

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA

Programa de Especialidad en Endodoncia



**“ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS VLPs-
(DCD-1L) COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO”**

Trabajo terminal que para obtener el Diploma en Endodoncia
presenta:

Brenda Stephany Rojo Maldonado

PRESIDENTA

Dra. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

CDEE Julio César García Briones

SINODAL

Dra. Alicia Percevault Manzano

Tijuana, Baja California, Mayo, 2015.

ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS VLPs-
(DCD-1L) COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO.

Tesis defendida por

Brenda Stephany Rojo Maldonado

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez.

Presidente del Comité

CDEE Julio César García Briones

Dra. Alicia Percevault Manzano

Miembro del Comité

Miembro del Comité

Dr. Oscar Rene Bolaños

Sinodal externo

<<Mayo>><<2015>

Tesis de Brenda Stephany Rojo Maldonado, presentada como requisito parcial para la obtener el diploma en Especialidad en Endodoncia.

Título de la tesis

“ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS VLPs-
(DCD-1L) COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO”

Aprobado por:

Dr. Ana Gabriela Carrillo Vázquez

TUTOR

M.C Alfredo Nuñez Rivera

ASESOR

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Co-ASESOR

Contenido

	Página	
Resumen	II	
Dedicatorias.....	III	
Agradecimientos.....	IV	
I. Introducción.....	1	
II. Marco Teórico.....	4	
2.1 Biofilm en endodoncia.....	4	
2.2 Mecanismos de defensa del biofilm	5	
2.3 Bacterias que conforman el biofilm	6	
2.4 Medicación intraconducto	8	
2.5 Medicamentos empleados en la terapia endodóntica	10	
2.6 Péptidos Antimicrobianos	15	
2.6.1 Mecanismo de acción	16	
2.7 Dermcidin-1L	18	
2.8 El uso de virus como vectores en terapias biotecnológicas..	20	
2.9 El virus del CCMV como modelo de estudio	22	
III. Justificación	23	
IV.....	Planteamiento del problema	24
V.....	Hipótesis	24
VI.....	Objetivo	24
VII. Materiales y Métodos	25	
7.1 Purificación del CCMV	25	
7.2 Síntesis de VLPs-(DCD-1L).....	25	
7.3 Caracterización de las VLPs por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	26	
7.4 Efecto antimicrobiano del DCD-1L	26	
7.5 Análisis del efecto antimicrobiano de la VLPs-(DCD-1L) por microscopia confocal	27	
7.6 Análisis del efecto antimicrobiano de la VLPs-(DCD-1L) por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	27	
7.7 Ensayos de sensidiscos	27	
7.8 Cultivo celular / Ensayos de biocompatibilidad de las VLPs-(DCD-1L) y del Ca(OH) ₂	28	

7.9 Ensayos de integridad de las VLPs	28
7.10 Tipo de estudio.....	28
7.11 Criterios de inclusión	28
7.12 Criterios de exclusión	29
7.13 Criterios de eliminación	29
VIII. Resultados.....	29
8.1 Determinar el efecto antimicrobiano del DCD-1L ante patógenos presentes en endodoncia.....	29
8.2 Diseñar y construir VLPs derivadas del CCMV que encapsiden al DCD-1L.....	31
8.3 Determinar la concentración mínima inhibitoria que se requiere de VLPs-(DCD-1L) para generar el efecto antimicrobiano	35
8.4 Determinar que las VLPs-(DCD-1L) no generan ningún efecto citotóxico en células de origen humano	41
8.5 Determinar la integridad de las VLPs-(DCD-1L) ante vibración ultrasónica pasiva	43
IX. Discusión	44
X. Conclusiones.....	46
X.I Perspectivas.....	47
X.II Bibliografía	48-55
X.III Apéndice Soluciones y buffers	57-58
X.IV Anexos Abreviaturas/ Figuras suplementarias.....	58-65

