La combinación de ondas de choque y el antimicótico no presentó un efecto sinérgico en el debilitamiento de estas biopelículas. Probablemente debido a un efecto atenuador del gel.

Se deben analizar mayor número de muestras para corroborar estos resultados ya que de manera individual el gel actuó como un medio que en grosores menores a 7mm puede potenciar el efecto de las ondas de choque.

(Palabras clave: Ondas de choque, antimicótico, acrílico termocurable)

Summary

Introduction: In Mexico edentulism is a health problem with a high percentage of prevalence, where the majority of individuals who suffer from it, resort to the replacement of lost structures by means of complete acrylic prostheses. The formation and adherence of biofilms to heat-cured acrylic prostheses is very high, according to the literature.

Thus, the World Health Organization (WHO) indicates that candidiasis is the most prevalent fungal disease in adults over 60 years of age; the development of biofilms formed by *Candida albicans* is among the main causes of oral disease. Additionally, a high incidence of respiratory diseases has been demonstrated in older adults due to the aspiration of microorganisms capable of generating pulmonary pathology.

The present investigation focused on studying the effect of shock waves alone and in combination with Daktarin gel, an antifungal commonly used in dentistry, on *C. albicans* biofilms developed in vitro.

This type of study was necessary due to the potential of shock waves in the field of dentistry, especially the description of their effect on *C. albicans* biofilms, and the possible weakening of these biofilms, thus increasing the scope and effect of antifungal agents.

Objective: To evaluate the effect of shock waves alone and in combination with the oral antifungal Daktarin gel on *C. albicans* biofilms developed in vitro on thermocurable acrylic molds used for the production of total prostheses.

Material and methods: 30 thermocurable acrylic specimens 5 mm long with a thickness of 2 mm, which will be distributed both in control groups and in other groups that will be treated either with shock waves, or with Daktarin gel antifungal, or with both previous forms combined, as detailed in the following section.
Experimental in vitro study

Discussion and conclusions: The acrylics used presented a bending capacity that is in accordance with the quality standard. They were resistant to the pressure induced by shock waves.

The results of this research confirmed the high possibility and capacity of adherence of *C. albicans* to heat-curable acrylics.

The shock waves had a positive effect on the weakening of the biofilm. This was attributed to the phenomenon of acoustic cavitation which caused mechanical removal of the cells and extracellular matrix.

Samples treated with the antifungal agent showed decreased viability. Although the biofilm was not completely eliminated, a common effect due to the poor penetration of the antifungal or due to the protection exerted by the extracellular matrix.

Shock waves in combination with the antifungal did not present a synergistic effect in weakening these biofilms, probably due to an attenuating effect of the gel. A larger number of samples should be analyzed to corroborate these results. Since individually the gel acted as a medium that in thicknesses less than 7 mm can enhance the effect of the shock waves.

(Key words: Shock wave, antifungal, heat-cured acrylic).

Dedicatorias

A DIOS

Quien me da todo y siempre ha sido bueno y fiel conmigo.

A MIS PADRES

Que con su amor, paciencia y apoyo me han permitido concluir esta etapa siendo ellos un ejemplo de valentía y esfuerzo constante.

A MIS HERMANOS

Eunice y Eliel por su apoyo y cariño incondicional durante todo este proceso, muchas gracias.

Agradecimientos

Este trabajo si bien ha requerido de esfuerzo, estudio y dedicación de parte del autor no habría sido posible sin el apoyo, el interés y cooperación de todas las personas que citare a continuación, ya que sin ellas y ellos este trabajo habría sido muy complicado y siempre fueron un soporte en los momentos de estrés y preocupación.

Mi mas sincero agradecimiento a la Dra. Blanca Edith Millán Chiu, responsable del área microbiológica del laboratorio de ondas de choque y co-directora de esta tesis, por su invaluable apoyo, orientación y sobre todo paciencia para enseñar y corregir siempre de la mejor manera.

Al Dr. Achim M. Loske Jefe del Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM. Por su grandísimo apoyo en la planeación del proyecto y su aliento a realizar investigaciones que sean útiles y trascendentes en esta era de cosas banales.

Al MSD Enrique Peña Cámara, profesor, director de tesis y amigo. Que confió en mi para llevar este trabajo de investigación, otorgándome tiempo, conocimientos y animo en momentos de desaliento.

Deseo agradecer al M. en C. Francisco Fernández Escobar por todo su apoyo y enseñanza durante el uso del Generador de Ondas de Choque Multifuncional, además de los aspectos de la física en los que tuvo a bien asesorarme y supervisar las redacciones pertinentes. A el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM me facilitó los equipos y materiales necesarios para llevar a cabo gran parte este proyecto.

Así también a todo el personal del Centro de Física Aplicada y tecnología Avanzada de la UNAM, y del Laboratorio de ondas de choque, especialmente a Paula, técnica laboratorista, por siempre tener disposición para apoyar en el uso de los materiales e instalaciones siguiendo las normas y el reglamento establecido.

También un agradecimiento especial al LaNCam, y en particular al laboratorio de microscopia por el servicio de microscopía confocal.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, que siempre busca educar a sus alumnos como lo dice su lema “En la verdad y en el Honor”.

A la facultad de Medicina y la licenciatura en odontología por el apoyo en esta investigación facilitando laboratorios e instrumentos de medición para la experimentación, así como al Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez por sus enseñanzas durante todo este largo proceso.

A mi familia, pilar importante en mi vida y desarrollo profesional, ya que sin ellos hubiera sido imposible el terminar esta investigación.

A mis padres, Agustín y Eunice, que con su ejemplo me han demostrado que a los que aman a Dios todas las cosas les ayudan a bien. Por ser un baluarte en mi formación, y siempre enseñarme a ser responsable y honesto en mi caminar. Infinitas gracias papás.

A mi hermanos Eunice y Eliel, por todo el apoyo tanto emocional como económico que mostraron durante todo el proceso de esta investigación y el desarrollo de mi posgrado. Gracias por sacrificar lo de ustedes para mi.

A mi abuelito, por mes tras mes apoyarme económicamente de acuerdo a sus posibilidades y fuerzas.

A mi novia, que fue paciente conmigo en el proceso. Dandome su apoyo y cariño constante.

Y a todas aquellas personas que fueron parte de esta maravillosa aventura, muchas gracias.

Pero sobre todas las cosas gracias a Dios, que me permite la vida y que por su gracia pude concluir una etapa mas en mi vida, porque como dice Isaías 41:10 no temas porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudare, siempre te sustentare con la diestra de mi justicia.

A él sea toda la gloria.

Índice

RESUMEN.....	II
SUMMARY	V
DEDICATORIAS	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
ÍNDICE.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS Y SIGLAS	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. FUNDAMENTACION TEÓRICA.....	6
IV. HIPOTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
V.1 GENERAL	23
V.2 ESPECÍFICOS.....	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	24
VI.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	24
VI.2 UNIDAD OBSERVACIONAL.....	24
VI.3 MUESTRA Y TIPO DE MUESTRA	24
VI. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	24
VI. PROCEDIMIENTOS	25
VII. RESULTADOS	31
.....	31
DISCUSIÓN.....	37
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. PROPUESTAS	43
X. BIBLIOGRAFIA	44
XI. ANEXO.....	51

Índice de figuras

- Fig. 1. Modelo de formación de biopelículas microbianas la cual consta de cinco etapas distintas.
- Fig. 2. Anatomía de la cavidad oral.
- Fig. 3. Paciente con edentulismo en maxilar.
- Fig. 4. Inflamación intensa, hiperemia de la mucosa y aspecto nodular relacionado a estomatitis protésica.
- Fig. 5 Representación esquemática del desarrollo de biopelículas de *C. albicans* en superficie irregular de PMMA.
- Fig. 6 Pulido de prótesis total.
- Fig. 7 Fórmula estructural del PMMA.
- Fig. 8 Gráfica del cambio de presión que produce una onda de choque en el tiempo.
- Fig. 9 Generador electrohidráulico.
- Fig. 10 Generador electromagnético.
- Fig. 11 Esquema de un generador de ondas de choque
- Fig. 12 Esquema de la variación de presión generada por el paso de ondas de choque tándem.
- Fig. 13. Esquema de pruebas de acrílico Nom 12 ADA.
- Fig. 14 Máquina universal de pruebas sobre la cual se colocan las muestras y se ejerce presión sobre estas a una velocidad de cruceta controlada.
- Fig. 15 Daktarin Gel.
- Fig. 16 Osciloscopio Tektronix TDS 3032.
- Fig. 17 Conteo en cámara de Neubauer.
- Fig. 18 Placa de 24 pozos con muestras de acrílico.
- Fig. 19 Muestras colocadas dentro de bolsas estériles.
- Fig. 20. Gráficas de cambios en acrílico hasta punto de fractura
- Fig. 21 Datos obtenidos con la maquina universal de pruebas
- Fig. 22. Piezas de PMMA con evidencia de formación de biopelícula (células y matriz extracelular) teñidas en color azul.
- Fig. 23. Formación de biopelícula sobre irregularidades presentes en el borde del material, se aprecian levaduras y pseudohifas.
- Fig. 24. Formación de biopelícula en material que recibió tratamiento con antimicótico Daktarin
- Fig. 25 Células levaduriformes dispersas en el material, restos de la formación de biopelícula y tratamiento con ondas de choque en combinación con el antimicótico.
- Tabla 1. Fotografías de muestras de acrílico sometidas a 125, 250 y 500 ondas de choque con distintas densidades de energía.
- Gráfica 1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el acrílico utilizado.

Abreviaturas y siglas

μ S: Microsegundos
ACP: Colegio Americano de Prostodoncistas
ADA: Asociación dental americana
CDC: Control de Enfermedades de los Estados Unidos
ESWL: Litotricia extracorpórea por ondas de choque
LOCH: Laboratorio de Ondas de Choque
m/s: Metros por segundo
 mJ/mm^2 : Milijoules por milímetro cuadrado
Mm: Milímetros
MMA: Metacrilato de metilo
MPa: Megapascales
MTT: Metil tiazol tetrazolio
OMS: Organización Mundial de la Salud
PMMA: Polimetilmetacrilato
RPBI: Residuos peligrosos biológico infecciosos
RPM: Revoluciones por minuto
UFC: Unidades formadoras de colonias

I. Introducción

Poder brindar un tratamiento efectivo contra un problema de salud común en pacientes portadores de prótesis totales, como lo es la estomatitis protésica, es un reto para el odontólogo actual (Avon et al 2007).

Se ha demostrado que el uso de prótesis y dentaduras altera las condiciones orales del paciente que las porta, causando queratinizaciones y lesiones en la mucosa de etiología multifactorial, entre las cuales se encuentran las infecciones, alergias y lesiones mecánicas. Otros factores tales como la higiene deficiente, las irregularidades que presentan dichas prótesis y los desajustes favorecen la formación de biopelículas y generan problemas de salud como la estomatitis protésica, la cual se describe como un proceso inflamatorio de la mucosa oral que se asocia íntimamente a la presencia de microorganismos patógenos u oportunistas como *Candida* spp., principalmente la especie *C. albicans* (Pineda et al., 2017) (Gaitán et al., 2016).

Desde su uso en la litotricia extracorpórea, las ondas de choque mostraron efectos positivos en la fragmentación de cálculos renales, lo cual derivó en el incremento del número de investigaciones en física y medicina y a su vez ampliándose a otras áreas como la microbiología y biología molecular (Loske, 2017).

El gel Daktarin (Miconazol) está indicado en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y esofágica en adultos, niños y lactantes de 4 meses de edad y mayores. Su acción abarca hongos dermatofitos, dimórficos, filamentosos (*Aspergillus*), levaduras, hongos causantes de micetoma y bacterias grampositivas, sin embargo la absorción oral es limitada (inferior al 20-30% sobre la dosis administrada) y el valor máximo en suero se detecta a las 4 h, con una vida media de 24 horas (Martín et al, 2004)

Conocer el efecto de las ondas de choque solas y en combinación con el antifúngico oral Daktarin gel sobre biopelículas de *C. albicans* desarrolladas *in vitro* sobre moldes de acrílico termocurable fue el objetivo de esta investigación, siendo la hipótesis de trabajo que las ondas de choque tienen un efecto sinérgico al aplicarse de manera combinada con Daktarin gel como tratamiento antimicótico para debilitar la biopelícula que se forma en prótesis totales.

Para comprobar nuestra hipótesis se siguieron una serie de procedimientos los cuales contemplaron desde la caracterización del material para medir su resistencia a las ondas de choques aplicadas a distintas intensidades hasta la caracterización del gel antimicótico, para corroborar si existía alguna atenuación de las ondas al atravesar dicho material.

Se establecieron parámetros de energía y número de ondas de choque aplicables a los modelos de acrílico termocurable que permitan mantener la integridad del material. Se determinaron condiciones para el crecimiento de células de *C. albicans* y desarrollo de

biopelículas *in vitro* sobre fragmentos de acrílico. Se evaluó el efecto de las ondas de choque, Daktarin gel y la combinación de ambos sobre la viabilidad de las levaduras.

Los parámetros de energía fueron establecidos de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización previamente descrita de los materiales expuestos a ondas de choque (Anexo 1).

El orden de presentación de esta tesis es el siguiente:

El capítulo I tiene como objetivo dar una breve descripción de los experimentos y pasos que seguimos para comprobar nuestra hipótesis.

El capítulo II describe los antecedentes que precedieron a esta investigación, los cuales son un breve estado del arte en el tema.

El capítulo III explica la fundamentación teórica de los conceptos previos relacionadas con el tema, como las ondas de choque, los antimicóticos, los materiales utilizados para la fabricación de prótesis totales en odontología y los métodos que se han descrito para conocer datos sobre el comportamiento de estos.

El capítulo IV incluye dos hipótesis: la de trabajo, que esperamos corroborar y la hipótesis nula.

El capítulo V tiene como finalidad describir los objetivos, tanto el general como los específicos.

En el capítulo VI se describen los materiales y métodos utilizados para llevar a cabo este trabajo de investigación, explicando detalladamente qué técnicas e instrumentos se utilizaron.

En el capítulo VII se presentan los resultados de este trabajo de manera detallada.

En el capítulo VIII se presenta la discusión del trabajo, se exponen la relación de los resultados y se ejerce un análisis crítico para valorar justificadamente los resultados obtenidos.

El capítulo IX enlista las perspectivas para futuras investigaciones asociadas a este proyecto.

ANTECEDENTES

La estomatitis protésica es la enfermedad que frecuentemente ocurre en adultos con prótesis removibles. El edema y la inflamación de la mucosa cubierta por la base de la prótesis son signos objetivos de la enfermedad. Se describen síntomas subjetivos como dolor, picazón y sensación de ardor, pero en la mayoría de los pacientes la estomatitis protésica es asintomática (Čanković et al., 2017).

La colonización de levaduras del género *Cándida*, bacterias, trauma de provocado por prótesis, mala higiene bucal, uso continuo y nocturno de prótesis removibles, reducción de la salivación, valores bajos de pH de la mucosa y la saliva se describen como posibles factores que contribuyen a la estomatitis protésica (Čanković et al., 2017).

La candidiasis oral es más frecuente en pacientes que presentan algún factor de inmunocompromiso, ya sea por patologías (VIH, cáncer y diabetes, entre otros) o por tratamientos como inhalaciones regulares de esteroides y uso prolongado de medicamentos antimicrobianos. También se describe el desarrollo de candidiasis en pacientes con boca seca, con higiene oral inadecuada con o sin prótesis totales (Nakajima, 2020). Las personas geriátricas debilitadas por desnutrición a menudo sufren de candidiasis oral. Además, se ha observado una alta incidencia de aspiración silenciosa durante el sueño en ancianos con neumonía. Estos fenómenos indican que las personas de edad avanzada con enfermedad cerebrovascular, que causan deterioro en sus mecanismos de defensa pulmonar, con frecuencia aspiran bacterias orofaríngeas por la noche y pueden desarrollar neumonía por aspiración. La placa dental parece ser una fuente lógica de las bacterias orofaríngeas que causan infección. La mala salud bucal es un factor de riesgo importante para la neumonía por aspiración en adultos mayores; sin embargo, resultados publicados en trabajos previos confirmaron que la limpieza de la cavidad oral realizada por profesionales de la salud podría afectar la reducción de las bacterias orofaríngeas, sin importar cómo varía el curso de los parámetros clínicos (Ishikawa et al., 2008).

Biopelículas en prótesis

Las prótesis acumulan placa, manchas y cálculos similares a la dentición natural. La falta de limpieza adecuada de la biopelícula acumulada de las dentaduras se asocia con una mayor incidencia de estomatitis de prótesis localizada, además de las enfermedades sistémicas más graves. La placa de la prótesis total es un agregado complejo de bacterias orales, hongos y otros organismos; se estima que contiene más de 10^{11} organismos por miligramo (peso húmedo) que involucra a más de 30 especies diferentes. Si bien existe un consenso general de que la composición de la placa de la dentadura es similar a la de la placa en el paciente dentado, la biomasa puede variar entre individuos y entre sitios en la cavidad oral y sitios en las dentaduras. También se ha determinado que las biopelículas dentales se acumulan más fácilmente en las superficies rugosas de las dentaduras que en las lisas (Felton et al., 2011).

En 2009, el Colegio Americano de Prostodoncistas (APC) formó un grupo de trabajo para desarrollar pautas contemporáneas basadas en evidencia para el cuidado y mantenimiento

de prótesis completas con el fin de evitar la formación de biopelículas de *C. albicans*, que podría conducir a que el paciente sufriera de estomatitis protésica (Felton et al., 2011).

A partir de 1980, el uso de las ondas de choque ha tenido un significado importante en la medicina. Las ondas de presión viajan a través de fluidos y tejidos blandos. Sus efectos físicos ocurren principalmente en las interfaces, es decir, en regiones con un cambio de impedancia acústica (Sturtevant, 1998). Durante su aplicación extracorpórea, se generan presiones de hasta 100 megapascales (MPa) y tensiones (o rarefacciones) de 5-10 MPa con respecto a la presión de equilibrio. La terapia con ondas de choque extracorpóreas tiene numerosas aplicaciones en la medicina moderna; se usan comúnmente para fragmentar cálculos renales (litotricia), así como para desintegrar depósitos de calcio en el páncreas, los conductos salivales y la vesícula biliar (Novak et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado también los efectos antibacterianos de las ondas de choque sobre microorganismos planctónicos (Kerfoot et al., 1992; von Eiff et al., 2000; Gollwitzer et al., 2004; Gerdesmeyer et al., 2005). Su efecto como bactericida es un tema que provoca discusión y controversia. Hazan-Molina et al., en un estudio reportado en 2011, demostraron que las ondas de choque tienen efectos letales sobre las bacterias. Novak et al., (2008), en su investigación que incluyó la aplicación de ondas de choque en cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas, componentes importantes de las biopelículas complejas; utilizando densidades de flujo de energía menores o iguales a 3 mJ/mm², reportaron que las ondas de choque fueron capaces de desagregar a las bacterias de las biopelículas e inhibieron selectivamente a dos de los principales patógenos asociados con infecciones orales y sistémicas. Si bien, las biopelículas fueron estructuralmente resistentes al antibiótico, las bacterias se volvieron susceptibles a éste después del tratamiento con ondas de choque, incrementando la sensibilidad de 100 a más de 1,000 veces, atribuyendo dicho efecto a la acción conjunta de las ondas de choque y antibióticos (Novak et al., 2008).

Gollwitzer y colegas reportaron que la terapia con ondas de choque puede romper las capas de biofilm oral y dispersar microorganismos a lo largo de los tejidos circundantes provocando susceptibilidad a los agentes antibacterianos, por lo tanto podría facilitarse el acceso de los antibióticos a zonas avasculares. Además, concluyeron que las infecciones no deberían ser consideradas una contraindicación para recibir terapia con ondas de choque (Gollwitzer et al., 2004).