Resumen

El éxito del tratamiento de conductos radiculares radica en una correcta instrumentación, irrigación y obturación del sistema de conductos con el objetivo primordial de optimizar la desinfección y así prevenir una reinfección del órgano dentario. Hoy en día una novedosa herramienta para combatir este tipo de padecimientos es la Nanomedicina, específicamente el uso de vectores virales que nos permiten acarrear moléculas, como péptidos antimicrobianos (AMPs), de manera específica al sistema de conductos radiculares e inducir su efecto antimicrobiano en patógenos presentes. El sistema inmune de los humanos cuenta con estos AMPs que representan una barrera contra infecciones bacterianas persistentes. Una de estas moléculas es el Dermicin (DCD-1L), el cual tiene un amplio espectro de acción ya que erradica bacterias tanto gram negativas como positivas y hongos. Cabe mencionar que a diferencia de los antibióticos, no existe evidencia de que las bacterias puedan generar alguna resistencia a los AMPs. El virus moteado clorótico del caupí, por sus siglas en inglés CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle Virus), es un patógeno de plantas de fácil manejo, muy estable y no tóxico para células de mamífero. Por lo que recientemente se ha propuesto como un candidato para utilizarse en diversas terapias génicas. En este trabajo a partir del virus CCMV se construyeron partículas tipo-virus (VLPs) con el péptido DCD-1L como carga. Estas nanopartículas VLP-DCD-1L fueron capaces de inhibir de manera prolongada el crecimiento de patógenos presentes en los órganos dentarios. En base a antecedentes previos se podría proponer que el DCD-1L podría inducir la regeneración de tejidos, por lo que conllevaría a la recuperación más rápida del paciente.

Palabras clave: **Virus, AMPs, CCMV, Endodoncia, VLPs.**

Dedicatorias

El presente trabajo, lo dedico de manera especial a mi familia, a mi hermana, a mi abuela, y principalmente a mis padres, que gracias a ellos quiénes me han forjado una grandiosa educación y han sabido guiarme para culminar este gran paso y cumplir este gran objetivo, mi deseo de ser especialista en Endodoncia. Por lo que les agradezco todos los sacrificios que les pudiera haber conllevado el presentarme esta bella oportunidad. De igual manera agradezco infinitamente a mis asesores y tutores por dedicar su tiempo, su apoyo y el brindarme sus conocimientos los cuales dieron frutos y grandes resultados en este proyecto y desarrollo de mi formación profesional.

Gracias.

IV

Agradecimientos

M. en C. Alfredo Nuñez
Rivera.

Dr. Rubén Darío Cadena

Nava. Dr. Rafael Vázquez

Duhalt.

Dr. Ana Gabriela Carrillo Vázquez.

Israel Martinez Gradilla. Técnico del SEM

Francisco Ruiz Medina. Técnico del SEM


Dra. Katrin Quester. Técnico de

Laboratorio

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM).

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC)/ Facultad de Odontología Tijuana/ Posgrado en Endodoncia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para realizar este proyecto de investigación.



INTRODUCCIÓN

La complejidad de la anatomía del sistema de conductos radiculares limita la acción mecánica de los instrumentos en endodoncia, haciendo recomendables el uso de soluciones químicas con actividad antibacteriana ². Los microorganismos son los principales agentes etiológicos implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical. Asimismo la desinfección mediante medicación intraconducto, se recomienda para eliminar los microorganismos residuales albergados en los conductos radiculares ^{4,5}

Dentro de los diversos factores descritos para determinar un fracaso en el tratamiento de conductos empleando potentes agentes irrigantes, incluyen, el grado de toxicidad así como la complejidad anatómica, lo que confiere una inadecuada irrigación y limpieza del conducto radicular en su totalidad; dejando bacterias residentes intraconducto, pudiendo ser causantes de una reinfección.

Sin embargo, el abordar los tres componentes básicos de la endodoncia como es el desbridamiento mecánico, la desinfección química, y la colocación de un apósito antimicrobiano no logran eliminar la totalidad de microorganismos de el sistema de conductos radiculares⁶. Especies patógenas tales como *Enterococcus Faecalis* puede evadir los tratamiento actuales, por lo que se encuentra comúnmente en los casos donde existe un fracaso endodóntico⁷. La persistencia de infección e inflamación están asociados generalmente cuando no se consiguen los resultados deseados del tratamiento endodóntico no quirúrgico, por lo tanto se considera que la causa del fracaso endodóntico es multifactorial⁸. El manejo y control de procesos de infección en órganos dentarios en donde evidentemente existe una fuerte carga bacteriana se considera complicado el abordarlo con los protocolos de desinfección establecidos en Endodoncia, por lo que un alto índice de estos recae en retratamiento¹⁰.

El desarrollo de un agente antimicrobiano con actividad de amplio espectro ante un cierto tipo de bacterias como las de la microflora endodóntica, y que sea bien tolerado por los tejidos periradicales, sería una valiosa adición al protocolo de tratamiento de conductos radiculares. La investigación sobre la caries y la

enfermedad periodontal ha destacado el potencial de los péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos eficaces⁹.