En 2009, Petrou y colaboradores, realizaron cuatro conjuntos de experimentos por duplicado, en los que las células de *C. albicans* fueron introducidas en un músculo animal contenidas en un cilindro semisólido de viscosidad similar al pus, para poder imitar las condiciones durante una infección. Se trataron con ondas de choque en diversos entornos utilizando un litotritor Storz Modulith SLX-F2 (Storz Medical, Tägerwil, Suiza). Todas las configuraciones dieron como resultado la muerte bacteriana con una tasa del 90% cuando se aplicaron 4000 ondas de choque a 3 Hz y una densidad de flujo de energía de magnitud 6 (adimensional, referida a dicho litotritor) y gran foco. Las ondas de choque también causaron un efecto físico en el músculo en la interfase de diferentes viscosidades, se cree que esto se debe a un fenómeno que no se observa normalmente en la situación clínica

debido al flujo sanguíneo de los tejidos circundantes que puede disipar el calor (Petrou et al., 2009).

En 2015, otros estudios demostraron que la exposición breve a las ondas de choque rompía la matriz de polisacáridos que rodea la biopelícula, liberando bacterias y posiblemente aumentando el acceso al antibiótico (Gnanadhas et al., 2015).

III. FUNDAMENTACION TEÓRICA

Biopelículas

Una biopelícula se define generalmente como un agregado de microorganismos adherentes o sésiles a una superficie biótica o abiótica, incrustada dentro de una matriz de sustancia polimérica extracelular (Wi et al., 2018). Estas comunidades microbianas se adhieren fuertemente a las superficies y entre sí y están protegidas por dicha matriz extracelular compuesta principalmente de polisacáridos (Fig. 1). Aquí las células muestran una mayor resistencia a diversas sustancias y desarrollan diferentes fenotipos, en comparación con las células planctónicas o libres y están asociadas con la persistencia de infecciones (Costa et al., 2017).

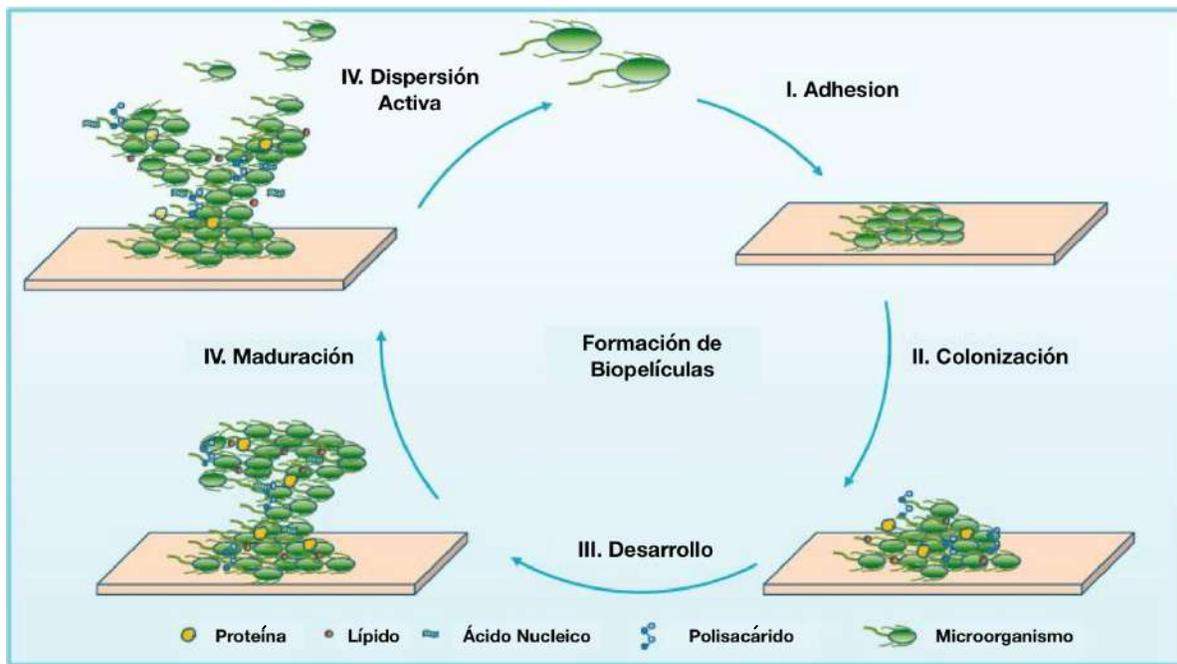


Fig. 1. Modelo de formación de biopelículas microbianas la cual consta de cinco etapas distintas (modificada de Yin et al 2019).

Aunque las biopelículas fueron descritas por primera vez por Antoni van Leeuwenhoek, la teoría que describe el proceso de establecimiento de las biopelículas se desarrolló hasta 1978 (Donlan et al., 2002). Recientemente, utilizando herramientas como la microscopía electrónica de barrido y la microscopía de barrido láser confocal; las biopelículas se han descrito como comunidades complejas de células cuya matriz polimérica contiene canales de agua abiertos. Aunque la evidencia epidemiológica apunta a las biopelículas como fuente de diversas enfermedades infecciosas, los mecanismos exactos por los cuales los microorganismos asociados a las biopelículas provocan enfermedades son poco

conocidos. Sin embargo, se han propuesto algunos, entre ellos, el desprendimiento de células o agregados celulares, la producción de endotoxinas, el aumento de la resistencia al sistema inmunitario del huésped y la provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes (Donlan et al., 2002).

Una característica importante de las biopelículas radica en la producción de una matriz extracelular que permite la adhesión célula a célula y su agregación, así como su adhesión y avance en diversas superficies. Dicha matriz, funciona como una barrera tridimensional de protección contra las amenazas externas, incluidos los mecanismos de defensa del huésped y la acción de tratamientos antimicrobianos que pueden ser antibióticos, desinfectantes o germicidas (Kernien et al., 2018). Los mecanismos responsables de la resistencia pueden involucrar uno o más de los mencionados a continuación: (1) penetración retardada del agente antimicrobiano a través de la matriz de la biopelícula, (2) tasa de crecimiento alterada de sus organismos y, (3) otros cambios fisiológicos (Donlan et al., 2002). Desde el punto de vista médico, la función más relevante de la matriz extracelular se debe a su capacidad de actuar como una barrera física entre los microorganismos de la biopelícula, el sistema inmunitario y a menudo, los medicamentos utilizados para el tratamiento. Las biopelículas proporcionan un refugio seguro para las células fúngicas y pueden actuar como reservorios de fuentes persistentes de infecciones (Kernien et al., 2018).

De acuerdo con Zabicky (2017), las características fundamentales de las biopelículas son:

- Estructura tridimensional: La cual es altamente compleja debido a la formación de diferentes estructuras como huecos, canales, cavidades, poros y filamentos.
- Formadas por una o más especies en la misma biopelícula.
- Desarrolladas en las interfases del sistema (sólido/líquido, líquido/aire, líquido/líquido o sólido/aire).
- Son estructuras heterogéneas dependientes del ambiente circundante.
- Cuentan con un sistema de canales denominado “sistema circulatorio”.
- Confieren resistencia a los microorganismos contra agentes antimicrobianos y el sistema inmunológico del hospedero.

La cavidad oral

La cavidad oral está constituida de un conjunto de estructuras anatómicas las cuales están delimitadas por los labios anterior e inferior, la orofaringe en posición posterior, los paladares duros y blandos en límite superior, la lengua y el piso de la boca en el inferior y las mejillas lateralmente. Entre la piel de la mejilla y la mucosa oral se encuentran músculos que actúan para facilitar la expresión facial, el movimiento de la boca y la competencia oral. Las estructuras esqueléticas, a saber, la mandíbula y el maxilar, mantienen la apariencia de la cara inferior y media (Cheng et al., 2018). Un individuo adulto y sano, puede tener hasta 32 dientes en dicha cavidad. Hay 20 piezas dentales primarias en la infancia y su recambio por las piezas permanentes inicia generalmente a los 6 años. Éstas se clasifican en incisivos centrales y laterales, caninos, premolares y molares. Cada diente se divide en 2 partes, la corona y la raíz. En la corona, la parte exterior está cubierta por esmalte, la sustancia más dura del cuerpo; inmediatamente por debajo se encuentra la dentina, la cual

forma la mayor parte del diente y puede ser sensible si se pierde el esmalte protector. El tejido blando que contiene el suministro de sangre y nervios al diente (pulpa) se aloja dentro de la dentina, extendiéndose desde la punta de la raíz hasta la corona. Una capa de cemento cubre la raíz, lo que ayuda a unir el diente a la cavidad ósea. Las estructuras de soporte de los dientes (periodonto) incluyen el ligamento periodontal, el tejido gingival, los huesos, la sangre y los nervios (Madani et al., 2014) (Fig. 2).

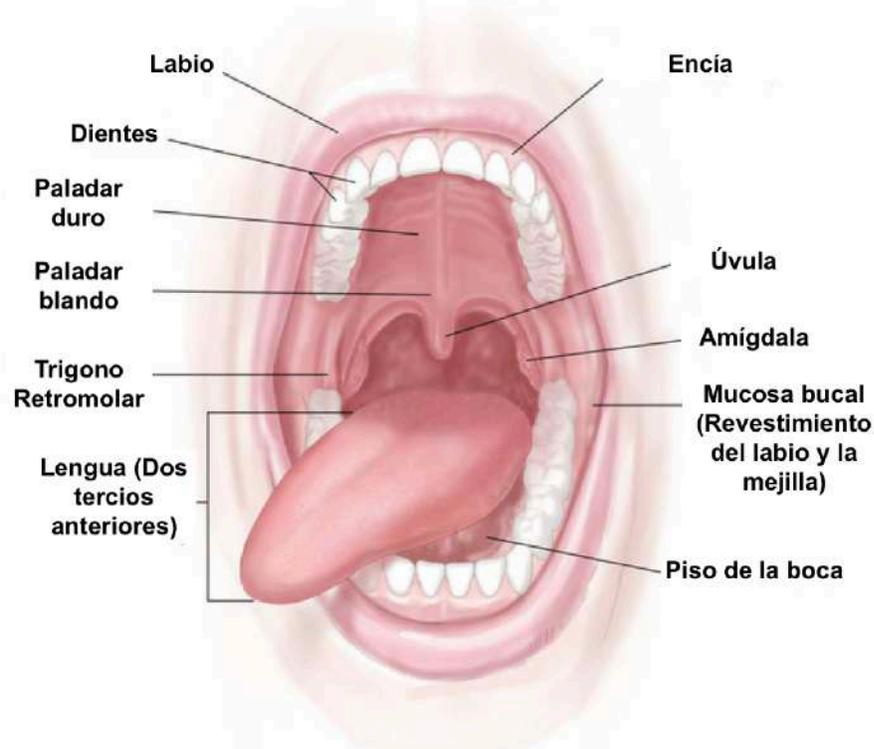


Fig. 2 Anatomía de la cavidad oral (modificada de Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration, 2012)

La cavidad bucal alberga también a un grupo diverso de microorganismos, incluyendo numerosas especies de bacterias, virus, hongos, arqueas y protozoos (Rodríguez Acosta, 2015). En el grupo de los protozoos se encuentran dos especies como parte del microbioma normal: *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax*. El número de estos organismos aumenta en sujetos con mala higiene bucal y enfermedad gingival y alguna vez se consideraron patógenos potenciales, aunque en la actualidad se consideran saprófitos inofensivos (Wade, 2013). El viroma oral, el cual se asocia principalmente a enfermedad, incluye virus como el del herpes simple (patógeno de la estomatitis gingival herpética y el herpes labial), el virus de la varicela zoster (patógeno del herpes zoster) y el virus del papiloma humano (patógeno de los papilomas) (He et al., 2015). Las levaduras del género *Candida* se pueden considerar residentes normales de la microbiota comensal en cavidades de individuos sanos, es decir existen sin causar daño en las membranas mucosas. Estos hongos también están asociados a tracto gastrointestinal, órganos reproductores, piel y vagina. Se ha reportado que cuando ocurre un desequilibrio en las relaciones bióticas que favorecen el crecimiento excesivo de una especie de *Candida* se convierte en una micosis oportunista llamada candidiasis (Rodríguez Acosta, 2015).

Levaduras del género *Candida*

Estos microorganismos se han convertido en un importante problema de salud pública. El espectro de enfermedades causadas por estas especies varía desde infecciones vaginales, que afectan hasta al 75% de las mujeres al menos una vez en su vida, hasta infecciones profundas en pacientes hospitalizadas que conducen a altas tasas de morbilidad y mortalidad (Poulain, 2015).

C. albicans es parte de la microbiota humana. Es un hongo comensal generalmente inofensivo que puede actuar como un organismo oportunista en individuos inmunocomprometidos o con algún factor de riesgo. Como patógeno oportunista, *Candida* sp., puede adaptarse rápidamente a los cambios microambientales en los huéspedes, incluso cuando la biodisponibilidad de nutrientes está restringida (Dadar et al., 2018). Se ha descrito que estas especies comensales tienen una función relevante en la digestión de los azúcares, mediante un proceso de fermentación (Ryan et al., 2004). Alteraciones del delicado equilibrio entre la microbiota y el huésped, que resultan de variaciones locales, por ejemplo, cambios de pH, cambios nutricionales, el uso de antibióticos o alteraciones en el sistema inmunitario (asociados al establecimiento de una infección o a la aplicación de terapias inmunosupresoras), pueden permitir a *C. albicans* proliferar rápidamente y causar infección (Gulati et al., 2016).

Establecimiento de biopelículas en cavidad oral

La mayoría de las investigaciones de biopelículas dentales se han centrado en las bacterias y han prestado menos atención a los hongos, siendo las levaduras, especialmente las especies pertenecientes al género *Candida*, los microorganismos comensales en la cavidad oral presentes hasta en el 50% de individuos sanos dentados (Dige et al., 2019). Se ha descrito que las biopelículas de *C. albicans* se componen principalmente de células con dos morfologías (levadura e hifas). Siendo su establecimiento un proceso secuencial que implica la adhesión al sustrato (superficie abiótica o mucosa), seguido de la proliferación de células sobre la superficie y la inducción de la formación de hifas (Fanning et al., 2012).

La resistencia de las biopelículas conlleva importantes consecuencias clínicas para el desarrollo de tratamientos contra éstas. Adicionalmente, la dispersión de las células planctónicas representa una de las características del estilo de vida de las biopelículas y en el caso de *C. albicans*, las células dispersas son responsables de la candidemia y la diseminación que conducen al establecimiento de una enfermedad invasiva (Wall et al., 2019). Las especies de *Candida* que se desarrollan formando biopelículas, se caracterizan por su elevada resistencia a los fármacos antifúngicos y a los mecanismos de defensa del hospedador. De acuerdo con lo reportado por Costa y colaboradores se ha visto que las biopelículas de hongos son hasta 1000 veces más resistentes a los agentes antifúngicos que las células planctónicas (Costa et al., 2017). Del Pozo y colaboradores han demostrado que las biopelículas de *Candida* son resistentes a la Anfotericina B, al Desoxicolato, al Fluconazol, a la Flucitosina, al Itraconazol y al Ketoconazol (Del Pozo et al., 2016). A la fecha no se ha descrito un mecanismo único que explique la resistencia asociada a las biopelículas de *Candida* spp., y se ha propuesto la combinación de varios mecanismos entre los que se destacan los siguientes: a) restricción en la penetración del antibiótico a

través de la matriz de la biopelícula, b) presencia de enzimas catalizadoras del fármaco antifúngico, c) existencia de sistemas de señalización intercelular (*quorum sensing*) capaces de generar respuestas de estrés, d) desarrollo de respuestas de estrés a condiciones ambientales hostiles, e) sobreexpresión de genes implicados en mecanismos de resistencia, f) generación de microambientes hostiles a la acción antifúngica en el interior de la biocapa, con baja tensión superficial de oxígeno, capaces de inactivar los fármacos antifúngicos, g) presencia de una tasa de crecimiento alterada (fase de crecimiento cero, estado estacionario o estado latente) (Del Pozo et al., 2016).

En el área odontológica resulta de suma importancia conocer la epidemiología de los problemas de salud oral. Entre los más importantes se encuentra el edentulismo, una afección que involucra la pérdida de piezas dentales y modificando por tanto la función (masticación y deglución), la estética y la fonación. El edentulismo obliga a los pacientes a utilizar prótesis removibles, con la finalidad de reemplazar las piezas perdidas (Fig. 3).

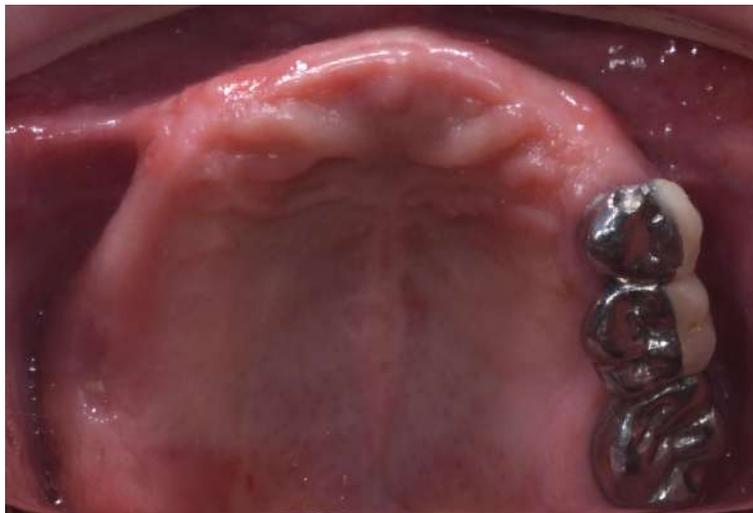


Fig. 3. Paciente con edentulismo en maxilar (fotografía propia).

La primera causa de pérdida de órganos dentarios es la caries dental que se caracteriza por ser una enfermedad transmisible, pandémica, progresiva e irreversible. En ésta se involucran factores etiológicos moduladores, tales como la salud general, el nivel socioeconómico y el grado de instrucción, entre otros. La segunda causa de edentulismo son los problemas periodontales, que se manifiestan a partir de la adolescencia para continuar desarrollándose como resultado de factores económicos y culturales que confluyen. Un ejemplo, lo constituyen los malos hábitos de higiene, los cuales son mejores en los grupos sociales favorecidos; esta medida fácil y accesible está relacionada con aspectos culturales y de acceso a servicios (Luengas et al., 2016). Es por esto, que la odontología rehabilitadora se ha especializado en la realización de tratamientos en pacientes con alteraciones del sistema estomatognático independientemente del nivel de complejidad. Se encarga de devolver la función, estética y la armonía del sistema estomatognático mediante el uso de prótesis dentales de tipo fijo, removable y/o total en remplazo a las piezas dentarias perdidas (Gutiérrez et al., 2015).

De acuerdo con el glosario de términos prostodónticos, una prótesis se define como un reemplazo artificial de una parte de la anatomía humana que restaura la forma, la función y la estética, mientras que una prótesis dental es definida como la sustitución de los dientes naturales en el arco y sus partes asociadas por sustitutos artificiales (Glosario de términos prostodonticos, primera edición, 2007).

Las dentaduras crean un ambiente que favorece la localización y el desarrollo de organismos potencialmente virulentos. Además de aislar la mucosa subyacente de la acción de autolimpieza de la musculatura oral, se desarrollan condiciones anaeróbicas y ácidas en la superficie de contacto de los tejidos de una dentadura que promueve la proliferación de levaduras (Pusateri et al., 2009).

El uso de prótesis y dentaduras altera las condiciones orales, causando queratinización y lesiones en la mucosa cuya etiología puede ser infecciosa, mecánica o alérgica. Otros factores tales como la higiene deficiente, las irregularidades superficiales, los desajustes y la presión negativa en la zona de contacto prótesis-mucosa favorecen la formación de biopelículas, permitiendo la acción de microorganismos asociados a ella y generando problemas de salud como lo es la estomatitis protésica, descrita como un proceso inflamatorio de la mucosa oral de etiología multifactorial que se asocia íntimamente a la presencia de microorganismos como *Candida spp.*, principalmente de *C. albicans*. La reacción eritematosa puede ser focal o difusa y la mucosa puede presentar una superficie lisa o hiperplasia papilar (Pineda et al., 2017; Gaitán et al., 2016) (Fig. 4).



Fig. 4. Inflamación intensa, hiperemia de la mucosa y aspecto nodular relacionado a estomatitis protésica (Araya et al., 2018).