Antecedentes previos han demostrado que una gran variedad de péptidos antimicrobianos, tanto catiónicos como aniónicos, que son capaces de presentar un efecto citotóxico, al promover la formación de poro en la membrana celular, en las bacterias presentes en los biofilms endodónticos. Sin embargo, el potencial de los AMPs puede comprometerse debido a las condiciones adversas de los conductos, ya que presentan pH elevado y existen moléculas como proteasas y desechos celulares que conllevan a la degradación de los AMPs^{11, 12, 13}.

Actualmente se conoce que mas del 70 % de casos clínicos asociados a infecciones dentales son resistentes a antibióticos ya existentes. Esta resistencia generada por las bacterias se debe principalmente a la alteración del sitio de acción del antibiótico, la inactivación de los fármacos, o cambios durante su metabolización. Los AMPs sintéticos exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana similar a la que ocurre de forma natural, por lo tanto la resistencia a tales agentes es poco frecuente. Estos péptidos que están compuestos aproximadamente de 10-50 aminoácidos y poseen una carga positiva, en su mayoría, o negativa se agrupan como AMPs. La razón por la cual los AMPs poseen carga positiva se debe a la presencia de grandes cantidades de residuos de lisina y arginina. Los AMPs sintéticos también ofrecen la flexibilidad para la inclusión de aminoácidos no naturales tales como α , β didehidrofenilalanina (Δ Phe), D-aminoácidos, ácido aminoisobutírico (Aib), aminoácidos N-metilado durante la síntesis y tales modificaciones conducen a una mejor estabilidad de estos péptidos hacia la proteólisis. Se ha informado que los AMPs con aminoácidos modificados han mejorado la eficacia antimicrobiana y por tanto su aplicación clínica¹³.

Varios estudios han demostrado que los microorganismos organizados en biofilm evaden la defensa del huésped y resisten a diversos agentes antimicrobianos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes que erradiquen a estos microorganismos se le atribuye gran relevancia. La principal ventaja de los AMPs reside en su

mecanismo de acción, el cual es diferente al de los antibióticos convencionales y además han demostrado un aumento en la actividad antimicrobiana alterando la integridad de la membrana bacteriana.

En este trabajo se pretende utilizar como vector al CCMV y construir partículas tipo-virus (VLPs) que encapside al péptido DCD-1L (con actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral), el cual es capaz de inhibir de manera prolongada el crecimiento de la infección presente en los órganos dentarios, a una menor concentración en un corto período de tiempo, y sin generar mecanismos de resistencia microbiana. A su vez de manera colateral podría contribuir en la regeneración de pulpa.

I. MARCO TEÓRICO

2.1 BIOFILM EN ENDODONCIA

La mayor parte del conocimiento sobre la microflora endodóntica se basa en estudios de cultivo. Actualmente el visualizar a un microorganismo bacteriano, cultivarlo en un medio líquido y analizar su comportamiento, se considera uno de las técnicas más utilizadas para el estudio de la patogénesis y la fisiología de la bacteria ¹⁴.

Observaciones directas de una amplia variedad de habitantes naturales ha permitido establecer que la mayoría de los microorganismos persisten unidos a una superficie dentro de un estructurado ecosistema denominado biofilm, y no como organismos flotando libremente ¹⁵. El biofilm o biopelícula se puede definir como una estructura asociativa de una o varias estirpes bacterianas, embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos autoproducida y que se encuentra adherida a una superficie o sustrato. Según la organización mundial de la salud (OMS), el biofilm se puede definir también como un ecosistema bacteriano proliferante y enzimáticamente activo. Los biofilms se unen a superficies inertes, tanto biológicas como sintéticas. Dentro de las biológicas optan preferentemente por tejidos necróticos ^{16,17,18}. La importancia en la Endodoncia de esta forma de vida bacteriana es que es más resistente a los distintos germicidas conocidos que las bacterias en suspensión y que se postula como la causa de fracaso de tratamientos de conductos aparentemente realizados correctamente ¹⁹. Para Siqueira y Rôças los casos de infección periapical crónica deben considerarse, al día de hoy, infecciones de tipo biofilm ²⁰.