Se ha demostrado que la prevalencia de la estomatitis de la dentadura varía entre el 22.5 % y el 65% entre los usuarios de prótesis (Avon et al., 2007). En el mundo se reporta una alta incidencia del padecimiento, se destaca que en los pacientes de entre 65 y 69 años con estomatitis de la dentadura, existe una combinación de formación de biopelícula entre la mucosa biótica (el huésped) y la superficie abiótica de la dentadura (Rodríguez Acosta, 2015).

C. albicans es considerada una especie productora de infecciones en la cavidad oral. En la literatura se reporta que alrededor de entre el 30% y 50% de las personas portan este microorganismo como comensal; la tasa aumenta con la edad y la presencia de prótesis dentales. Existen otras especies como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, que también hacen parte de mucosa oral (Pineda et al., 2017). Entre las especies de *Candida* productoras de biopelícula más reportadas se incluyen *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Sus construcciones contienen matriz extracelular pero no producen hifas verdaderas (Fanning et al., 2012).

Estos microorganismos han sido implicados en procesos patológicos y de adhesión a superficies como la mucosa oral y materiales dentales. *C. albicans* ha sido estudiada en dichos procesos de adhesión y su importancia en la patogénesis de la estomatitis protésica. Se ha descrito que la adherencia de los microorganismos al sustrato depende de factores tales como la rugosidad de la superficie, la película salival, el tipo de material de la prótesis, entre otros (Pineda et al., 2017) (Fig. 5). Una vez que existe un establecimiento de *C. albicans*, el uso de prótesis removible dificulta la llegada de anticuerpos salivales, condicionando la creación de un medio ácido y anaerobio que favorece su proliferación, adhesión y patogenicidad, activando fosfolipasas extracelulares y proteinasas ácidas de *Candida* spp. Las especies de esta levadura también son favorecidas por su capacidad para evadir mecanismos de defensa del hospedero, colonizando y persistiendo en el epitelio por medio de secreción de enzimas hidrolíticas y transición fenotípica de blastoconidios a hifas o pseudohifas (Lee et al., 2015).

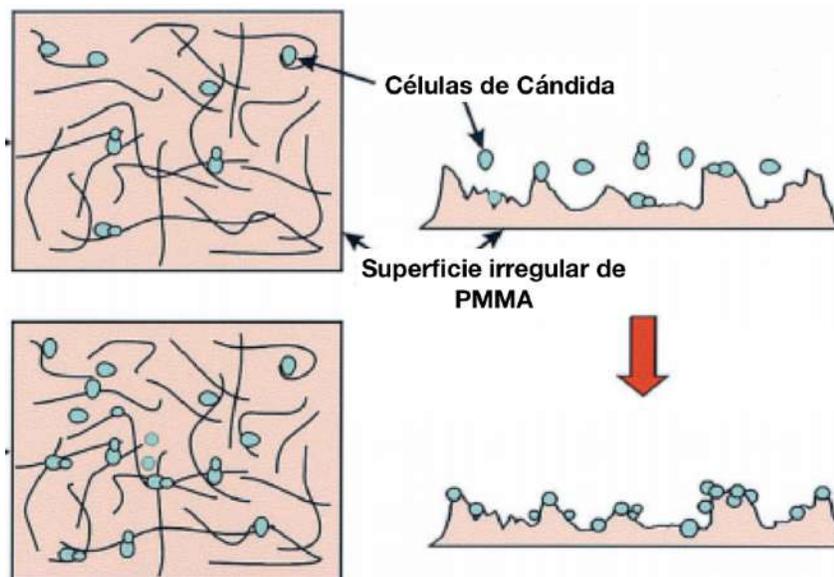


Fig. 5 Representación esquemática del desarrollo de biopelículas de *C. albicans* en superficie irregular de PMMA (Tomada y modificada de Chandra et al., 2008)

Acrílicos

Las resinas acrílicas se usan desde el siglo XIX, en la rehabilitación de pacientes con edentulismo parcial y total, debido a su excelente estética y aspecto natural. Actualmente, se emplean nuevas técnicas y sistemas de polímeros acrílicos en la elaboración de bases de dentaduras, las que son sometidas a un tratamiento superficial conocido como «acabado y pulido convencional» (Fig. 6). El terminado de la superficie de una base de dentadura se ve afectado al realizar ajustes antes de su colocación final en la boca, afectación que debe ser minimizada para obtener superficies lisas, tersas y brillantes (Rivera et al., 2014).

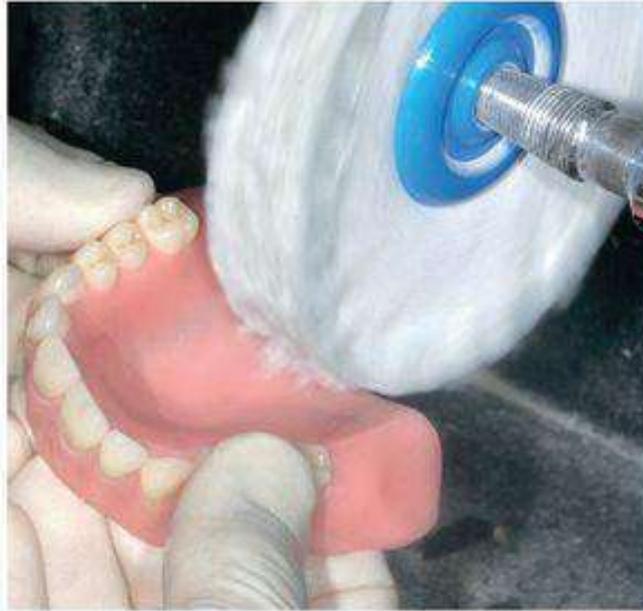
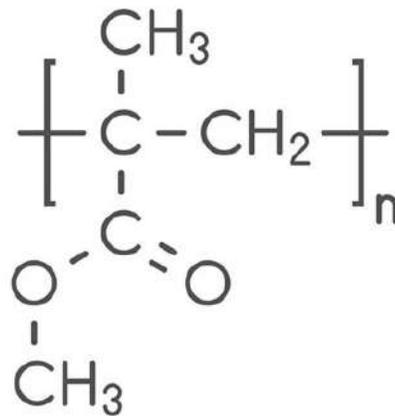


Fig. 6. Pulido de prótesis total (imagen tomada de Läkamp, 2011)

Entre las propiedades deseables en un acrílico se encuentra la de alta resistencia mecánica, la cual varía para las bases según la composición de la resina, el proceso técnico y el medio en que funciona la prótesis. Por lo general, las propiedades tensionales de la resina se miden por un ensayo de resistencia transversal como lo describe la especificación número 12 de la American Dental Association (ADA) (Villavicencio, 2015).

Las resinas acrílicas de interés en odontología son las derivadas del ácido acrílico y del ácido metacrílico, que polimerizan por adición y presentan propiedades adecuadas en cuanto a su estabilidad fisicoquímica, manipulación y estética (Argueta et al., 2018). Por otro lado, el acrílico termopolimerizable es uno de los materiales más utilizados en la práctica odontológica. Con éste se fabrican desde dientes hasta bases para dentaduras parciales o totales; se obtiene mediante la polimerización de polimetilmetacrilato (PMMA) pre-polimerizado mezclado con monómero de metacrilato de metilo (MMA) (Wieckiewicz et al., 2016) (Fig. 7).



PMMA

Fig. 7. Fórmula estructural del PMMA (Wikipedia 2021).

El acrílico termopolimerizable requiere de energía térmica para polimerizarse utilizando un baño de agua de temperatura controlada. Estas resinas presentan ventajas como estabilidad dimensional, características en el manejo, color y compatibilidad con los tejidos bucales (Villavicencio, 2015). Generalmente, este acrílico está formado por PMMA y tiene como iniciador de la polimerización al peróxido de benzoílo. La química de las resinas autocurables es idéntica a las termocurables excepto en que el curado es iniciado por una amina terciaria (dimetil-p-toluidina o ácido sulfónico) (Villavicencio, 2015).

Estos materiales se suministran en forma de polvo y líquido. El polvo contiene cuentas de PMMA prepolimerizadas finamente divididas y el líquido contiene metacrilato de metilo (MMA). La popularidad del PMMA como material base para dentaduras se atribuyó a su facilidad de procesamiento, bajo costo, peso ligero, excelentes propiedades estéticas, baja sorción de agua y solubilidad; y capacidad de ser reparado fácilmente (Alla et al., 2015).

Antimicóticos

En comparación con el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, el desarrollo de fármacos antifúngicos o antimicóticos es más desafiante. Lo anterior se debe a que los hongos son organismos eucariotas y muchos objetivos potenciales para la terapia también se encuentran en humanos. Esto representa un riesgo sustancial de toxicidad del huésped. Actualmente, de acuerdo con su mecanismo de acción los agentes antifúngicos pueden dividirse en cuatro clases (azoles, equinocandinas, polienos y análogos de pirimidina). Se administran por vía oral, tópica o intravenosa para el tratamiento de infecciones fúngicas (Campoy et al., 2017).

La mayoría de los antimicóticos interfiere con la biosíntesis o la integridad del ergosterol, el principal componente en la membrana de los hongos. Otros causan disrupción de la pared celular (Rivas et al., 2009).

Los numerosos medicamentos antimicóticos incluyen los azoles (clotrimazol, econazol, ketoconazol, oxiconazol y miconazol), que están disponibles como cremas y lociones aplicadas (Werth, 2020). Los azoles son, con mucho, los fármacos antimicóticos más comunes en uso clínico. Son muy utilizados en el tratamiento y la prevención de micosis debido a su actividad de amplio espectro (Campoy et al., 2017).

El Daktarin (miconazol gel oral) tiene como principio activo un azol. Estos fármacos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- α -dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (Gregorí, 2005).

Daktarin gel se utiliza para el tratamiento de las infecciones de la boca, la faringe, y del tubo digestivo causadas por especies de *Candida* en adultos, adolescentes y niños a partir de los 4 meses de edad (P.R. Vademécum online, México). Se ha demostrado que este fármaco además de tener un espectro de acción contra hongos tipo levadura también tiene actividad contra microorganismos Gram positivos (Cardozo et al., 2003). Este autor también menciona que se han obtenido resultados exitosos en pacientes con estomatitis protésica inducida por *Candida* tratados con Daktarin entre 3 y 4 veces al día, mostrando efectividad con la disminución de organismos presentes (Cardozo et al., 2003)

Ondas de choque

En el área de la física, la expresión “onda de choque mecánica” se usa para definir la propagación de un frente de choque en un medio material que puede ser sólido, líquido o gaseoso. La generación de un frente de choque en cualquiera de dichos medios ocurre por un cambio súbito de su estado termodinámico; es decir, por variaciones abruptas de la presión, densidad y temperatura, generalmente debidas a una liberación repentina de energía en el medio (Fernández G., 2008).

También puede decirse que una onda de choque de tipo mecánico es una perturbación energética que viaja a velocidad supersónica, causando cambios bruscos de presión, densidad y temperatura en el medio donde se propaga.

Las ondas de choque fueron inicialmente estudiadas en la investigación aeroespacial para corregir problemas de aviación de la época, encontraron después importancia en la bioingeniería. Éstas son generadas en agua o en medios con impedancia acústica similar y son aplicadas de manera extracorpórea. Se usan como terapia no invasiva en litotricia, en la curación de heridas, en el tratamiento de la necrosis avascular, así como para el tratamiento de varias condiciones en ortopedia, traumatología y cardiología (Gnanadhas et al., 2015; Loske, 2017). También se ha conceptualizado a las ondas de choque como una sucesión de frentes de choque, repetidos con cierta frecuencia y cada uno de ellos surge cuando un medio elástico, como el agua o el aire, es sometido a una compresión rápida,

como la que ocurre en una explosión, en el paso de un avión supersónico, la caída de un rayo u otros fenómenos que producen cambios extremadamente rápidos en la presión (Loske, 2007).

Desde la década de los años setenta en el siglo pasado, Chaussy y colaboradores, contribuyeron en el desarrollo de la litotricia extracorpórea por ondas de choque (ESWL) al dirigir un frente de alta presión y concentrarlo en un área focal. En clínica, para desintegrar los cálculos renales, la amplitud del pulso positivo de la onda de choque debe ser de al menos 8 MPa (Gnanadhas et al., 2015).

Estas ondas de presión se propagan de manera similar a las ondas acústicas. Las ondas de choque que genera un litotritor consisten en un pico de presión corto (hasta 150 MPa, con duración de microsegundos) y un pulso de descompresión posterior, con un pico de tensión de hasta -30 MPa (Fig. 8). A partir de su uso en litotricia extracorpórea se incrementó el número de investigaciones en física y medicina, ampliándose a otras áreas como la microbiología y biología molecular (Loske, 2017).

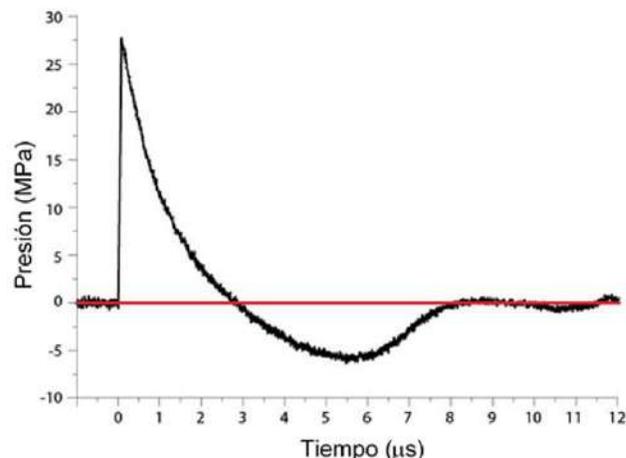


Fig. 8. Gráfica del cambio de presión que produce una onda de choque en el tiempo (Loske et al., 2017).

Para aplicaciones clínicas se usan principalmente cuatro principios para la generación de ondas de choque: el electrohidráulico, el electromagnético, el piezoeléctrico y el balístico (Coleman et al., 1988; Loske, 2017).

El litotritor electrohidráulico genera una onda de choque de expansión esférica por una descarga de alto voltaje entre dos electrodos bajo el agua. El plasma resultante se expande y colapsa rápidamente produciendo una onda de choque que se propaga esféricamente y es enfocada hacia una región relativamente pequeña por medio de un reflector metálico elipsoidal (Fig.9).

En el generador electromagnético se produce un campo magnético súbito, que repele una membrana metálica que genera ondas planas de alta presión en un fluido. Las ondas son enfocadas por una lente acústica (Fig.10). También existen equipos electromagnéticos en los cuales se producen ondas cilíndricas que inciden en un reflector parabólico para ser concentradas (Coleman et al., 1988; Matlaga, 2012).

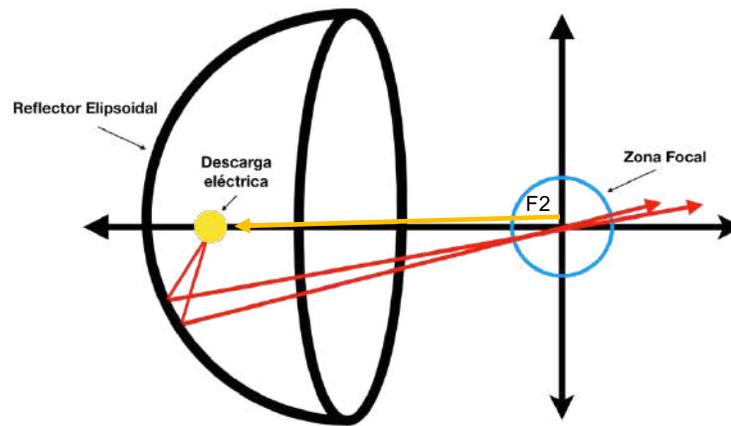


Fig. 9. Generador electrohidráulico, el cual consta de un reflector elipsoidal conectado a un capacitor mediante un interruptor de alto voltaje. La energía liberada produce una burbuja de vapor y una onda de choque la cual es focalizada en el segundo foco elipsoidal (F2).

Un dispositivo que también utiliza ondas de choque extracorpóreas, pero divergentes en vez de concentradas y que se aplica en ortopedia y traumatología, es la fuente de onda de presión radial o balística. Su funcionamiento es análogo al de los martillos neumáticos usados en la construcción, en los cuales el aire comprimido que entra acelera un proyectil dentro de una pequeña pieza de mano cilíndrica, produciendo un pulso de presión, cuando el proyectil golpea el extremo del aplicador (Loske, 2017).

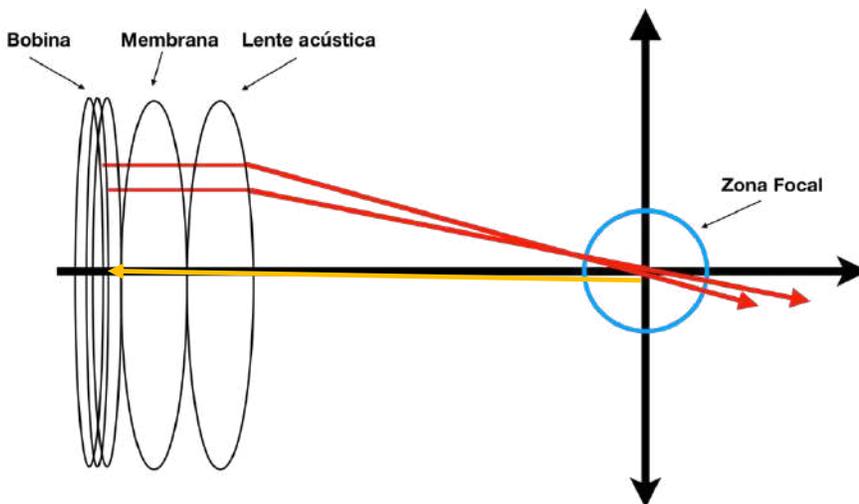


Fig. 10. Generador electromagnético el cual consta de una bobina enrollada en forma de espiral que se haya próxima a una lámina metálica rodeada de agua. La lámina es inducida a flexionarse y emite una onda, la cual es focalizada por medio de una lente acústica ubicada en frente

Los generadores piezoeléctricos, del tipo usado en este estudio, generan ondas de choque por la superposición de ondas de presión que se forman al aplicar una descarga eléctrica a un arreglo de cristales piezoeléctricos conectados en paralelo y montados en la parte cóncava de un soporte de aluminio con forma de casquete esférico, según se muestra en la figura 11. Las ventajas de los generadores piezoeléctricos para aplicaciones en odontología incluyen una región focal pequeña, una vida útil larga y la posibilidad de un tratamiento sin anestesia debido a la densidad de energía relativamente baja en la entrada de la piel (Matlaga, 2012).

La densidad de energía es definida como la energía almacenada en una unidad de volumen, es decir representa la cantidad de energía acumulada en un material dado o en una región del espacio (Barco et al., 2012).