El proceso de formación del biofilm en el conducto radicular es aún muy desconocido. La teoría más aceptada consta de cuatro fases y fue descrita por Svensäter y Bergenholtz ²¹. En la primera fase se forma una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos derivados de las bacterias en suspensión, del proceso necrosis y/o inflamación, etc. En la segunda, sobre esa película pegajosa, se fijan algunas bacterias

específicas con capacidad de adhesión, de todas las que están en suspensión. En la tercera, la primera capa de bacterias ya adherida, segrega mediadores que, por un lado van fijando más y más bacterias, de esa estirpe o de otras, y por otro, va formando la matriz extracelular de polisacárido, primera barrera defensiva característica del biofilm. En la cuarta y última, el biofilm va madurando y creando sistemas de defensa más complejos. Al mismo tiempo, arroja bacterias al exterior que cronifican la respuesta inflamatoria del huésped. Siqueira y Rôças²⁰ exponen que en esta etapa el conjunto del biofilm puede consistir en 15% de bacterias y 85% de matriz de polisacáridos, además de contar con más de 300 capas de bacterias superpuestas. La teoría más aceptada hasta el momento respecto a la supervivencia del biofilm admite que no es más resistente el biofilm compuesto por bacterias resistentes en solitario, sino que es más resistente cuanto mayor número de bacterias con capacidad de autoagregarse. A más tiempo de evolución, más tiempo para mejorar y sofisticar los sistemas de defensa del biofilm por parte de diferentes estirpes bacterianas²². Incluso, se considera por los microbiólogos como un factor más de patogenicidad de las bacterias la capacidad de asociarse en biofilms, es decir, la unión entre dos estirpes bacterianas distintas que presenten parámetros similares de tasas de división, permanencia en tejido vivo, capacidad de liberar endotoxinas, etc. Se considera una estirpe más peligrosa aquella que haya mostrado más capacidad para iniciar un biofilm²⁰.

2.2 MECANISMOS DE DEFENSA DEL BIOFILM

La biopelícula bacteriana se caracteriza, principalmente, por una gran capacidad de resistencia. Esta capacidad se ve aún más aumentada en el interior del sistema de conductos ya que, su anatomía proporciona zonas de difícil acceso a los agentes desinfectantes. Los sistemas de defensa conocidos hasta el momento con los que cuenta esta entidad infecciosa se resumen a continuación. La matriz de polisacáridos supone una barrera física y química, evitando la penetración de agentes externos indeseables, cambios de pH, etc., manteniendo un ambiente interior adecuado para la supervivencia y es considerado uno de los mecanismos

más importantes. Un aspecto interesante que se apunta es que este aislamiento del exterior pero con vías de comunicación interna fomenta el intercambio de material genético entre las bacterias que lo forman, favoreciendo las resistencias y, por tanto, aumentando la capacidad de defensa del biofilm. Las enzimas producidas por el biofilm, promueven la adhesión a otros sustratos o de otras bacterias y también actúan inactivando agente químicos anti-infecciosos ^{17,23,24,25}. En resumen, el biofilm tiene mayor capacidad de defensa que las bacterias en suspensión porque interacciona menos con el medio donde vive y depende menos de él, además de que su tasa de mitosis es mucho menor ^{15, 18, 23}. Las bacterias aglomeradas que conforman la biopelícula no provocan infecciones agudas, sino crónicas, debido al tipo de metabolismo del mismo y sus características. Siqueira y Rôças denominan este concepto como “biofilm lifestyle” ²⁰.

2.3 BACTERIAS QUE CONFORMAN EL BIOFILM

El grupo de microorganismos implicados en infecciones endodónticas, ha cambiado significativamente debido a los avances en los métodos de cultivo y técnicas moleculares. Anteriormente se creía que las bacterias gram-positivas fueron los principales habitantes de conductos infectados ²⁶. La mejora de las técnicas de muestreo que minimizan la contaminación y el desarrollo de cámaras anaeróbicas han permitido la identificación de bacterias anaerobias en cultivos de conductos radiculares. Las infecciones endodónticas primarias ahora se cree que son de naturaleza polimicrobiana y dominado por anaerobios obligados, con proporciones iguales de especies gram-positivas y gram-negativas ^{27,28}. En ensayos de cultivo predominan con mas frecuencia Streptococcus, Actinomyces, Prevotella, Porphyromonas, y un número limitado de otras especies en los conductos radiculares infectados ²⁹.

Los tipos bacterianos observados en el biofilm de origen endodóntico son, fundamentalmente, cocos, bacilos y filamentos, aunque ocasionalmente se han detectado espiroquetas ^{15, 24, 30}. Las especies del género Prevotella son muy

frecuentes debido a su capacidad de autoagregarse y coagregarse. Otros autores opinan que el *Fusobacterium nucleatum* es el componente central de muchos de los biofilms en infecciones odontogénicas, gracias a su enorme capacidad de coagregación y de resistencia a biocidas e incluso algunos consideran el *F. nucleatum* la bacteria clave o “puente” para el desarrollo del biofilm. Respecto al estudio del *Enterococcus faecalis* en relación al biofilm, se ha postulado que la resistencia de esta bacteria a ser eliminada del interior del conducto, ya sea con instrumentación, irrigación y/o con medicación intraconducto, se debe a que puede asociarse en forma de biofilm^{31,32,33}. George y cols.³⁴ analizaron la ultraestructura del biofilm de *E. faecalis* combinando medios ricos y pobres en nutrientes con medios aeróbicos y anaeróbicos en dientes extraídos. En sus resultados, exponen que el biofilm más desarrollado en madurez y organización es el que se da en medio rico y anaeróbico, advirtiendo incluso las estructuras en forma de champiñón y canales de agua descritas por Distel y cols.³⁵ En cambio, el medio rico y aeróbico formaba más cantidad de biofilm pero de menor organización, aunque era el más proclive a invadir los tubulillos dentinarios en profundidad. Postulan que esto quizás se deba a que al aumentar la cantidad de microbios, éstos buscan nuevas zonas de colonización, huyendo de la masificación, como ya expresaron Peters y cols³⁶.

Uno de los eternos debates en Endodoncia es la conveniencia de realizar el tratamiento de conductos en una o varias citas. Desde luego, la aparición del biofilm no ha hecho más que ampliar el debate hasta este concepto y actualizar la discusión. El hidróxido de calcio ha sido uno de los productos más empleados hasta el momento para asegurar o mejorar la limpieza y desinfección del sistema de conductos. El mecanismo de acción de este compuesto se basa en crear un ambiente eminentemente alcalino y, por tanto, más hostil para el crecimiento de la mayoría de bacterias. Además, tiene efecto químico antibacteriano sobre el metabolismo celular y capacidad para disolver tejido orgánico cuando se encuentra en íntimo contacto con él^{29,37,38}. Distel y cols.³⁵ estudiaron la repercusión del hidróxido de calcio sobre biofilms de *E. faecalis* en el interior de conducto radiculares in vitro. Observaron que el biofilm se forma aún en presencia

de hidróxido de calcio, en la mayoría de los casos, pero que el medicamento ayuda a disminuir las bacterias en el conducto y, por tanto, ralentizar la formación de biofilm. Además, una vez establecido el biofilm, el hidróxido de calcio atenúa su nivel de organización, impidiendo las formaciones de tipo champiñón, pero no lo elimina. Kayaoglu y cols.³⁹ publicaron que el *E. Faecalis* es más resistente al hidróxido de calcio cuando sus biofilms se asocian a colágeno extraído de la matriz de la dentina. Siqueira y Rôças²⁰ recomiendan la medicación intraconducto como imprescindible y la equiparan en importancia a una adecuada instrumentación biomecánica.

2.4 MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

La medicación intraconducto implica el uso interno de un medicamento con la intención de lograr efectos terapéuticos locales y no sistémicos. En endodoncia se asocia este concepto al empleo de antisépticos en el tratamiento de conductos radiculares infectados; aunque también se emplean antibióticos localmente como alternativa medicamentosa, corticoides para combatir el dolor y la inflamación, hidróxido de calcio o pastas alcalinas para reducir o ayudar a cohibir hemorragias.

A todo ello debe agregarse el empleo local de irrigantes y quelantes, coadyuvantes químicos de la instrumentación. Si el tratamiento de conductos radiculares no se completa en una sola sesión se recomiendan agentes antimicrobianos, para la antiseptia del interior del conducto, a fin de evitar el desarrollo de microorganismos hasta la finalización del tratamiento. El uso de medicamentos intraconducto, entre citas, ha sido rutina en la práctica endodóntica por muchos años como coadyuvante en el control de la contaminación bacteriana. Primero el medicamento puede reducir la flora microbiana por debajo de los niveles logrados durante la preparación del conducto, particularmente por penetrar en áreas donde los instrumentos o soluciones irrigadoras no llegan. Segundo, un agente antimicrobiano al permanecer en el conducto, entre citas, puede prevenir la reinfección del conducto radicular o reducir el riesgo de proliferación de bacterias

residuales, las cuales pueden alcanzar los mismos niveles que tenían al comienzo de las sesiones previas ^{40,41}.