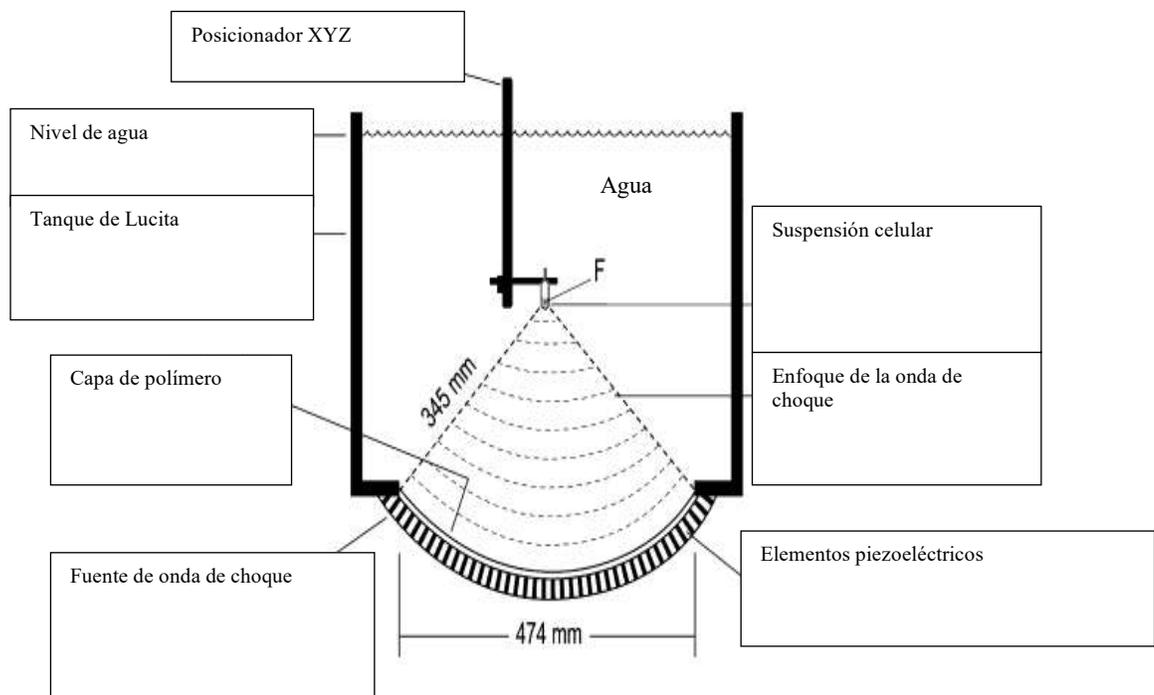


Fig. 11. Esquema de un generador de ondas de choque (figura modificada de López-Marín et al., 2016).

Debido a que los efectos biológicos están relacionados con la forma de la onda de presión, los efectos terapéuticos de las ondas de presión radial pueden diferir de las ondas de choque. Una diferencia entre las fuentes de ondas de choque y las fuentes de ondas de presión radial es la distancia de propagación desde la fuente hasta el objetivo (Loske, 2017).

La terapia de ondas de presión radial es útil en una variedad de indicaciones en ortopedia y traumatología, como son el tratamiento de depósitos de calcio en los tendones, la inflamación de los tendones, así como la curación de huesos y heridas (Loske, 2017)

Las ondas de choque generan efectos mecánicos y biológicos. Los efectos mecánicos pueden ser divididos en dos subtipos (De la Corte et al., 2020):

- *Efectos directos*: según la intensidad del tratamiento, puede haber destrucción mecánica de células, membranas, trabéculas óseas, o estimulación de células por la deformación reversible de la membrana celular.
- *Efectos indirectos*: formación de burbujas de cavitación tras el paso de la onda de choque, las cuales pueden crecer súbitamente y colapsar, generando microjets de alta velocidad (Loske, 2017), así como ondas de choque secundarias.

Entre otros efectos biológicos observados tras la aplicación de ondas de choque, se mencionan la activación de la angiogénesis, el aumento en la producción de colágeno, la regeneración de tejidos y proliferación celular, la proliferación y migración de células madre, reducción en la formación de fibrosis, la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la regeneración cutánea y miocárdica. Además, se sabe que *in vitro* se modifican los flujos transmembrana que regulan reacciones redox a través de cinasas, que regulan la expresión génica (De la Corte et al., 2020).

Algunos estudios experimentales demuestran cambios estructurales reversibles en la formación de colágeno en los tendones (De la Corte et al., 2020). López-Marín y colaboradores en 2016, demostraron la capacidad de las ondas de choque para penetrar diferentes tipos de membranas celulares, incluidas las líneas celulares inmortalizadas embrionarias de riñón (Hek293), líneas celulares derivadas de tumores (MCF-7), y células de cultivo primario difíciles de penetrar.

Por otro lado, se ha descrito que las ondas de choque con densidades de energía bajas (0.03 a 0.11 mJ/mm²) tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio inmediato, incluso a intensidades y tasas de repetición más altas que las utilizadas en litotricia. Las ondas de choque no causan calentamiento significativo del tejido macroscópico, dado que la fuerza mecánica está altamente localizada (Mariotto et al., 2009).

Recientemente, se ha demostrado que, el uso de ondas de choque a bajos niveles de energía pueden promover la curación de lesiones dérmicas y promover la regeneración del hueso alveolar en un modelo de roedor (Novak et al., 2008).

También se usan en ortopedia para facilitar la curación ósea y de afecciones musculoesqueléticas, como fascitis plantar, espolón sintomático del talón, dolor lateral del codo, epicondilitis lateral e hipertonia de las extremidades superiores en personas que han sufrido accidentes cerebrovasculares (Buch et al., 2002).

En la actualidad existen numerosos estudios que muestran los efectos antibacterianos de ondas de choque de alta energía en microorganismos planctónicos. En estos trabajos se describe que las ondas de choque de alta energía tienen actividad antibacteriana directa. Müller y colaboradores (2011), reportaron acción contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. El efecto significativo puede tener relevancia clínica al reducir el crecimiento bacteriano hasta varios niveles logarítmicos, lo

cual depende de la energía, el número de ondas de choque y de los niveles de umbral que deben superarse (Gerdesmeyer et al., 2005).

En muchos casos, los efectos secundarios del paso de la onda de choque, como la cavitación acústica y la emisión de ondas de choque secundarias, son más relevantes que la influencia de la variación de presión inicial. Como ejemplo, las ondas de choque aplicadas en el campo de la urología para el tratamiento de la litotricia, donde las piedras se conminan principalmente debido a la compresión directa, la cavitación acústica, la compresión circunferencial, la tensión de corte y la fatiga (Loske, 2017).

Cavitación

El crecimiento y colapso violento de microburbujas, denominado cavitación acústica, es un fenómeno que puede tener efectos deseados y no deseados, dependiendo de la aplicación clínica específica. Al paso de una onda de choque, el pulso de compresión comprime las microburbujas suspendidas en un fluido. Esto aumenta la presión interna de las burbujas. La diferencia de presión entre el interior y el exterior, así como la subsecuente rarefacción generada por el pulso de descompresión de la onda de choque, producen un crecimiento súbito de cada burbuja. Después de entre 200 y 600 microsegundos éstas colapsan violentamente, generando ondas de choque secundarias. Adicionalmente se generan microchorros de fluido (microjets) de alta velocidad (hasta 700 m/s). Esto sucede debido a que el colapso de las burbujas es asimétrico (Loske 2017). Se ha reportado que estos microjets son los principales responsables del efecto bactericida de las ondas de choque (Loske et al., 2002; Álvarez et al., 2004; Quintero et al., 2008; Álvarez et al., 2008). Cuanto más baja sea la frecuencia de emisión de ondas de choque, es decir, más largo sea el período entre una onda de choque y la siguiente, menos burbujas se encuentran en la zona de tratamiento que pudieran disminuir la energía de las ondas entrantes. La supresión de la cavitación utilizando medios más viscosos que el agua o sobrepresión reduce significativamente la eficacia de la onda de choque para desintegrar cálculos urinarios. El reconocimiento del papel de la cavitación en la conminación de los cálculos ha llevado a esfuerzos para aumentar la energía de colapso de las burbujas de cavitación usando ondas de choque en tándem (Loske, 2017). En este caso se emiten dos ondas de choque con una separación (delay) de entre 50 y 600 microsegundos. Si la segunda onda de choque llega a la región de interés justo en el instante en el que las burbujas, producidas por el paso de la primera onda inician su colapso, es posible aumentar la energía de este colapso y, consecuentemente la emisión de microjets y ondas de choque secundarias (Fig. 12) (Loske, 2017).

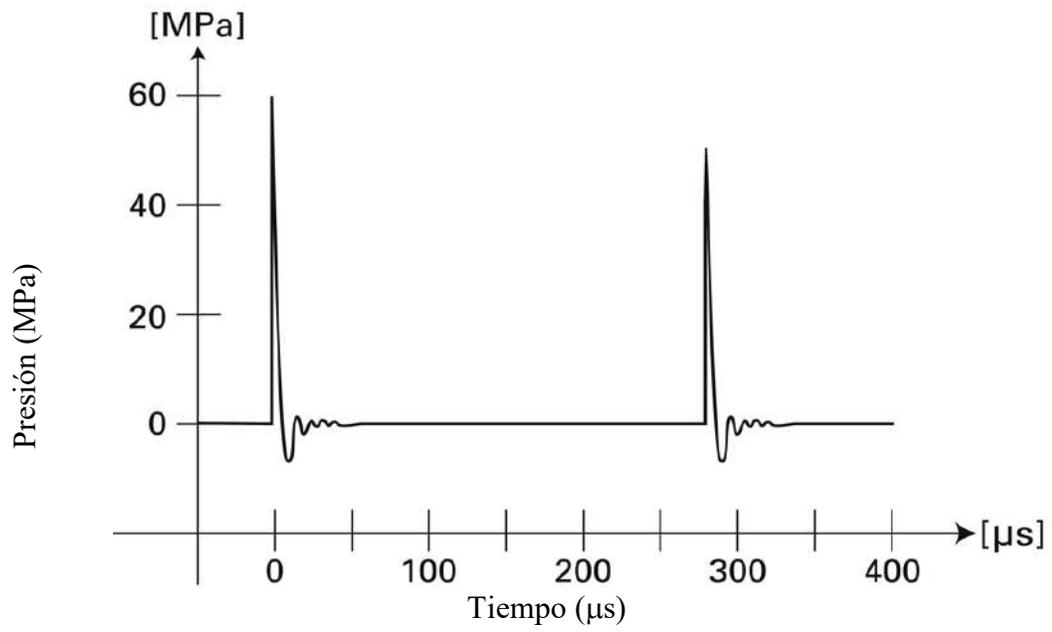


Fig. 12. Esquema de la variación de presión generada por el paso de ondas de choque tándem (Loske et al., 2017)

IV. HIPOTESIS

Hipótesis de trabajo

Las ondas de choque tienen un efecto sinérgico al aplicarse de manera combinada con Daktarin gel como tratamiento antimicótico para debilitar la biopelícula que se forma en prótesis totales.

Hipótesis nula

Las ondas de choque no tienen un efecto sinérgico al aplicarse de manera combinada con Daktarin gel como tratamiento antimicótico para debilitar la biopelícula que se forma en prótesis totales.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Evaluar el efecto de las ondas de choque solas y en combinación con el antifúngico oral Daktarin gel sobre biopelículas de *C. albicans* desarrolladas *in vitro* sobre moldes de acrílico termocurable utilizado para la producción de prótesis totales.

V.2 Específicos

- Establecer parámetros de energía y número de ondas de choque aplicables a los modelos de acrílico termocurable que permitan mantener la integridad del material
- Establecer condiciones para crecimiento de células de *C. albicans* y desarrollo de biopelícula *in vitro* sobre moldes de acrílico termocurable.
- Evaluar el efecto de las ondas de choque, Daktarin gel y la combinación de ambos sobre la viabilidad de células asociadas a biopelículas de *C. albicans* crecida en cultivo sobre acrílico termocurable.

VI. Material y métodos

VI.1 Tipo de investigación

Experimental *in vitro*

VI.2 Unidad observacional

Muestras de 5 especímenes de acrílico termocurable serán destinados a cada grupo y recibirán los siguientes tratamientos:

Grupo 1: sin formación de biopelícula, sin tratamiento de ondas de choque; será destinado como control de esterilidad.

Grupo 2: sin formación de biopelículas, con tratamiento con ondas de choque; será destinado a la observación de efectos mecánicos sobre el material.

Grupo 3: con formación de biopelículas, sin tratamiento con antimicótico o de ondas de choque; será destinado como control de crecimiento de las biopelículas de *C. albicans* en cultivo *in vitro*.

Grupo 4: con formación de biopelícula y tratamiento con ondas de choque; se analizará el efecto mecánico sobre el crecimiento de la biopelícula.

Grupo 5: con formación de biopelícula y tratamiento con antimicótico; se evaluará la resistencia de la biopelícula al efecto del antimicótico.

Grupo 6: con formación de biopelícula y tratamiento con ondas de choque en combinación con el antimicótico; se observará si existe un efecto combinado.

VI.3 Muestra y tipo de muestra

Especímenes de acrílico termocurable de 5 mm de diámetro por 2 mm de espesor, pulidos y sin rugosidades, de acuerdo con las medidas y características descritas en la norma #12 de la ADA.

Especímenes de acrílico termocurable, donde exista crecimiento de *C. albicans*.

VI. Técnicas e instrumentos

Se realizó la resistencia a la flexión de las barras en la máquina universal, los datos fueron capturados en el programa Excel.

VI. Procedimientos

a) Preparación de las muestras

Se fabricaron placas de vidrio de acuerdo a la Nom #12 de la ADA de 6.5 mm de por 6.5 mm y 2 mm de espesor, para fabricar el molde para la producción de las muestras de acrílico, realizando el proceso de enmuflado de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

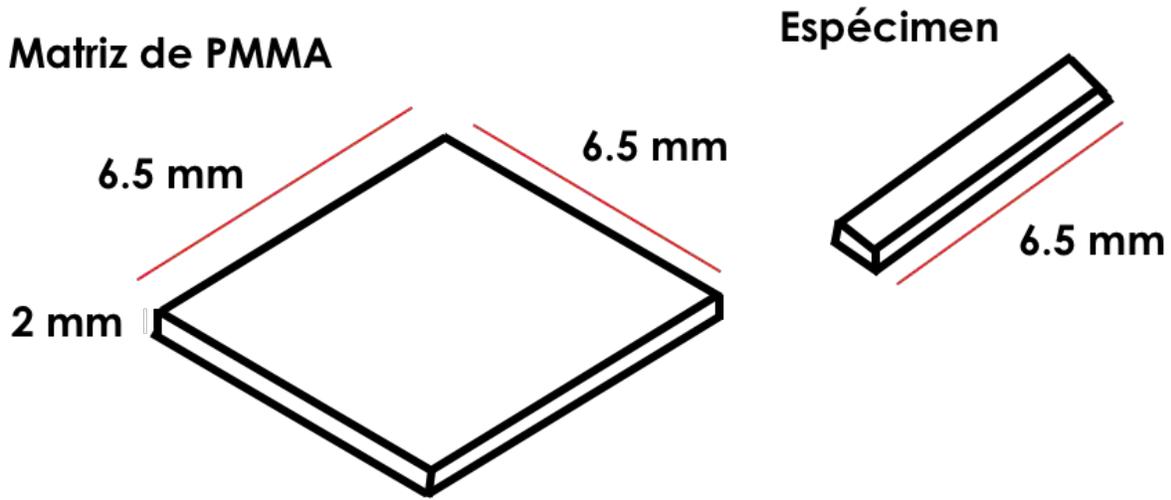


Fig. 13. Modelo de muestras de acrílico termocurable (figura modificada de Swaney et al 1953).

Se produjeron moldes de acrílico termocurable, utilizando una mezcla de polimetilmetacrilato (polvo) y metilmetacrilato (líquido) en una proporción de 22.5 g polvo: 10 ml de líquido según lo indicado por el fabricante. Se siguió el método estándar para la fabricación de prótesis totales que consistió en mezclar con una espátula el polvo y el solvente líquido y dejarlo reposar durante 8 a 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C), en condiciones de baja concentración de oxígeno. Después se colocó la mezcla de resina en la mufla, cerrándola con cuidado, presionándola en una prensa con 80 bar de presión. Posteriormente, ésta se introdujo en baño de agua fría la cual se calentó a 100 °C e incubó durante 45 minutos. La mufla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se procedió a su apertura para la recuperación de las muestras, procediendo posteriormente a cortarlas y pulirlas.

Para ello, se utilizaron fresones para acrílico, mantas y poliacril. Las muestras que no cumplieron con las medidas fueron descartadas.

a) Test de resistencia a la compresión

Cinco muestras se analizaron después de haberlas mantenido 24 horas en almacenamiento con agua destilada a 37 °C enumerando cada una en ambos extremos.

La caracterización de resistencia del acrílico termocurable se realizó utilizando una máquina universal de pruebas mecánicas marca Instron[®] ubicada en el laboratorio de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro,

Se obtuvieron datos de las pruebas mecánicas de compresión para determinar la resistencia del material o su deformación ante un esfuerzo. Para ello, se colocaron las muestras sobre una base metálica con una distancia de 110 mm, centrando la muestra de acuerdo con lo establecido en la norma #12 de la ADA. Para la resistencia a la compresión, se cargaron hasta el fallo utilizando un dispositivo de prueba de flexión de tres puntos. La velocidad de la cruceta fue de 1 mm/min (Fig. 14).

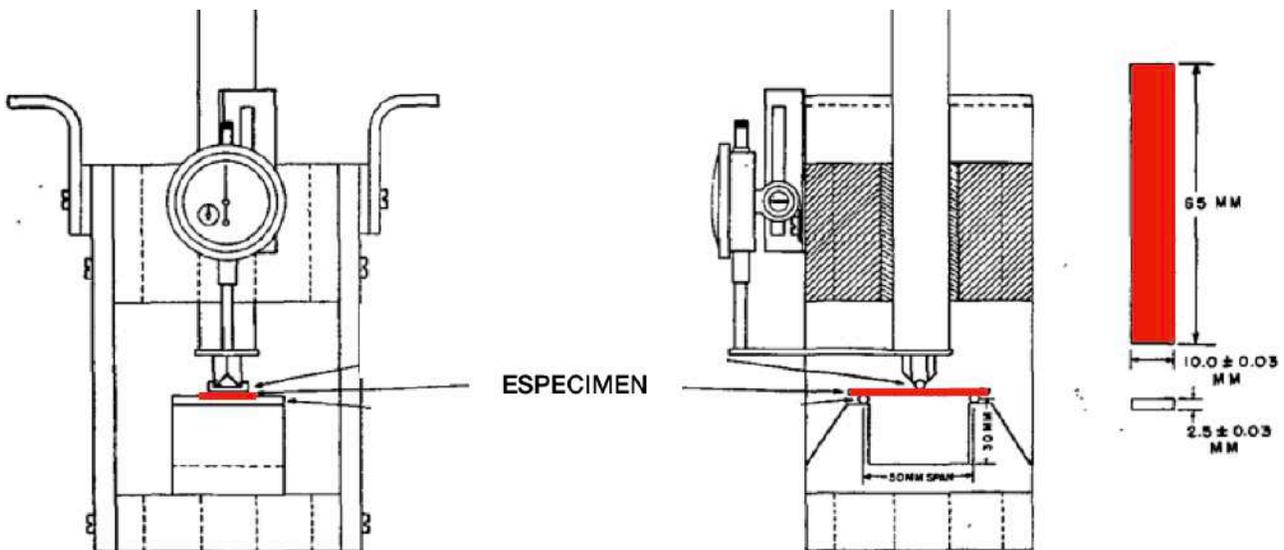


Figura 14. Máquina universal de pruebas sobre la cual se colocan las muestras y se ejerce presión sobre estas a una velocidad de cruceta controlada (figura modificada de Swaney et al., 1953)

Por otro lado, se realizó la caracterización de las piezas de acrílico con la finalidad de evaluar su resistencia al ser sometidas a las ondas de choque. Mientras que, para el gel Daktarin, se obtuvieron datos para la evaluación de su capacidad de funcionar como medio de propagación de las ondas de choque. Ambos parámetros se analizaron para establecer con la mayor precisión posible las presiones efectivas que recibirían las biopelículas y/o el acrílico termocurable, sin causar daños en el material. Para ello, diversos espesores del gel (entre 0.1 y 2 mm) contenidos en empaques flexibles, fueron expuestos a las ondas de choque, midiendo las presiones correspondientes (con y sin el gel). Figuras 15 y 16.



Fig. 15. Daktarin gel



Fig. 16. Osciloscopio Tektronix TDS 3032

Preparación del acrílico (esterilización)

Se realizó el acondicionamiento de las piezas de acrílico para la posterior formación de biopelículas; que consistió en:

- Lavado con detergente alcalino y enjuague 7 veces con agua corriente.
- Enjuague con agua destilada a temperatura ambiente.
- 3 enjuagues con agua destilada a 35 °C grados por cinco minutos cada enjuague.
- 3 enjuagues más con agua Milli-Q estéril.

Completados los lavados se procedió a esterilizar el material con glutaraldehído marca Gafidex al 2% realizando la preparación de la solución desinfectante de acuerdo con lo indicado por el fabricante. Las muestras se sumergieron en la disolución durante 45 minutos, manteniéndolas en campana de extracción.