En los dientes con pulpa necrótica, la medicación intraconducto resulta un auxiliar valioso en la desinfección del sistema de conductos radiculares, sobre todo en lugares inaccesibles a la instrumentación. En estas áreas no son accesibles a la instrumentación, sobre todo, cuando son dientes con necrosis pulpar y lesiones periapicales crónicas en los cuales el sistema de conductos radiculares está infectado, para lograr su desinfección.

En conductos radiculares infectados, la medicación intraconducto ha sido indicada para varios propósitos:

- Eliminar cualquier bacteria remanente después de la instrumentación del conducto.
- Reducir la inflamación de los tejidos periapicales y remanentes pulpares.
- Neutralizar los detritus titulares.
- Actúa como una barrera contra la filtración de la obturación temporal.
- Previene la reinfección del conducto y el aporte de nutrientes a las bacterias remanentes.
- Control del exudado o hemorragia.
- Control de la resorción inflamatoria de la raíz, ocasionada por algún traumatismo dental y que puede estar acompañada de infección y daño de los tejidos periapicales.

Por tanto, el objetivo principal de la medicación intraconducto es reducir el número de microorganismos, como parte de la asepsia controlada en conductos radiculares infectados, y su acción es coadyuvante en la limpieza y desinfección del conducto radicular. En este sentido, se plantea que cuando la instrumentación biomecánica es combinada con la colocación de un medicamento por un período de tiempo apropiado antes de la obturación, las bacterias pueden ser eliminadas más efectivamente. La falta de una medicación intraconducto disminuye el porcentaje de éxitos en los dientes con conductos infectados ^{42,43}.

2.5 MEDICAMENTOS EMPLEADOS EN LA TERAPIA ENDODÓNTICA

1. Compuestos Fenólicos

El fenol como tal, en cristales o licuados no solo es un pobre antiséptico sino que es sumamente cáustico por lo que no debe emplearse dentro de los conductos radiculares. Entre los compuestos fenólicos se encuentran: el eugenol, el paraclorofenol, paraclorofenol alcanforado, la cresatina o acetato de metacresilo, el cresol, la creosota y el timol. Todos son antisépticos potentes en contacto directo con las bacterias.

Si bien en la endodoncia ya no se utiliza el fenol por su alto índice de toxicidad-eficacia, uno de sus derivados, el para-monoclorofenol (PMCP) ha sido muy utilizado como medicamento intraconducto.

2. Aldehídos

El formaldehído, paraformaldehído o trioximetileno, glutaraldehido y formocresol han sido ampliamente utilizados en odontología y en endodoncia. Son agentes hidrosolubles que desnaturalizan proteínas y se encuentran entre los desinfectantes más potentes. Los aldehídos tienen aplicaciones en la desinfección de superficies y equipos que se puedan esterilizar, pero son muy tóxicos y alergénicos y algunos pueden ser carcinogénicos.

3. Compuestos Halogenados

Son eficaces bactericidas aún en presencia de tejido orgánico y su toxicidad es muy baja. Ocasionalmente, pueden provocar reacciones alérgicas. Los compuestos de cloro más empleados en endodoncia son los hipocloritos debido a su acción antiséptica y disolvente sobre tejido vital, necrótico y fijado.

4. Clorhexidina

Esta sustancia al parecer tiene un gran potencial como medicamento intraconducto. Su sustentividad, su espectro de actividad relativamente amplio y su baja toxicidad pueden hacerla muy adecuada para irrigación y aplicación de apósitos en endodoncia. Probablemente sería eficaz en concentraciones entre 0.2 y 2%⁴⁴.

El mecanismo antimicrobiano de la clorhexidina se relaciona con su estructura molecular de bisbiguanida catiónica. Esta molécula cuenta con una carga catiónica, por lo que puede atravesar la membrana celular causando filtración de componentes y muerte celular. En bajas concentraciones es bacteriostática. En altas concentraciones causará la coagulación y precipitación del citoplasma y además es bactericida⁴⁵.

Al comparar la actividad antibacteriana de soluciones irrigantes del conducto radicular en dientes con necrosis y patologías periapicales, después de cuantificar las unidades formadoras de colonias, se concluyó que tanto el gluconato de clorhexidina como el hipoclorito de sodio fueron significativamente efectivos para reducir los microorganismos en dientes con pulpa necrótica, patología periapical o ambos, y pueden ser usados exitosamente como una solución irrigante⁴⁶.

5. Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio es utilizado comúnmente en el tratamiento de conductos como medicamento entre citas. Su uso se ha incrementado con respecto a otros medicamentos tradicionales como los compuestos fenólicos y los aldehídos, que han declinado en popularidad por las razones ya expuestas. Aunque no existen recomendaciones específicas sobre cuándo debería colocarse hidróxido de calcio, la indicación general es en la necrosis pulpar⁴⁷. Introducido por Herman⁴⁸, en 1920, el hidróxido de calcio es un polvo blanco, granular, amorfo y fino, con la fórmula $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y un peso molecular de 74,08. Se obtiene por calcinación del carbonato cálcico y posee marcadas propiedades básicas, como un pH muy

alcalino, aproximadamente de 12.4, lo cual le confiere propiedades antimicrobinas. Su densidad es de 2.1, puede disolverse ligeramente en agua y es insoluble en alcohol con la particularidad de que al aumentar la temperatura disminuye su solubilidad.

Debido a su baja solubilidad, una gran cantidad de hidróxido de calcio puede ser compactado dentro del conducto con poco riesgo de irritación periapical⁴³. Posee una actividad cauterizante y por su consistencia de pasta restringe físicamente la formación de colonias bacterianas en el espacio del conducto.

Ha sido utilizado para una amplia variedad de propósitos que incluyen protector de cavidades, recubrimiento pulpar directo e indirecto, pulpotomía vital, medicación del conducto radicular entre citas, prevención de resorción radicular, reparación de perforaciones iatrogénicas, tratamiento de fracturas radiculares horizontales y como constituyente de selladores del conducto radicular. Tiene la capacidad de inducir la formación de tejido duro, causa oclusión intratubular, tiene acción antibacteriana y capacidad de disolver tejidos⁴⁵.

Las pastas de hidróxido de calcio actúan como una barrera físico mecánica que retarda significativamente la recontaminación del conducto. Sin embargo, ante la presencia de fluidos biológicos o tejidos que poseen sustancias buffer, los efectos antibacterianos pueden llegar a ser limitados⁴⁹.

El hidróxido de calcio se utiliza mezclado con diversos vehículos que por lo general no tienen actividad antibacteriana significativa⁵⁰. A estas combinaciones se les denominó pastas alcalinas por su elevado pH y se caracterizan por:

- a) Estar compuestas principalmente por hidróxido de calcio, pero asociado a otras sustancias para mejorar sus propiedades físicas o químicas.
- b) No endurecen.
- c) Se solubilizan y reabsorben en los tejidos vitales, a mayor o menor velocidad según el vehículo con el que están preparadas.

d) Puede prepararlas uno mismo, simplemente adicionando al polvo agua, o bien utilizarse preparados comerciales.

e) En el interior de los conductos se emplean como medicación temporal^{40,41}.

Con respecto a los cambios de pH que puedan presentarse con los vehículos empleados, Solak y Oztan⁵¹, utilizando un medidor de pH digital y evaluando vehículos acuosos como agua, dos soluciones anestésicas y solución fisiológica, determinaron que los cuatro vehículos demostraron cambios de pH similares que se encuentran entre 11 y 12. Una posible explicación del porqué los anestésicos no alteran su pH es que al mezclarlos, éstos tienen un pH ácido, y sólo una pequeña cantidad del vehículo se usa y la concentración de iones de hidrógeno disponibles no es suficiente para hacer alguna diferencia apreciable en el pH de la solución³⁵. Debido también a su alto pH, el hidróxido de calcio como medicamento intraconducto actúa como un agente efectivo en la remoción de detritos tisulares que permanecen en las paredes del conducto radicular, es decir, tiene la capacidad de disolver tejido orgánico. Esto lo demostraron Wadachi et al.⁵², con los resultados obtenidos por microscopia electrónica de barrido demostraron que el tratamiento con hidróxido de calcio a corto plazo podía disolver la mayoría del tejido pulpar sobre la pared del conducto, excepto la predentina.

Entre las desventajas del hidróxido de calcio encontramos: la pérdida de efecto frente a microorganismos específicos del conducto radicular, es difícil de remover del conducto, y puede disminuir el tiempo de fraguado de los selladores a base de óxido de zinc eugenol.