Se descartó la disolución de glutaraldehído y se realizaron 5 enjuagues de 5 minutos cada uno utilizando agua Milli-Q estéril.

Se almacenaron a T. A. en agua destilada grado MQ estéril hasta su uso.

Formación de biopelículas

Se preparó medio de cultivo con base nitrogenada de levadura más dextrosa (YNBD por sus siglas en inglés). Para ello se pesaron 1.7g/L de base nitrogenada de levadura y se esterilizó por calor húmedo a 121 °C y 15 psi. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se agregó el volumen adecuado de una disolución de dextrosa previamente preparada y esterilizada por filtración la cual debería quedar con una concentración final de 2%.

A partir del cultivo fresco de 24 horas de *C. albicans* en agar dextrosa de Sabouraud, se tomó un inóculo grande y se resuspendió en 13 ml de medio líquido YNBD. Las levaduras se dispersaron suavemente.

Se procedió al conteo utilizando un microscopio óptico marca Olympus modelo BX40, el objetivo 10x y una cámara de Neubauer, el procedimiento consistió en colocar 10 μ l en uno de los extremos de la cámara y se contaron 4 cuadrantes para determinar el número de células suspendida por mililitro de medio (Figura 16). Se ajustó la densidad celular en 0.8-1. $\times 10^7$ levaduras por ml. Posteriormente, con ayuda de una micropipeta, se tomaron 500 μ l de la suspensión celular o medio de cultivo YNBD (dependiendo del grupo de estudio) se colocaron en los pozos de la placa y se llevaron al fondo las muestras de acrílico, utilizando pinzas estériles.

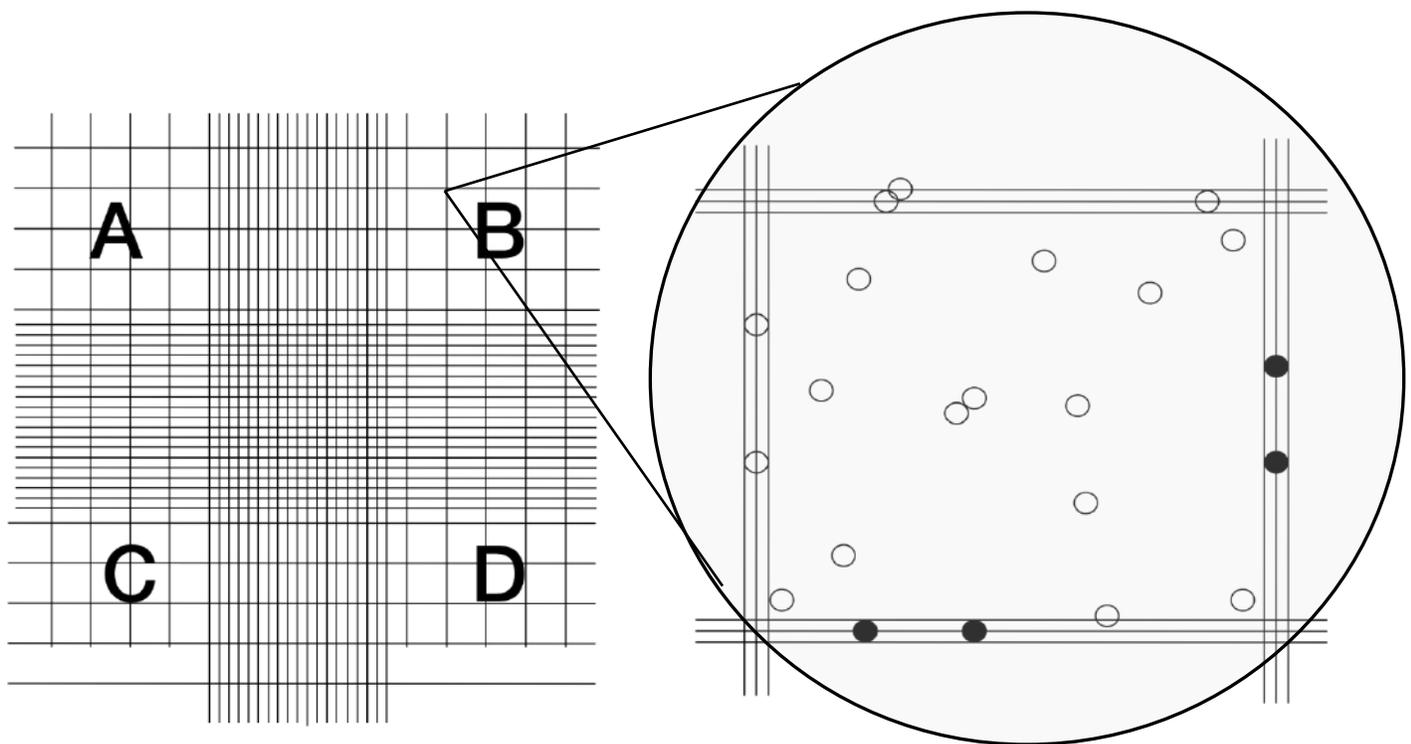


Fig. 17. Conteo en cámara de Neubauer

Factor de la cámara de Neubauer: 1×10^6 células /mL

○ Célula para conteo
● Célula que no cuenta

Se colocaron 4 piezas deacrílico por pozo, correspondientes a cada grupo de estudio previamente descrito en una placa de 24 pozos marca Nest Scientific©. A cada pozo se agregaron 0.5 mL de medio YNBD y se dejó uno de los pozos solo con medio de cultivo como control (Fig. 18). Con ayuda de una espátula estéril se sumergieron las piezas.

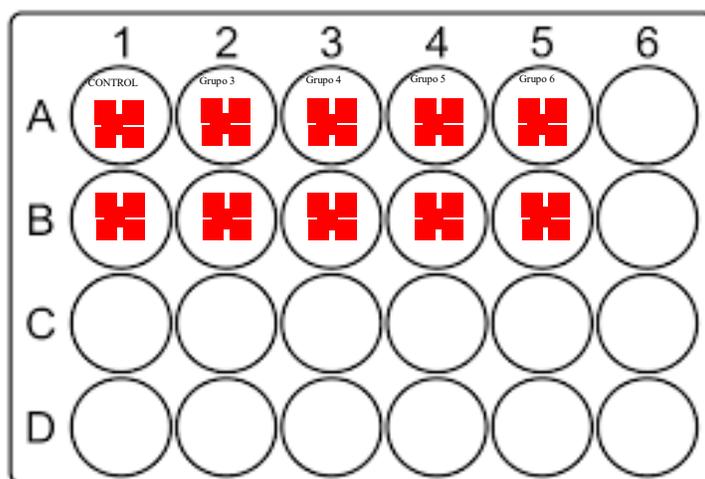


Fig. 18. Placa de 24 pozos con muestras deacrílico.

La placa de 24 pozos se incubó a 37 °C, sin agitación durante 90 minutos, para promover la fase de adhesión celular sobre las placas deacrílico. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) para eliminar las levaduras que no se hayan adherido. Se agregó medio YNBD nuevo y se incubaron a 37 °C en agitación 180 rpm para promover el desarrollo de biopelícula durante 24 horas.

Aplicación de ondas de choque

Transcurrido el tiempo de establecimiento de la biopelícula, se realizó un lavado con PBS para eliminar el exceso de levaduras crecidas en la suspensión y que no formaban parte de la biopelícula.

En condiciones de esterilidad, se tomaron los fragmentos deacrílico con la biopelícula y se colocaron dentro bolsas de polipropileno estériles de 1.5 x 1.5 cm (Fig. 19), cuidando de no remover la biopelícula por vía mecánica debido al manejo.



Fig. 19. Muestras colocadas dentro de bolsas estériles.

Dependiendo de cada grupo, a cada bolsa con su fragmento de acrílico se agregó:

Grupo 4: PBS estéril (400 μ l).

Grupos 5 y 6: Daktarin se dejó una capa de aproximadamente 2 mm de espesor de acuerdo con datos de caracterización.

Las bolsas fueron cerradas utilizando una termoselladora de plásticos PFS-200. Las muestras de todos los grupos se dejaron reposar por 10 minutos, pasado ese tiempo se aplicaron 250 ondas de choque generadas con 3.25 kV equivalentes a 0.16 mJ/mm² en la zona focal. Parámetros establecidos de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización previa de los materiales expuestos a ondas de choque; así como a la literatura existente (Wanner et al., 2011).

Posterior a los tratamientos aplicados a cada grupo de estudio, se procedió a la recuperación de fragmentos y eliminación del antimicótico Daktarin residual existente en el acrílico recuperado. Para ello, se realizaron tres lavados con agua Milli-Q estéril por cinco minutos cada uno retirando el PBS con ayuda de una micropipeta después de cada lavado. Posteriormente, todos los fragmentos se colocaron en una placa estéril de 96 pozos marca Fischer Scientific, uno por pozo. Inmediatamente después del tercer lavado, se agregaron 180 μ l de medio YNBD nuevo y 20 μ l del reactivo MTT (5 mg/ml), se incubaron a 37 °C durante 3 horas para promover la formación de cristales de formazan. Transcurrido el tiempo se retiró el medio de cultivo con el MTT residual y los cristales se disolvieron con 200 μ l de DMSO. Se tomaron 100 μ l de la disolución y se colocaron en pozos limpios de la placa de 96 pozos. Se tomaron lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 570 nm con la sustracción del fondo a 630 nm.

Finalmente, una de las piezas de acrílico de cada grupo fue fijada con paraformaldehído al 2%. Estas se tiñeron con el colorante blanco de calcofluor para observar fluorescencia, con excitación en 405 nm y emisión en 430-450 nm. La observación y captura de imágenes se realizó utilizando un microscopio Confocal Laser Scanning Zeiss LSM880.

VII. RESULTADOS

Caracterización mecánica de los materiales

Con base en la caracterización de las 5 barras de polimetil metacrilato (PMMA), expuestas a esfuerzos ejercidos por el brazo de la máquina Instron, se obtuvieron datos de flexión para conocer los valores de resistencia ante la deformación por flexión.

Los datos obtenidos a partir del software acoplado a la máquina de pruebas generaron curvas como las que se muestran a continuación (figura 20).

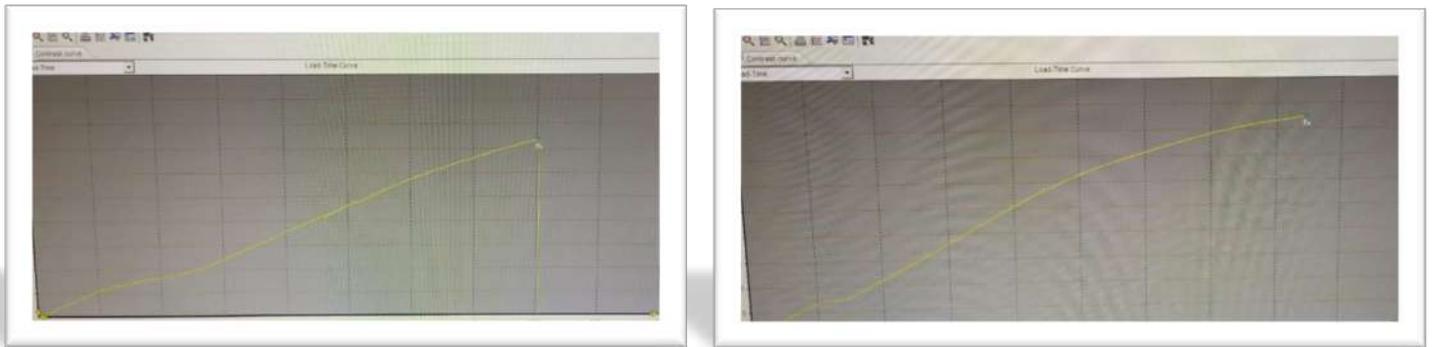


Fig. 20. Gráficas de cambios en acrílico hasta punto de fractura.

En ellas se observan los puntos de deformación del material hasta llegar a punto P, donde ocurre una deformación plástica la cual es permanente. También se obtienen datos como la carga máxima en Newtons antes de la fractura del material, el tiempo transcurrido hasta el momento del fallo y el desplazamiento de la muestra sometida a la carga (Fig. 21) El promedio de resistencia a la flexión por compresión fue de $110.94 \text{ MPa} \pm 14.69 \text{ MPa}$.

De acuerdo con el momento, se registró en la gráfica hasta llegar al punto P, en el cual existió una deformación permanente como se observa en la Fig. 21.



Fig. 21. Datos obtenidos con la maquina universal de pruebas.

Aplicación de ondas de choque sobre piezas de PMMA

Para conocer los efectos que ejercen los fenómenos como la cavitación acústica asociados a las ondas de choque sobre el material utilizado (PMMA) se aplicaron diferentes intensidades de voltaje para la generación de las ondas de choque y también se varió el número de ondas (125, 250 y 500). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio

estereoscópico marca Velab modelo VE-S1 con un objetivo 10X. Los resultados se muestran en la tabla 1.

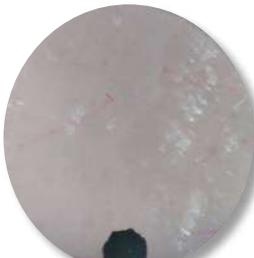
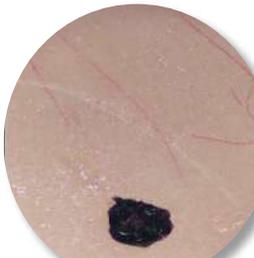
SW/voltaje	CONTROL	2 kV (0.039 mJ/mm ²)	3kV (0.127 mJ/mm ²)	4kV (0.271 mJ/mm ²)
125				
250				
500				

Tabla 1. Fotografías de muestras de acrílico sometidas a 125, 250 y 500 ondas de choque con distintas densidades de energía.

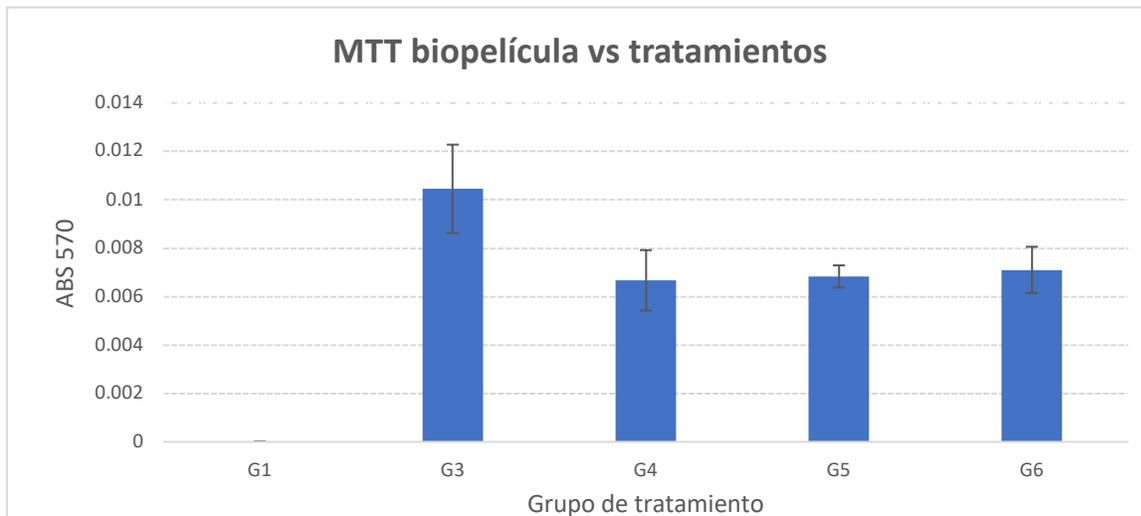
En la primera columna se muestra la imagen de control que corresponde al fragmento del material antes de recibir ondas de choque. En ellas se aprecia que el material presenta rugosidades y defectos superficiales debidos a su procesamiento. Las siguientes columnas muestran el daño del material después de recibir 3 aplicaciones con las distintas combinaciones de tratamiento. Como se observa, las muestras no sufrieron daños graves o perforaciones debidas a la cavitación, después de haberse sometido a los tratamientos con 125 y 250 ondas de choque. Tampoco se observó afectación al incrementar el voltaje de generación de 2kV a 3kV y a 4kV.

Las muestras que recibieron 500 ondas de choque generadas con 4kV mostraron pequeños signos de cavitación sobre la superficie del material a la observación al microscopio, sin que esto generara líneas de fractura o fisura en el material.

En todas las piezas de material polimerizado se observaron defectos superficiales, aunque no existió evidencia de que dichos defectos se incrementaran o que constituyesen puntos de fatiga al momento de ser sometidos a los tratamientos por ondas de choque.

Análisis por MTT

Para evaluar semicuantitativamente el efecto que tuvieron los distintos tratamientos sobre las biopelículas se realizó la prueba de MTT y se obtuvo la siguiente gráfica de resultados:



Gráfica 1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el acrílico utilizado.

En ésta se muestran los valores de absorbancia obtenidos por la disolución de cristales de formazan. El grupo 1 (G1), comprendido por los fragmentos de acrílico sin desarrollo de biopelícula, no presentó incremento en los valores de absorbancia ya que, al no haber células vivas adheridas a ellos, no hubo desarrollo de cristales de formazan. En la columna correspondiente al grupo 3 (G3), cuyos fragmentos tuvieron desarrollo de biopelícula la cual no recibió tratamiento por ondas de choque o Daktarin, se observa que el valor de absorbancia es el más alto, ya que existió mayor cantidad de células adheridas al material y por tanto mayor desarrollo de cristales. Por otro lado, los valores obtenidos para los grupos de tratamiento no mostraron diferencia significativa entre ellos. El grupo 4 (G4) correspondiente al grupo que sólo recibió ondas de choque sin la presencia de antimicótico; muestra sin embargo, que, aunque los datos fueron ligeramente más bajos que los grupos 5 y 6 (G5 y G6), estos presentaron la mayor dispersión. Se muestra que el grupo tratado con Daktarin (G5) disminuyó su absorbancia con respecto del grupo control, es decir existió efecto de disminución y la dispersión de datos fue menor, aunque si bien, existió disminución en el número de células adheridas al material, ésta no fue del 100%. Finalmente, el grupo 6 el cual recibió tratamiento con ondas de choque y Daktarin, presenta ligeramente una mayor absorbancia comparada con los grupos (G4 y G5), pero menor que la del grupo de control sin tratamientos.

Observación de la biopelícula por microscopia de fluorescencia

Se realizó la fijación de los fragmentos de acrílico con la finalidad de teñir las células fúngicas con el colorante blanco de calcofluor, que se une a pared celular. Fue posible observar las células fluorescentes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 880, excitando el colorante a una longitud de onda en 405 nm y se registró la emisión en el rango de 430-450 nm. Las imágenes se muestran con pseudocolor azul. Los resultados para cada grupo con formación de biopelícula, se muestran a continuación.

Grupo 3. Biopelícula de control sin tratamientos

En las imágenes de la figura 22 se muestran cúmulos de células adheridas principalmente en zonas donde existen irregularidades (imagen del lado izquierdo). Se muestra también la presencia de matriz extracelular o restos de ella, sobre la superficie del fragmento, incluso se observan pequeños grupos de levaduras inmersos en ésta (imagen del lado derecho).

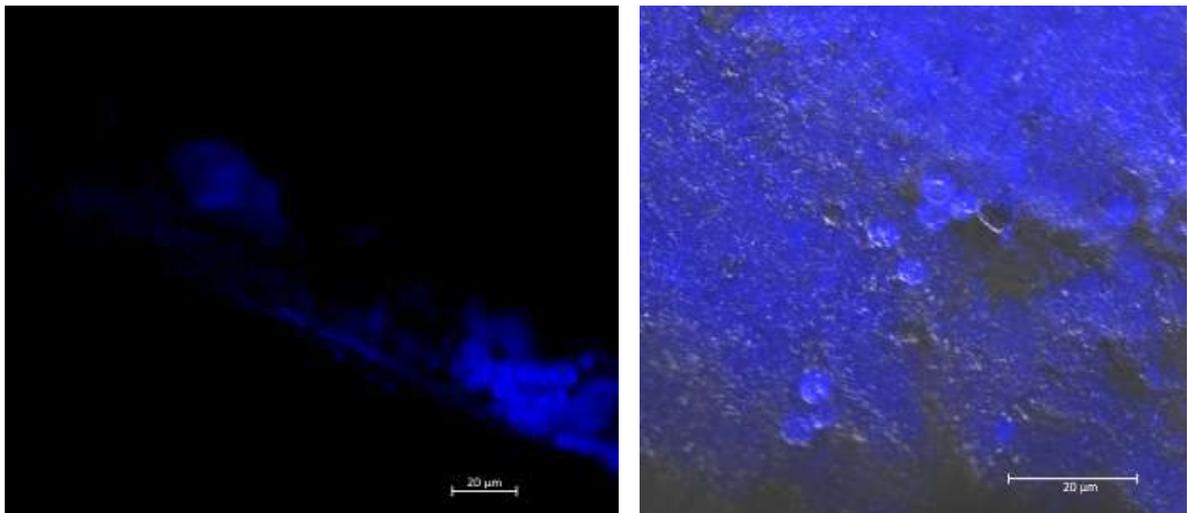


Fig. 22. Piezas de PMMA con evidencia de la formación de biopelículas (células y matriz extracelular) teñidas en color azul.

Grupo 4. Biopelículas que recibieron ondas de choque inmersas en PBS

En las imágenes de la figura 23 se muestran células con el desarrollo de dos morfologías, una de levadura y/u otra de pseudohifas, ambas características de células de *C. albicans* involucradas en la formación de biopelículas. En ambas se observa la adhesión en una zona con defectos superficiales presentes principalmente hacia la zona de corte del material. La presencia de colorante en otras zonas de irregularidad indica la presencia de restos de matriz extracelular dejados por otras secciones de la biopelícula que fue removida.

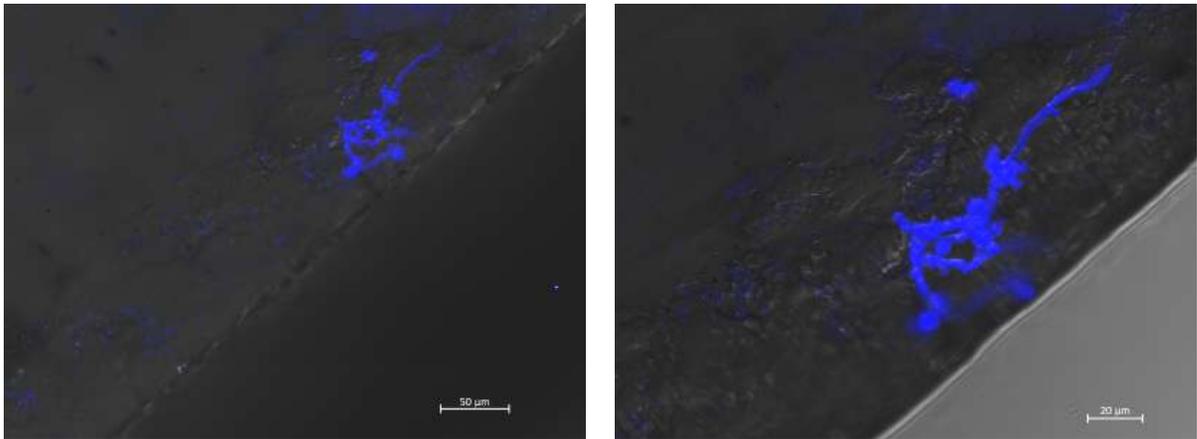


Fig. 23. Formación de biopelícula sobre irregularidades presentes en el borde del material, se aprecian levaduras y pseudohifas.

Grupo 5. Biopelículas que recibieron tratamiento únicamente con Daktarin antimicótico

Las imágenes de la figura 24 muestran células adheridas al borde de la prótesis y en las zonas donde existen irregularidades. Se evidencia en la imagen de la izquierda gran cantidad de material de matriz extracelular, se observan células levaduriformes inmersas en dicho material. En la imagen de la derecha se aprecian pequeños cúmulos de levaduras con presencia de restos de matriz en las zonas con defectos.

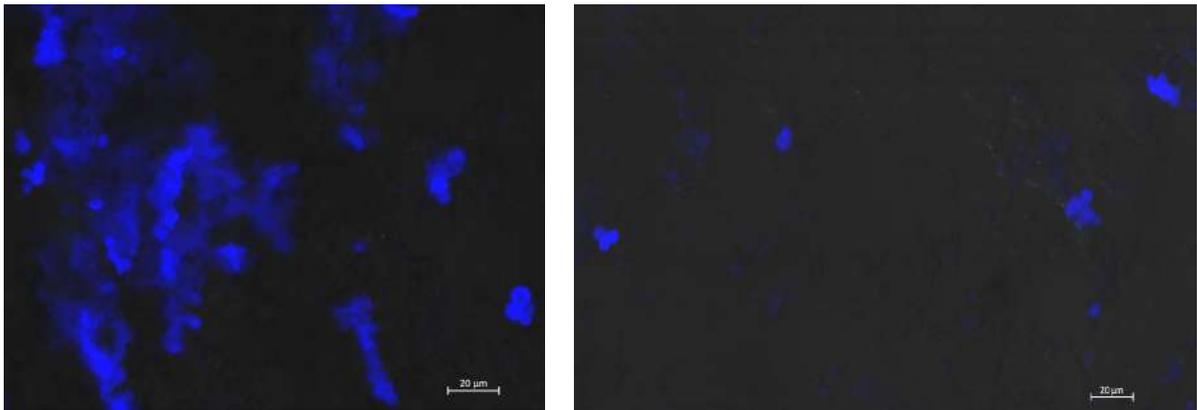


Fig. 24. Formación de biopelícula en material que recibió tratamiento con antimicótico Daktarin. Hay evidencia de células inmersas en material de matriz extracelular.

Grupo 6. Biopelículas tratadas con antimicótico Daktarin y ondas de choque

En las imágenes de la figura 25 se aprecian células dispersas en la superficie del material, probablemente adheridas a las zonas con mayor irregularidad, no se observa evidencia de matriz extracelular.

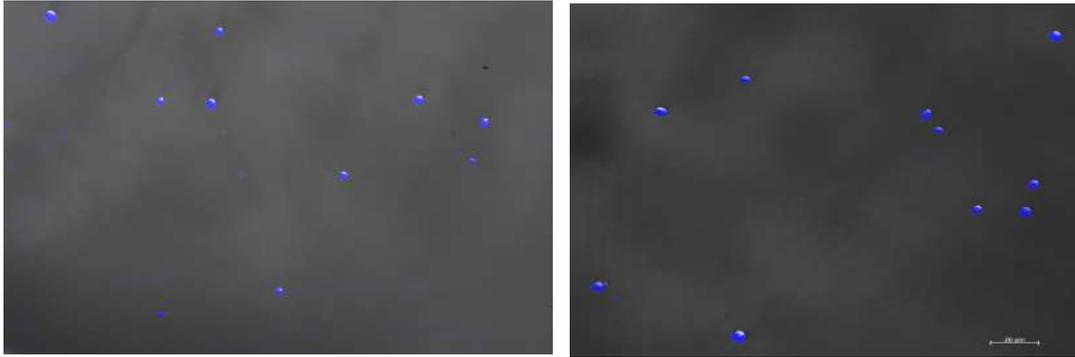


Fig. 25. Células levaduriformes dispersas en el material, restos de la formación de biopelícula y tratamiento con ondas de choque en combinación con el antimicótico.

DISCUSIÓN

Para reducir las infecciones causadas por *C. albicans* es primordial educar al paciente sobre hábitos de higiene y mantenimiento de sus prótesis (Felton et al., 2011) y también detectar oportunamente la formación de biopelículas, para lo cual se requiere de protocolos estandarizados que puedan realizarse de manera rutinaria en la práctica odontológica. La importancia de desarrollar métodos que permitan la remoción de estas biopelículas formadas en los pacientes portadores de prótesis removibles significaría un beneficio para los pacientes, ya que les permitirá seguir utilizando sus prótesis sin la necesidad de un recambio además de evitar enfermedades relacionadas con dichas biopelículas.

En México el edentulismo es un problema de salud con un alto porcentaje de prevalencia, donde confluyen factores sociales y biológicos que afecta a adultos desde los 20 años de edad (Luengas et al 2015). Aunque se sabe que la candidiasis oral es una enfermedad que afecta a más del 75% de la población portadora de prótesis removible, es un tema aun poco estudiado (Poulain, 2015).

En el trabajo realizado por Pineda y colaboradores (Pineda et al., 2017) relacionaron la adhesión de los microorganismos con factores tales como la rugosidad de la superficie, la película salival, el tipo de material de la prótesis, entre otros (Pineda et al., 2017); por otro lado, otros autores atribuyeron la adhesión de las levaduras únicamente a la rugosidad de la superficie y la deficiencia en la higiene, ya que ésta característica proporciona anclaje y nichos que brindan protección a los microorganismos (Pusateri et al., 2009).

En el presente trabajo la rugosidad fue una variable determinante en la adhesión de las levaduras, y en la formación de las biopelículas. Se observó una fuerte adherencia de células en las prótesis que presentaban irregularidades y en los bordes donde fueron los cortes de dichas muestras.

Pruebas mecánicas

Durante los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de materiales que sean adecuados para la fabricación de prótesis dentales y que deben cumplir con una serie de requisitos como, características para una buena estética, biocompatibilidad con los tejidos circundantes, una fácil reparación y una resistencia adecuada (Cervera 2014).

Es así como se han creado normas para aclarar y simplificar las pruebas que se realizan a los materiales dentales. Entre las cuales la Nom #12 (Asociación Dental Americana), describe los procedimientos y materiales presentados que permitan a los fabricantes comparar sus métodos de control de producción de rutina con los procedimientos estándar de la especificación (Swaney et al., 1953).

La resistencia flexural sirve para determinar qué tanto puede deformarse un material y cuál es el esfuerzo máximo que puede desarrollar, como es el caso del PMMA, antes de presente grietas o ruptura (Martínez 2015). Para determinarla se realizan ensayos de

resistencia transversal, aplicando cargas a una lámina de resina (PMMA) apoyada en sus dos extremos hasta su fractura (Revista de la Asociación Dental Americana 1975).

En este trabajo se realizó la prueba de flexión con base en lo establecido en dicha norma. Los resultados obtenidos para el acrílico utilizado en la elaboración de las muestras (Pro Base Hot Ivoclar Vivadent) cumplieron con los parámetros especificados (Naranjo et al., 2014). Por ello, los acrílicos probados pueden ser usados en la boca, soportando las fuerzas de oclusión durante la masticación, ya que alcanzaron valores superiores a los que la Nom #12 exige y recomienda que incluyen una resistencia a la flexión ≥ 65 MPa. Esto resulta importante debido a que las fuerzas de masticación en pacientes con todos los órganos dentarios pueden llegar de los 60 a 70kg (Carretero 2008). Sin embargo, esas fuerzas disminuyen en pacientes edentulos portadores de prótesis convencionales, donde las fuerzas de masticación pueden llegar a ser de 8 kg (Manzon et al 2021).

Los acrílicos para prótesis deben cumplir adicionalmente con otros parámetros como: estabilidad del color, la norma indica que el polímero no debe mostrar más que un ligero cambio de color después de 24 horas (Revista de la Asociación dental americana 1975). Las muestras de acrílico utilizadas en este trabajo presentaron dicha característica después de 24 horas sumergidas en agua destilada a 35°.

Evaluación del daño provocado por ondas de choque sobre el PMMA

La caracterización de los materiales es un proceso difícil y laborioso, ya que no existe literatura que explore la cantidad de ondas de choque que puede recibir un PMMA, sin sufrir daños en su superficie. Es por ello, que se realizaron distintas evaluaciones de la atenuación atribuible a otros materiales como el plástico utilizado para encapsular el medio con una impedancia distinta al agua como lo es el gel antimicótico Daktarin y el daño ocasionado en un medio acuoso.

Se aplicaron ondas de choque directas al vial de plástico flexible que sirvió como contenedor del gel Daktarin para conocer si se presentaban diferencias en la atenuación debido a la presencia de mayor espesor de la capa de gel. Las ondas de choque fueron emitidas por el generador experimental mencionado anteriormente (G-MFNL) con voltajes de descarga de 2, 3, 4, 5 y 6 kV; es decir se analizaron 5 casos de la energía liberada. La incertidumbre al establecer cada uno de dichos voltajes fue de ± 0.125 kV (ver anexo 1)

Se consideró el aplicar del 10% al 40% de la máxima presión soportada por el acrílico en su rango mínimo, la cual se alcanzó con ondas de choque generadas con descargas de 2, 3 y 4 kV directamente sobre el acrílico con una cantidad de ondas de choque de 125, 250 y 500, corroborando que el material no sufría algún tipo de daño debido a la cavitación, ni modificación en su superficie.

Los valores utilizados en este trabajo de investigación fueron respaldados por los parámetros que exige la Nom 12, donde se publica que la resistencia a la flexión sea ≥ 65 MPa. El voltaje mínimo para la generación de ondas de choque fue de 2 kV, obteniéndose una presión de 9.92 MPa y el máximo utilizado fue de 4 kV, generándose una presión máxima de 42.04 MPa, valores que están por debajo del promedio de resistencia del acrílico la cual fue de 96.25 MPa.

Con el tratamiento más agresivo (4 kV y 500 ondas de choque) se alcanzaron a notar algunos efectos de la cavitación sobre la superficie de los fragmentos sometidos. Con dicha evidencia se optó por cuidar tanto la presión como la cantidad de ondas de choque aplicadas. La cavitación se considera el efecto más agresivo debido a que es un fenómeno que puede tener efectos deseados y no deseados, dependiendo de la aplicación clínica específica y en este caso se descubrió que, a mayor cantidad de ondas de choque, el efecto fue acumulativo y se observó cierto grado de daño sobre las superficies de PMMA.

Se utilizó el valor medio de descarga (3kV), ya que, dadas las observaciones realizadas previamente, no se provocaron daños sobre la superficie del material. Con el equipo utilizado para este trabajo, se calculó una densidad de flujo de energía (EFD) en el foco igual a 0.16 mJ/mm². Esta energía, de acuerdo a Wanner y colaboradores, aplicándola durante 500 ondas de choque, resultó efectiva para inducir una reducción de las células bacterianas viables sobre la biopelícula formada en su material de estudio. (Wanner et al 2011).

Formación de biopelículas sobre acrílico

En esta investigación se desarrollaron modelos *in vitro* de biopelículas de *C. albicans* sobre fragmentos de acrílico termocurable (polimetilmetacrilato PMMA). El método utilizado con ligeras modificaciones fue previamente descrito (Chandra et al., 2008). Estos autores lograron el establecimiento de biopelículas sobre tiras de acrílico y describieron diversas fases de crecimiento. En este trabajo, las muestras se dejaron con un grado de desarrollo de la fase intermedia de maduración de la biopelícula, la cual se alcanzó a las 24 horas de incubación. Posteriormente, se analizaron los efectos del tratamiento de ondas de choque solas, aplicación del antimicótico Daktarin y la combinación de ambos.

Como se mencionó en la sección de resultados, la formación y adherencia de biopelículas a las prótesis de acrílico termocurable es alta. Esto coincidió también con lo descrito en otros reportes como los de Rodríguez Acosta (2014) y Lee (2015).

La cuantificación de las biopelículas se realiza habitualmente por dos métodos:

1. Ensayos colorimétricos que determinan la actividad metabólica.
2. Determinación del peso seco, que mide la biomasa total de las biopelículas (Chandra et al., 2008).

En este trabajo se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico de MTT, el cual consiste en realizar un ensayo cuya base es una sal de tetrazolio. La reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produce formazan de color azul, su disolución y medición de la absorbancia permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (García et al., 2019). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido que resulta en su actividad metabólica (Arencibia et al., 2003).

Los resultados mostraron que las levaduras fueron capaces de formar biopelículas las cuales tienen relación con enfermedades diversas en el hospedador como lo son la estomatitis protésica que describen los estudios de Del Pozo (2015) y Nakajima (2019) aunque este último agrega también las enfermedades respiratorias.

Incidencia de los tratamientos sobre las biopelículas

En este estudio se obtuvo la cuantificación de la actividad metabólica en todas las muestras debido a que no se pueden eliminar completamente a todas las células. Los valores de absorbancia fueron más altos en las placas correspondientes al control sin tratamiento. Por otro lado, la tinción con blanco del calcofluor, evidenció la presencia del colorante fluorescente en mayor cantidad en zonas en las que existió algún tipo de irregularidad, indicando que la adhesión, crecimiento y formación de matriz extracelular se realizó principalmente en estas áreas.

Para las muestras que recibieron tratamiento con ondas de choque se demostró una disminución de células vivas debido al efecto mecánico que estas causan, coincidiendo con los reportes realizados por Pineda et al. (2017). En las muestras tratadas con ondas de choque, se observó evidencia de remoción por efecto mecánico, ya que solo se observaron restos fluorescentes en las zonas previamente descritas.

Las observaciones con respecto a la disminución en la cantidad de células adheridas al material, muestran que las ondas de choque fueron eficaces para realizar la remoción mecánica de las biopelículas de *C. albicans* en las muestras de acrílico, descrito en los trabajos de Gardesmeyer donde demostraron que se debe aplicar un umbral de energía mínimo de 0.59 mJ/mm^2 antes de que surjan los efectos antibacterianos. (2004) y Novak (2008). Estos autores describen que el principal objetivo de las ondas de choque son los sistemas de membrana, lo que conduce a una mayor permeabilidad en paredes celulares y membranas celulares (Gardesmeyer et al., 2004).

Un hallazgo importante durante el desarrollo de este trabajo fue la obtención de atenuaciones de la presión de la onda de choque debido a adición del gel Daktarin. Se demostró que espesores mayores a 7 mm causaban dicho efecto. Esto resulta interesante en el área biomédica, ya que al colocar el gel en cantidades que alcancen espesores menores a 7 mm se logra un efecto positivo que potencia la intensidad de las ondas de choque. Dichas observaciones permitirán adecuar los valores de descarga para obtener una mayor eficacia de la onda de choque en aplicaciones sobre materiales que pudieran sufrir alteraciones al aumentar la presión de la onda únicamente. Sin embargo, se requiere realizar un mayor número de estudios para corroborar dicho efecto.

Las muestras que fueron inmersas en el gel antimicótico Daktarin presentaron un descenso en la absorbancia en el ensayo de MTT, indicativo de disminución en el número de células o en la viabilidad celular por el efecto de antifúngico, el cual actúa inhibiendo la síntesis de ergosteroles, alterando la permeabilidad de la membrana fúngica. Las imágenes de fluorescencia demostraron que quedaron extensas zonas con levaduras inmersas en su matriz extracelular, en este caso no existió la remoción, sólo la inhibición del crecimiento por el efecto del fármaco. Se comprobó el efecto antimicótico sobre a las biopelículas formadas en el material, coincidiendo con las investigaciones realizadas por Praksh (2015) y Gregorí (2005).

La sinergia entre ambos tratamientos también mostró un descenso en la viabilidad o carga celular. Sin embargo, este no fue significativamente diferente de los otros tratamientos. Lo cual podría estar relacionado a una atenuación de la potencia de la onda de choque debido al medio (Gel Daktarin). Las imágenes de fluorescencia mostraron células dispersas por toda la superficie de la muestra, pero también se observó remoción de matriz extracelular. Aunque aún se espera realizar ensayos adicionales para comprobar los resultados.

VIII. CONCLUSIONES

Se corroboró la capacidad de adherencia que tiene *C. albicans* a los acrílicos termocurables, los cuales son ampliamente utilizados en el campo de la odontología.

La rugosidad del material aumenta la adherencia de los microorganismos, promoviendo la formación de biopelícula por lo cual se concluye que un correcto procedimiento de elaboración, recorte, pulido y acabado final son un factor determinante que deben cumplir los materiales dentales, requisitos descritos en las normas de calidad. Si estos procedimientos no se realizan de esta manera contribuimos en la promoción de la adherencia de microorganismos como *C. albicans*.

Las ondas de choque con una densidad de energía de 0.16 mJ/mm^2 , conocidas también como ondas de mediana densidad, tuvieron un efecto eficiente contra las biopelículas sin generar daños en el polimetil metacrilato (PMMA), ya que contribuyeron al desprendimiento de la biopelícula formada por las levaduras.

Las ondas de choque resultaron ser un método mecánico de remoción de biopelículas y cuya energía y fenómenos asociados podría funcionar como un adyuvante en el cuidado de las prótesis.

El antimicótico disminuyó la viabilidad celular pero no con el 100% de eficacia en la eliminación, remoción o desprendimiento.

La combinación de ondas de choque en sinergia con el antimicótico no generó un efecto significativamente diferente en el debilitamiento de estas biopelículas comparado con los tratamientos por separado; por el contrario, se observó una ligera atenuación del efecto.

Con la metodología aplicada en este protocolo, las ondas de choque no tuvieron un efecto sinérgico al aplicarse de manera combinada con Daktarin gel como tratamiento antimicótico para debilitar la biopelícula que se forma en prótesis totales. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis de trabajo, y se acepta la hipótesis nula.

IX. PROPUESTAS

Se propone que en estudios posteriores se analice una mayor cantidad de muestras controlando diferentes variables para corroborar si existe un efecto de atenuación provocado por el gel Daktarin, tratando de encontrar las mejores condiciones en las que las ondas de choque sean potencializadas para generar un efecto sinérgico, así mismo buscar una manera de poder estandarizar las piezas de acrílico y poder recortarlas de una manera más sencilla y funcional.

Establecer los tiempos de desarrollo de biopelículas, así como probar densidades de energía más altas de 0.16 mJ/mm^2 las cuales fueron aplicadas en este trabajo sobre biopelículas en distintos momentos de maduración, para conocer el efecto de estos tratamientos sobre ellas.

X. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, A., Acosta, L., Morales, C., & Castaño, V. (2012). Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de plata para uso odontológico. *Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 5(9), 68–76.

Alla, R.K., Kn, R.S., Vyas, R., & Konakanchi, A. (2015). Conventional and Contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I - Overview, composition and properties. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 1, 82-89.

Álvarez, U. M., Ramírez, A., Fernández, F., Méndez, A., & Loske, A. M. (2008). The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria. *Shock Waves*, 17(6), 441–447.

Álvarez, U. M., Loske, A. M., Castaño-Tostado, E., & Prieto, F. E. (2004). Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes by underwater shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 459–463.

Argueta-Figueroa, L., Mesta-Pichardo, D., Torres-Gómez, N., Martínez-Álvarez, O., Paulino-González, Á. D., Arenas-Arocena, M. C. (2018). Acrílico termopolimerizable enriquecido con nanopartículas de cobre: evaluación antibacteriana y citotóxica. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 11(21), 45.

Avon, S. L., Goulet, J. P., & Deslauriers, N. (2007). Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 97(1), 32–38.

Barco Ríos, H., Rojas Calderón, E., & Restrepo Parra, E. (2012). Principios de Electricidad y Magnetismo. Universidad Nacional de Colombia.

Barrionuevo, D. (2007). Presencia de "Cándida albicans" y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH: tesis doctoral.

Barrios, C. E., Vila, V. G., Martínez, S. E., & Encina Tutuy, A. J. (2015). La saliva, flujo y Ph en relación a la actividad cariogénica. *Revista de La Facultad de Odontología*, 8(1), 32.

Buch, M., Knorr, U., Fleming, L., Theodore, G., Amendola, A., Bachmann, C., Zingas, C. and Siebert, W., 2002. Extracorporeal shockwave therapy in symptomatic heel spurs. An overview. *Der Orthopäde*, 31(7), pp.637-644.

Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86-96.

Cankovic, M., Bokor-Bratic, M., Marinovski, J., & Stojanovic, D. (2017). Prevalence and possible predictors of the occurrence of denture stomatitis in patients older than 60 years. *Vojnosanitetski Pregled*, 74(4), 311–316.

Castrillón Rivera, L. E., & Palma Ramos, A. (2015). Actividad antimicótica de nanopartículas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 7(12).

Cardozo, Elba Inés, Pardi, Germán, Perrone, Marianella, & Salazar, Esmeralda. (2003). "Detección De Candida Albicans en pacientes con Estomatitis Sub-Protésica, medicados con Anfotericina Tópica". *Acta Odontológica Venezolana*, 41(3), 188-194.

Carretero Ancelmo, D.A (2008) Deficiencia masticatoria por pérdida dentaria como factor de riesgo para dispepsia en el adulto mayor.

Caumes, E. (2008). Skin Diseases. In *Travel Medicine* (Twenty-Sixth Edition).

Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2008). In vitro growth and analysis of Candida biofilms. *Nature protocols*, 3(12), 1909–1924.

Cheng Ming-Huei and Huang Jung-Ju. (2018). Chapter 12: Oral Cavity, Tongue, and Mandibular Reconstructions, in: *Plastic Surgery: Craniofacial, Head and Neck Surgery Pediatric Plastic Surgery*, Vol. 3.

Coleman, A. J., & Saunders, J. E. (1988). A survey of the acoustic output of commercial extracorporeal shock wave lithotripters. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 15(3), 213–227.

Costa-Orlandi, C., Sardi, J., Pitangui, N., de Oliveira, H., Scorzoni, L., Galeane, M., Mendes-Giannini, M. (2017). Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal of Fungi*, 3(2), 22.

Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). Candida albicans Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138.

De la Corte Rodríguez, H ., Manuel, J., & Belmonte, R. (2020). *Bases de rehabilitación del aparato locomotor*.

Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183.

Della Bona, A., & Van Noort, R. (1995). Shear vs. Tensile Bond Strength of Resin Composite Bonded to Ceramic. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1591–1596.

Dige, I., & Nyvad, B. (2019). Candida species in intact in vivo biofilm from carious lesions. *Archives of Oral Biology*, 101(March 2019), 142–146.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.

- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal Biofilms. *PLoS Pathogens*, 8(4).
- Farm, R. C. (2005). *Estructura y actividad de los antifúngicos*. 39(2).
- Felton, D., Cooper, L., Duqum, I., Minsley, G., Guckes, A., Haug, S., Deal Chandler, N. (2011). Evidence-Based Guidelines for the Care and Maintenance of Complete Dentures: A Publication of the American College of Prosthodontists. *Journal of Prosthodontics*, 20(SUPPL. 1).
- Fernández D, G. Estudios en vivo sobre la fragmentación de urolitos mediante litotricia extracorpórea tándem (2008). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gaitán-Cepeda, L. A., Enríquez-Arvizu, O., Rueda-Gordillo, F., Sánchez-Vargas, L. O., Hernández-Solís, S. E., & Porlla-Robertson, J. (2016, diciembre). Características clínico-epidemiológicas de sujetos con estomatitis protésica. Un estudio de 589 casos. *Revista odontológica latinoamericana*.
- García-Contreras, Rene & Acosta-Torres, Laura & Arenas-Aroccena, Ma. Concepción & Rodríguez-Torres, María Del Pilar. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo mtt para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas.
- Gerdesmeyer, L., Von Eiff, C., Horn, C., Henne, M., Roessner, M., Diehl, P., & Gollwitzer, H. (2005). Antibacterial effects of extracorporeal shock waves. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 31(1), 115–119.
- Gnanadhas, D. P., Elango, M., Janardhanraj, S., Srinandan, C. S., Datey, A., Strugnell, R. A., Chakravorty, D. (2015). Successful treatment of biofilm infections using shock waves combined with antibiotic therapy. *Scientific Reports*, 5, 1–12.
- Goldman, L. (., Schafer, A. I., & Cecil, R. L. 1. (2020). *Goldman-Cecil medicine* (26th edition.). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Gollwitzer, H., Horn, C., von Eiff, C., Henne, M. and Gerdesmeyer, L., 2004. Antibacterial effectiveness of high-energetic extracorporeal shock waves: an in vitro verification. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 142(04), 462-466.
- Gregori Valdés, Bárbara Susana. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2),1.
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321.
- Gutiérrez-Vargas, V. L., León-Manco, R. A., & Castillo-Andamayo, D. E. (2015, 25 julio). Edentulismo y necesidad de tratamiento protésico en adultos de ámbito urbano marginal. *Rev Estomatol Herediana*
- .

Hazan Molina H, Kaufman H, Reznick ZA, Aizenbud D. (2011). Orthodontic tooth movement under extracorporeal shock wave therapy: The characteristics of the inflammatory reaction: A preliminary study. *Refuat Hapeh Vehashinayim*.

He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., & Zhou, X. (2015). The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica*, 60(1), 69–80.

Ishikawa, A., Yoneyama, T., Hirota, K., Miyake, Y., & Miyatake, K. (2008). Professional Oral Health Care Reduces the Number of Oropharyngeal Bacteria. *Journal of Dental Research*, 87(6), 594–598.

Kerfoot, W.W., Beshai, A.Z. & Carson, C.C. The effect of isolated high-energy shock wave treatments on subsequent bacterial growth. *Urological Research*. 20, 183–186 (1992).

Kernien, J. F., Snarr, B. D., Sheppard, D. C., & Nett, J. E. (2018). The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. *Frontiers in immunology*, 8, 1968.

Lecca Rojas, M. P., Meza Mauricio, J., & Ríos Villasis, K. (2014). Manifestaciones bucales en pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis. *Revista Estomatológica Herediana*, 24(3), 147.

Lee Muñoz, X., Cajas Cajas, N., Gómez Carranza, L., Vergara Núñez, C., Ivankovic Silva, M., & Astorga Bustamante, E. (2015). Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 8(1), 31–37.

López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2017). Erratum to: Shock Wave-Induced Damage and Poration in Eukaryotic Cell Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 250(1), 53–54.

Loske, A. M. (2007). *Shock Wave Physics for Urologists*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Loske, A. M., Álvarez, U. M., Hernández-Galicia, C., Castaño-Tostado, E., & Prieto, F. E. (2002). Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(4), 321–327.

Loske Achim M. (2017). *Medical and Biomedical Applications of Shock Waves*. Springer International Publishing, Cham, Suiza.

Luengas-Aguirre, M. I., Sáenz-Martínez, L. P., Tenorio-Torres, G., Garcilazo-Gómez, A., & Díaz-Franco, M. A. (2016). Aspectos sociales y biológicos del edentulismo en México: un problema visible de las inequidades en salud. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 29–36.

Madani, M., Berardi, T., & Stoopler, E. T. (2014). Anatomic and Examination Considerations of the Oral Cavity. *Medical Clinics of North America*, 98(6), 1225–1238.

Manzon, L., Vozza, I., & Poli, O. (2021). Bite Force in Elderly with Full Natural Dentition and Different Rehabilitation Prosthesis. *International journal of environmental research and public health*, 18(4), 1424.

Mariotto, S., de Prati, A., Cavalieri, E., Amelio, E., Marlinghaus, E., & Suzuki, H. (2009). Extracorporeal Shock Wave Therapy in Inflammatory Diseases: Molecular Mechanism that Triggers Anti-Inflammatory Action. *Current Medicinal Chemistry*, 16(19), 2366–2372.

Martín Aragón, S., & Benedí, J. (2004). *Antimicóticos dermatológicos*. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antimicoticos-dermatologicos-13064579>.

Martínez Huacho, N. C. (2015). Resistencia a la flexión de resinas acrílicas termopolimerizables usadas en la fabricación de prótesis totales. *Revista Científica Odontológica*, 3(1), 280–287.

Matlaga, B. R. (2012). Treatment of ureteral and renal stones: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials.

Millán-Chiu, B., Camacho, G., Varela-Echavarría, A., Tamariz, E., Fernández, F., López-Marín, L. M., & Loske, A. M. (2014). Shock Waves and DNA-Cationic Lipid Assemblies: A Synergistic Approach to Express Exogenous Genes in Human Cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 40(7), 1599–1608.

Müller, P., Guggenheim, B., Attin, T., Marlinghaus, E., & Schmidlin, P. R. (2011). Potential of shock waves to remove calculus and biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 15(6), 959–965.

Nakajima, M., Umezaki, Y., Takeda, S., Yamaguchi, M., Suzuki, N., Yoneda, M. Morita, H. (2020). Association between oral candidiasis and bacterial pneumonia: A retrospective study. *Oral Diseases*, 26(1), 234–237.

Novak, K. F., Govindaswami, M., Ebersole, J. L., Schaden, W., House, N., & Novak, M. J. (2008). Effects of low-energy shock waves on oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 87(10), 928–931.

Pairazaman Garcia, J. L. (2016). Recuperación De La Dimensión Vertical Con Prótesis Combinada: Reporte De Caso Clínico Restoration of Vertical Dimension With Combined Denture: a Clinical Case Report. *Rev. Salud & Vida Sipanense*, (1), 61–74.

Petrou A. , Hanna A. , Munshi A. , Hafez I.A. , Ramsay W (2009). The use of Shock waves for the killing of *Candida albicans*.

Pineda-Higueta, S. E., & Mosquera-Palomino, J. (2017). Adherencia de *cándida albicans* a resinas acrílicas y poliamidas. Estudio in vitro. *Biosalud*, 16(1), 43–50.

Poulain, D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 208–217.

Pusateri, C. R., Monaco, E. A., & Edgerton, M. (2009). Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Archives of oral biology*, 54(6), 588–594.

Quintero, M. D. S., Álvarez, U. M., Wachter, C., Gutiérrez, J., Castaño-Tostado, E., Fernández, F., & Loske, A. M. (2008). Interaction of Shockwaves with Infected Kidney Stones: Is There a Bactericidal Effect? *Journal of Endourology*, 22(8), 1629–1638.

Revised American Dental Association Specification No. 12 for denture base polymers. (1975). *The Journal of the American Dental Association*, 90(2), 451–458.

Rivas G, A. M., & Cardona-Castro, N. (2009). Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con que opciones terapéuticas contamos? *Revista CES MEDICINA*.

Rivera Guajardo, R. V., Méndez Maya, R., Escalante Balderas, S. A., Cornejo Peña, M. A., Nishimura Imai, A. T., & Oliver Parra, R. (2014). Rugosidad superficial de tres resinas acrílicas para una base de dentadura. *Revista ADM*.

Rodríguez Acosta, E. J. T., da Silva, P. M. B., Jacobina, M., Lara, V. S., Neppelenbroek, K. H., & Porto, V. C. (2015). *Candida albicans* adherence to denture base material: Chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. *Journal of Prosthodontics*, 24(3), 200–206.

Roman-Belmonte, J. M., De la Corte-Rodríguez, H., & Rodríguez-Merchan, E. C. (2018). How blockchain technology can change medicine. *Postgraduate Medicine*, 130(4), 420–427.

Rozalén, D. (2015). Ondas de choque focales.

Rudd, R. W., & Rudd, K. D. (2001). A review of 243 errors possible during the fabrication of a removable partial denture: part III. *The Journal of prosthetic dentistry*, 86(3), 277–288.

Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. McGraw-Hill Education.

Sturtevant, B., 1998. Shock wave effects in biomechanics. *Sadhana*, 23(5-6), pp.579-596.

Swaney AC, Paffenbarger GC, Caul HJ, Sweeney WT. American Dental Association specification No. 12 for denture base resin: second revision. *J Am Dent Assoc*. 1953 Jan;46.

Villavicencio, M. (2015). Comparación de la resistencia mecánica de resinas acrílicas para base de prótesis dentales totales termopolimerizables. *Universidad Nacional De San Martín-Tarapoto Universidad Nacional De San Martín Tarapoto*. 1–74.

Von Eiff, C., Haupt, G., Spiegel, H., Overbeck, J., Peters, G., Richter, K., Winckler, S. and Herrmann, M., (2000). Bactericidal effect of extracorporeal shock waves on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 49(8), pp.709-712.

Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Vidal Bonifacio, B., Lopez-Ribot, J. L., & Uppuluri, P. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 1–6.

Wanner, S., Gstöttner, M., Meirer, R., Hausdorfer, J., Fille, M., & Stöckl, B. (2011). Low-energy shock waves enhance the susceptibility of staphylococcal biofilms to antimicrobial agents in vitro. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 93(6), 824–827.

Werth, V. P., & Schafer, A. I. (2020). Goldman-Cecil Medicine, 2-Volume Set. En L. Goldman (Ed.), *Principles of Therapy of Skin Diseases* (pp. 2607-2612). Elsevier.

Wi, Y. M., & Patel, R. (2018). Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(4), 915–929.

Wieckiewicz, M., Wolf, E., Richter, G., Meissner, H. y Boening, K. (2016). New concept of polymethyl methacrylate (pmma) and polyethylene terephthalate (pet) surface coating by Chitosan. *Polymers*, 8(132).

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.

Zabicky López, Jamie (2017). Biopelículas formadas por especies de cándida en cuatro tipos de catéteres y su sensibilidad a tres antifúngicos.

XI. ANEXO

ANÁLISIS DE LA ATENUACIÓN DE UN BOLSA DE PLÁSTICO, ASÍ COMO DE GEL DAKTARÍN®, ANTE EL PASO DE ONDAS DE CHOQUE CONCENTRADAS EN AGUA

Reporte interno 2, correspondiente a la sesión experimental del 22 de junio del 2021, por: Giezi Velázquez Carreto y Francisco Fernández Escobar.

Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM

Introducción:

En este ensayo se determinó la atenuación del polietileno (bolsita con grosor total de 0.1 mm) y de dos capas de gel Daktarín® con espesores distintos (0.7 y 1.5 mm), ante el paso de ondas de choque generadas y concentradas en agua, en forma similar al análisis de la permeabilidad mecánica de una pipeta de transferencia (vial de 4 ml) efectuado en un reporte anterior [1].

Para estas pruebas se maquinaron previamente los accesorios mostrados en la figura 1, donde el soporte inferior de las imágenes izquierda y central se llamó *porta-muestras*, ya que fue diseñado para colocar tanto bolsas de polietileno vacías como con gel, así como para sujetar las muestras dentales (sin o con gel, ver imagen derecha) en los experimentos del proyecto (*) al que -entre otros- se destina este reporte. En las imágenes central e izquierda también se nota que el soporte superior mantiene al transductor de presión por encima y alineado con las muestras bajo análisis.

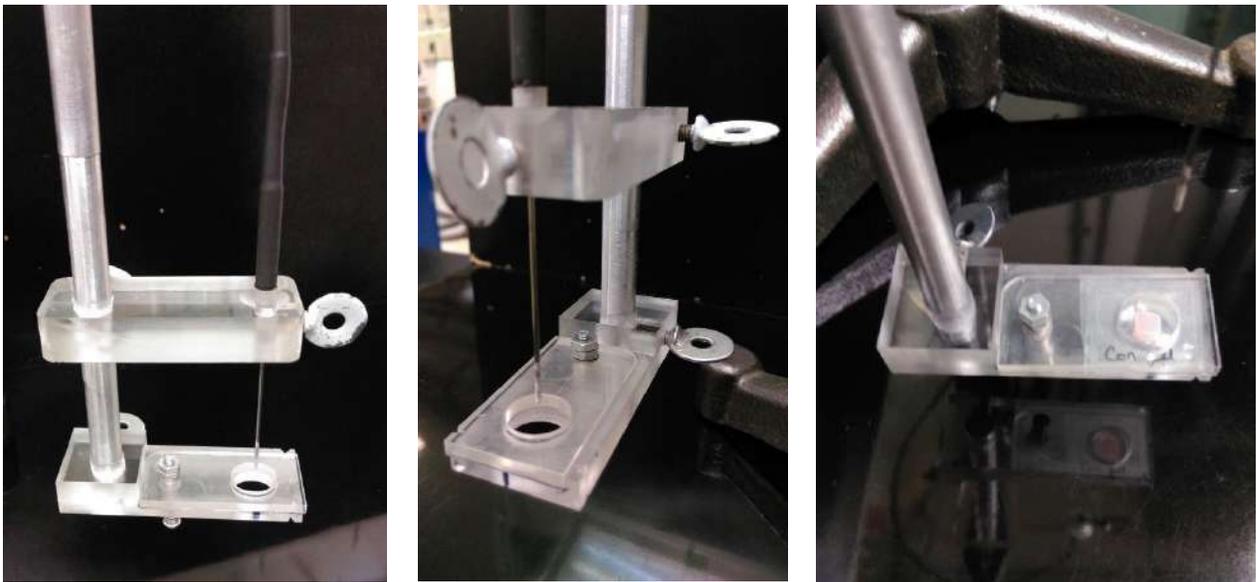


Fig.1. Soportes diseñados y maquinados para colocar al transductor de presión (soporte superior) por encima y alineado con las muestras bajo análisis (en el soporte inferior o porta-muestras).

Análisis del efecto combinado del antimicótico en gel (Daktarin) y la aplicación de ondas de choque en el debilitamiento de biopelículas de *Candida albicans* desarrolladas *in vitro* en prótesis totales

Equipos y materiales

Generador Multifuncional, utilizado en modo monopulso y con disparos tanto automáticos (a 0.5 Hz, para centrado fino del transductor de presión) como manuales (para captura de oscilogramas). La tina de pruebas fue llenada para proceso estándar (i.e., hasta el nivel de ataque usual: 4 cm por arriba del plano focal), con agua del tanque de reciclado a una temperatura de 25 °C, registrada al inicio de las mediciones de presión (19:00 hs).

Transductor de presión (hidrófono de PVDF en aguja de 1.1 mm de diámetro x 41.0 mm de longitud), marca Imotec GmbH (Würselen, Alemania), tipo 80-0.5-4.0, con sensibilidad (S) de 0.373 pC/bar y capacidad (C) de 238 pF, acoplado a un osciloscopio Tektronix TDS 3032 (Beaverton, OR, USA), con capacidad interna de 13 pF. El conjunto proporciona un factor de equivalencia (para conversión a unidades absolutas de presión) de 14.8605 mV/MPa.

Gel Daktarín®, en presentación de 0.78 ml.

Tornillo micrométrico marca National (USA), 0 - 25 mm, con resolución de 10 micras.

Polietileno # 6 doble (bolsita) con un grosor de 0.10 mm.

Bolsa de polietileno con una capa de gel Daktarín de 0.70 mm de espesor (0.8 mm en total).

Bolsa de polietileno con una capa de gel Daktarín de 1.50 mm de espesor (1.60 mm en total).

Método para determinar las atenuaciones

Con los accesorios mostrados en la figura 1, inicialmente se midió la presión P_+ en el foco del generador, sin material alguno en la trayectoria de las ondas de choque, a fin de obtener la presión de referencia P_R . Es decir, el transductor fue colocado en el soporte superior y su punta sensora fue ubicada en el foco del generador y sin que el porta-muestras (soporte inferior) tuviera material alguno. Se previó que el plano de este último no estuviera muy alejado del plano focal del generador, para que la forma cónica de la trayectoria geométrica de las ondas de choque atravesara lo más libremente posible el orificio de dicho porta-muestras, con diámetro de $\frac{1}{2}$ " (12.70 mm).

Posteriormente, se colocó en el porta-muestras una bolsita de polietileno vacía (cuidando no tuviera aire su interior), midiendo bajo las mismas condiciones anteriores la nueva presión atenuada P_B , que por simple comparación con la presión de referencia permite obtener el porcentaje de atenuación (A_B [%]) debido a las paredes de dicha bolsita:

$$A_B [\%] = 100 (P_R - P_B)/P_R = 100 (1 - P_B/P_R) \quad (1)$$

La propagación de incertidumbres para A_B [%], se obtuvo por simple diferencial de la ecuación anterior, con términos en valor absoluto, según la teoría de errores [2]:

$$dA_B = (100/P^2) (P_B dP_R + P_R dP_B) \quad (2) \quad R$$

Finalmente, se repitió el proceso anterior, pero con las variantes de colocar el gel en las bolsitas usando dos espesores distintos (0.70 y 1.50 mm), midiendo en cada caso las presiones correspondientes P_{BG} (i.e.,

a través de la bolsita con gel), que proporcionaron las respectivas atenuaciones porcentuales A_{BG} [%] y sus incertidumbres dA_{BG} . Ya con esto, la atenuación sólo debida al gel y su incertidumbre, se obtuvieron por simple diferencia de atenuaciones y suma de incertidumbres:

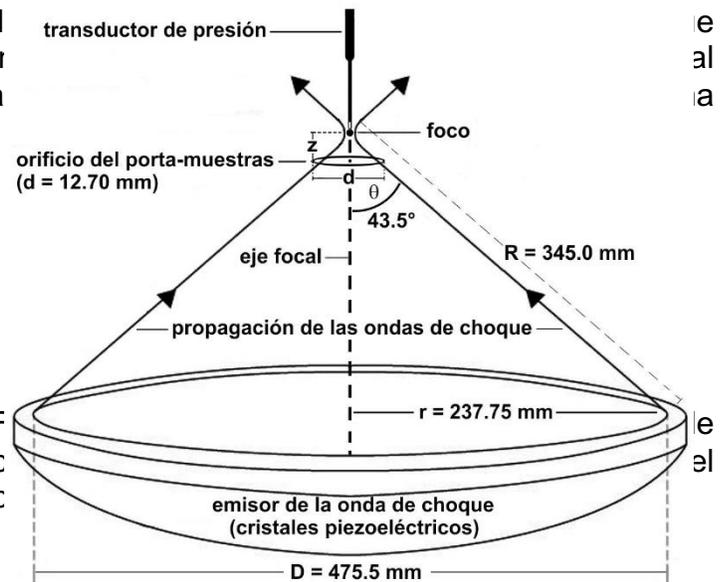
$$A_G [\%] = A_{BG} [\%] - A_B [\%] \quad \text{y} \quad dA_G = dA_{BG} + dA_B \quad (3)$$

Mediciones, resultados y discusión

Además de las especificaciones indicadas en la sección de equipos y materiales (modo de disparo, nivel de llenado de la tina y temperatura del agua), todas las mediciones de este reporte se efectuaron con un voltaje de descarga de 3 kV, porque en torno a este valor se tiene en el Generador Multifuncional [3] la densidad de flujo de energía EFD: = 0.16 mJ/mm², probada por otros autores en investigaciones afines [4] y es la que se usará como punto de partida en el proyecto antes referido.

En la figura 2 se muestra un diagrama del Generador Multifuncional, con las distancias (z) y (r) , mediante las cuales se conoce el ángulo (θ) de la trayectoria de las ondas de choque.

Tal ángulo permitió estimar la distancia máxima z que puede alejarse el centro del porta-muestras del foco del generador, al momento de medir presiones de referencia, previendo que el orificio del porta-muestras (de 6.35 mm de radio) permitiera el paso de dicho cono de trayectorias de las ondas de choque con la mayor libertad geométrica posible.



Por simple trigonometría, $z = 6.35 \text{ mm} / \tan(43.5^\circ) \approx 6.7 \text{ mm}$, aunque se limitó su valor a 4.0 mm como prevención, ya que esta estimación sólo se basa en aspectos geométricos; es decir, no contempla los efectos no lineales que sufren las ondas de choque en las cercanías de la región focal, ni los fenómenos complejos en torno a dicho orificio del porta-muestras, que podrían ser significativos.

En la primera serie de datos que se muestra en la tabla 1, se midió tanto la presión de referencia (P_R) como las presiones a través de la bolsita vacía (P_B) y de la que contenía el gel con espesor de 0.7 mm (P_{BG1}), según aparece en los encabezados de la 2ª, 3ª y 4ª columnas. Todos los valores están en unidades análogas (mV) y para tenerlos en unidades absolutas (MPa), basta dividir cada dato entre el factor de conversión antes mencionado (14.8605 mV/MPa). En cada caso se emitieron los 5 frentes de choque mostrados en la 1ª

columna, obteniendo cada valor de presión en el osciloscopio con el medidor digital de amplitud habilitado, a fin de obtener los valores promedio y las desviaciones estándar que están en las últimas dos filas de la tabla. En todo este proceso el plano del porta-muestras se mantuvo a la distancia $z = 4.0$ mm del plano focal, exceptuando los datos de la última columna que también corresponden a las presiones a través de la bolsita con gel de 0.7 mm de espesor (P_{BG1}), pero con la variante de que esta última se desplazó (moviendo el porta-muestras) hasta tener contacto con la punta del transductor de presión (i.e., la distancia z fue reducida a cero), ya que esta situación se aproxima más a los ataques de las muestras de prótesis cubiertas con el gel, contemplados en el proyecto.

Tabla 1) Presiones: de referencia (P_R), a través de la bolsita vacía (P_B) y a través de la bolsita con 0.7 mm de gel (P_{BG1}), para $z = 4.0$ mm (columnas 2, 3 y 4) y $z = 0$ (columna 5).

O-CH	P_R [mV]	P_B [mV]	P_{BG1} [mV]	P_{BG1} [mV], $z = 0$
1	178	173	100	333
2	173	171	100	336
3	172	169	102	333
4	170	171	100	334
5	171	170	99	335
Promedio:	172.8	170.8	100.2	334.2
Desv. Std.:	3.11	1.48	1.10	1.30

Cabe mencionar que en mediciones rutinarias de la presión focal del Generador Multifuncional sin porta-muestras de por medio [5], esta ha tenido el valor $P_O = 323 \pm 4$ mV para el voltaje de 3 kV y se considera como *presión estándar* al caso, por lo que en la presión de referencia aquí obtenida (172.8 ± 3.11 mV) muy probablemente ocurrieron los efectos de borde del porta-muestras antes mencionados, no obstante de la limitación del valor de z a 4.0 mm.

También es notable que todas las desviaciones estándar de la tabla presentan valores inferiores a 4 mV, cantidad que ya se ha demostrado comprende las incertidumbres sistemáticas de la medición de presiones a 3 kV [5], por lo que se pueden considerar $dP_R = 3.11$ mV, $dP_B = 1.48$ mV y $dP_{BG} = 1.10$ mV para estimar las incertidumbres de las atenuaciones que se calculan a continuación, las cuales son procedentes aun cuando se obtuvieron con presiones limitadas, ya que las limitantes ocurrieron de igual forma en todos los casos, exceptuando los datos de la última columna (para $z = 0$) que se discuten posteriormente.

Al sustituir los valores promedio de las columnas 2 a 4 de la tabla 1 en las ecs. 1 y 2 anteriores, se tiene: $A_B = 1.16 \pm 2.64$ % y $A_{BG1} = 42.01 \pm 1.68$ %, de donde se puede asegurar que la bolsita vacía prácticamente no atenúa (el valor encontrado resultó inferior al margen de incertidumbre), mientras que la bolsita con gel de 0.7 mm de espesor si presentó una atenuación significativa alrededor de 42 %. Si se descuenta la contribución de la bolsita (ecs. 3), se tiene para el gel en sí: $A_{G1} = 40.85 \pm 4.32$ %.

También es de mencionar que en los cinco oscilogramas correspondientes a P_{BG1} (con $z = 4$ mm) se observó leve distorsión y cambio de fase en los perfiles de presión, los cuales son típicos de ondas de choque que atraviesan medios con mayor densidad que el agua, por lo que se puede asegurar que tal coeficiente se debe estrictamente "al paso de la onda de choque"; es decir, cuando la onda de choque se propagó en agua y traspasó la bolsita con gel, regresando nuevamente al agua para finalmente llegar al foco, lo cual no son precisamente las condiciones de las muestras de prótesis dentales a atacar, ya que sobre estas se colocará el gel sin que exista nuevamente agua de por medio.

Por lo anterior, esta primera serie de mediciones se completó con la variante de acercar la bolsita con gel hasta su contacto con el transductor de presión ($z = 0$), obteniendo las presiones mostradas en la última columna de la tabla anterior, donde es notable que el valor promedio ($P_{BG1} = 334.2 \pm 1.30$ mV) no sólo excede en más de 90 % la presión de referencia (172.8 ± 3.11 mV, con $z = 4.0$ mm), sino que alcanzó a sobrepasar ligeramente dicha presión estándar ($P_O = 323 \pm 4$ mV) con perfiles de onda sin distorsión alguna. En este caso sólo tuvo sentido calcular la atenuación contra dicha presión estándar, no obstante de esperar un leve valor negativo en esta (que implicaría refuerzo), ya que también fueron de interés las incertidumbres involucradas.

Así, al comparar los resultados de la 5ª columna de la tabla anterior contra la presión estándar, se obtiene: $A_{BG1 \text{ vs Std}} = -3.34 \pm 1.68$ %; y al aplicar las ecs. 3 para descontar la contribución de la bolsita, resulta para la capa de gel de 0.7 mm de espesor: $A_{G1 \text{ vs Std}} = -2.18 \pm 4.32$ %, donde la incertidumbre es mayor al coeficiente y ello permite asegurar que prácticamente no hubo atenuación o quizás ocurrió un leve refuerzo a la concentración de las ondas de choque en el foco.

Como segunda serie de datos, destinada a confirmar los efectos de borde del porta-muestras antes mencionados, así como la atenuación del gel al paso de la onda de choque, se midieron las presiones a través de las bolsitas conteniendo gel, tanto con 0.7 mm como con 1.5 mm de espesor (P_{BG1} y P_{BG2} respectivamente), previo registro de las presiones de referencia en cada caso (P_{R1} y P_{R2} , sin bolsita alguna en el porta-muestras) y todo ello ahora con la distancia $z = 2$ mm entre el plano del porta-muestras y el plano focal. Las mediciones efectuadas, así como sus promedios y desviaciones estándar, se muestran en las columnas 2 a 5 de la tabla 2. También se midieron presiones para el caso de la bolsita con gel de mayor espesor (1.5 mm) en contacto con la punta del transductor (a $z = 0$), las cuales se incluyen en la 6ª columna de dicha tabla.

Tabla 2) Presiones a través de las bolsitas con 0.7 y 1.5 mm de gel (P_{BG1} y P_{BG2}), con sus respectivas presiones de referencia (P_{R1} y P_{R2}), para $z = 2$ mm (columnas 2 a 5). La 6ª columna corresponde a la bolsita con mayor espesor del gel (P_{BG2}), en contacto con el transductor ($z = 0$).

O-CH	P_{R1} [mV]	P_{BG1} [mV]	P_{R2} [mV]	P_{BG2} [mV]	P_{BG2} [mV], $z = 0$
1	214	195	229	148	200
2	216	194	229	143	202
3	214	191	226	143	201
4	217	194	226	140	206
5	217	190	226	139	206
Promedio:	215.6	192.8	227.2	142.6	203
Desv. Std.:	1.52	2.17	1.64	3.51	2.83

Ahora las nuevas presiones de referencia (215.6 y 227.2 mV, con $z = 2$ mm) tuvieron una magnitud ostensiblemente mayor que la de la tabla 1 (172.8 mV, con $z = 4$ mm), lo cual era de esperarse ya que a mayor cercanía del porta-muestras con respecto al foco, el orificio

del soporte permite más holgura al cono de trayectorias de las ondas de choque (ver figura 2). No obstante, no se alcanzó la presión estándar antes referida (323 ± 4 mV), lo cual sugiere que todavía prevalecieron dichos efectos de borde del porta- muestras, aunque en menor grado. También era de esperarse que ambas nuevas presiones de referencia tuvieran el mismo valor (dentro de sus incertidumbres); sin embargo, difieren en 11.6 ± 3.2 mV, cantidad que, aunque pequeña es significativa y probablemente ocurrió por algún error estocástico en el posicionamiento del porta-muestras o del transductor. Lo relativamente pequeño de tal diferencia, no altera de forma considerable los resultados obtenidos con una media de ellas o su intercambio, por lo que se mantuvieron dichas referencias con sus respectivas muestras.

Nuevamente todas las desviaciones estándar de la tabla anterior tuvieron valores inferiores a la incertidumbre sistemática estándar (4 mV), por lo que se asociaron a las diferenciales dP de cada caso al aplicar la ecs. 1 a 3 para obtener los coeficientes de atenuación siguientes:

Bolsita con 0.7 mm de gel, $z = 2$ mm: $A_{BG1} = 10.58 \pm 1.63$ %; gel sin bolsita: $A_{G1} = 9.42 \pm 4.27$ %. Bolsita con 1.5 mm de gel, $z = 2$ mm: $A_{BG2} = 37.24 \pm 2.00$ %; gel sin bolsita: $A_{G2} = 36.08 \pm 4.64$ %.

Bolsita con 1.5 mm de gel, $z = 0$ mm: $A_{BG2 \text{ vs Std}} = 37.15 \pm 1.65$ %; gel sin bolsita: $A_{G1 \text{ vs Std}} = 35.99 \pm 4.29$ %.

Es notable que con $z = 2$ mm, la bolsita con 0.7 mm de gel presentó una atenuación alrededor del 10 %, mientras que en la 1ª serie de mediciones (con $z = 4$ mm) atenuó un 42 %. Esto permite asegurar mayor aproximación a los ataques a efectuar sobre las muestras de prótesis dentales con gel; es decir, “el paso de la onda de choque” se aproxima más a la llegada de la onda de choque a los medios con mayor densidad que el agua (gel y/o polimetilmetacrilato de las prótesis dentales).

Lo anterior también se detectó con la otra bolsita que contenía mayor espesor del gel (1.5 mm), la cual aunque no fue probada en la 1ª serie de mediciones, en estos ataques su coeficiente de atenuación (~ 37 %) fue prácticamente el mismo tanto para $z = 2$ mm como para el caso de la bolsita en contacto con la punta del transductor de presión ($z = 0$), lo que adicionalmente implica que tal espesor del gel sí produjo una atenuación significativa que complementa lo anticipado en el reporte anterior ^[1], donde un espesor de 6.75 mm del mismo gel, dentro de un vial, produjo una atenuación alrededor de 64 % para ondas de choque generadas con 3 kV.

Conclusiones

Para los propósitos del proyecto al que se destina este reporte y el anterior ^[1], puede afirmarse que capas del gel Daktarín® con espesor de hasta 0.7 mm (aplicadas a materiales sólidos), no causan atenuación significativa a las ondas de choque emitidas por el Generador Multifuncional con voltajes mayores o iguales a 3 kV (presiones mayores o iguales a 21.5 MPa). Su aplicación con poco más del doble del espesor anterior (1.5 mm), sí produjo una atenuación significativa (~ 37 %), por lo que es de esperar que el grosor límite de dicho gel sin causar atenuación considerable, se encuentre en el intervalo de 0.7 a 1.5 mm y habría que hacer más experimentos para determinarlo con mayor precisión.

En general, también se demostró que los contenedores de muestras como las bolsitas elaboradas con plástico (polietileno # 6 de 0.05 mm de espesor), así como los viales de 4 ml comúnmente usados en diversos experimentos del mencionado laboratorio; no causan atenuación significativa a las ondas de choque generadas por dicho equipo en el rango de operación especificado, siempre que tales contenedores estén llenos con la muestra bajo análisis, ya que contenidos parciales involucran interfaces con el aire en las que podrían ocurrir otros efectos, lo cual actualmente está en investigación.

Referencias

Análisis de la permeabilidad mecánica de una pipeta de transferencia (vial), así como de gel Daktarín®, ante el paso de ondas de choque concentradas. Giezi Velázquez Carreto y Francisco Fernández Escobar. *Reporte interno*, Lab. de Ondas de Choque del CFATA-UNAM. Juriquilla Qro., México (marzo de 2020).

Experimentation: An Introduction to Measurement Theory and Experiment Design. D. C. Baird. Ed. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ USA (1962).

Densidades de energía del Generador de Ondas de Choque Multifuncional. Francisco Fernández Escobar. *Reporte interno*, Lab. de Ondas de Choque del CFATA-UNAM. Juriquilla Qro., México (Agosto de 2021).

Low-energy shock waves enhance the susceptibility of staphylococcal biofilms to antimicrobial agents in vitro. S. Wanner, M. Gstöttner, R. Meirer, J. Hausdorfer, M. Fille, B. Stöckl. *J Bone Joint Surg* 93-B: 6, 824- 827 (June 2011).

Técnica para caracterizar la región focal de un generador de ondas de choque en agua, aplicada al Generador Multifuncional del Laboratorio de Ondas de Choque en el CFATA. Francisco Fernández Escobar. *Reporte interno*, Lab. de Ondas de Choque del CFATA-UNAM. Juriquilla Qro., México (julio de 2020)