Estrela⁵⁴ reportó que no hay diferencia significativa en la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio en combinación con diferentes vehículos (solución salina, paramonoclofenol alcanforado, glicolpolietileno) sobre bacterias como el *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

Bezerra⁵⁵ demostró que el hidróxido de calcio detoxifica a los lipopolisacáridos in vivo. La colocación apropiada del hidróxido de calcio dentro del sistema del conducto radicular puede influir en su efectividad⁵⁶. Para la colocación del hidróxido de calcio, se usan diferentes pistolas, compactadores, instrumentos endodónticos, o puntas de papel, usualmente léntulos y con menos frecuencia sistemas de jeringa. Sin embargo, la literatura señala que una pérdida de la calidad con secciones del conducto no obturadas, es más probable que ocurra usando sistemas de jeringa⁵⁷. Torres y cols.⁵⁶ realizaron un estudio in vitro para comparar la efectividad de tres diferentes técnicas de colocación de pastas de hidróxido de calcio y el léntulo fue significativamente mejor que las otras técnicas.

Nerwich⁵⁸ encontró que CaOH se disemina en los túbulos dentinarios y alcanza la superficie radicular en siete días, por lo tanto, es necesario para eliminar las bacterias de los túbulos dentinarios mantener la medicación por ese tiempo en los conductos. Así mismo, como el *Enterococcus faecalis*, conocido con el microorganismo predominante de un 4-40% de la infecciones endodónticas, puede igualmente penetrar de manera profunda dentro del túbulo dentinario, permaneciendo inaccesible para su eliminación con el CaOH⁵⁹.

Por lo tanto se ha tratado de implementar nuevos agentes antimicrobianos para erradicar la presencia de estos microorganismos causantes de la infección endodóntica. Tal es el caso de los AMPs donde la importancia de estos radica en su mecanismo de acción, el cual es distinto a los antibióticos convencionales usualmente empleados en la terapia endodóntica, permitiendo la disrupción de la integridad de la membrana. Se mencionan hipótesis en donde probablemente los AMPs serian los mejores agentes antimicrobianos previniendo la posibilidad de una re-infección endodontica⁶⁰.

2.6 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los péptidos antimicrobianos (AMP), son considerados parte importante del sistema inmune innato, son pequeñas moléculas que pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, y antiviral⁶¹. Por lo general, estas moléculas están compuestas de 10 a 50 residuos de aminoácidos, y se disponen en diferentes grupos dependiendo de la composición de aminoácidos, así como su tamaño y conformación⁶².

El grupo más numeroso corresponde a los péptidos catiónicos, que se divide en tres clases⁶³. La primera clase está compuesta por péptidos catiónicos lineales α -helicoidal, como Magainina y cecropinas los cuales son lineales antes de su interacción con la membrana celular, en donde adoptan una estructura secundaria α -helicoidal anfipática⁶⁴. La segunda clase comprende a los péptidos catiónicos enriquecidos en aminoácidos específicos como prolina, arginina, y otros residuos. Estos péptidos son lineales, aunque algunos se pueden exhibir en espirales extendidas⁶⁵. La tercera categoría comprende a los péptidos catiónicos que contienen residuos de cisteína y forman enlaces disulfuro y estables β -plegadas. Las defensinas, un ejemplo de esta clase, tienen seis residuos de cisteína y se dividen de acuerdo a la alineación de sus puentes disulfuro (α -, β -, y θ -defensinas)⁶⁶.

Otros grupos de AMPs se describen como péptidos no catiónicos, péptidos aniónicos, péptidos aromáticos, y péptidos derivados de proteínas de unión a oxígeno⁶⁷. Así como los péptidos catiónicos, los péptidos aniónicos (AAMP) también son una parte importante del sistema inmune innato y se han identificado en vertebrados, invertebrados y plantas⁶⁷. Aunque la actividad antibacteriana de estos péptidos se considera débil, éstos podrían mejorar la actividad de los péptidos catiónicos⁶³.

Diferentes estudios revelaron que, además de carga péptido (aniónico o catiónico), otras características tales como tamaño, secuencia primaria, conformación,

estructura, hidrofobicidad, y anfipaticidad podrían ser esenciales para la actividad antimicrobiana y mecanismo de acción⁶⁸.

2.6.1 MECANISMOS DE ACCIÓN

El principal mecanismo de acción de los AMPs radica en la capacidad de causar daño a la membrana celular (Fig.1B). Los AMPs pueden interactuar con los microorganismos a través de las fuerzas electrostáticas entre sus residuos positivos de aminoácidos y las cargas negativas expuestas en la superficie celular. Se ha sugerido que la composición de la superficie celular conduce la especificidad. En este sentido, la sensibilidad de las células procariotas y eucariotas está directamente relacionada con las diferentes propiedades fisicoquímicas de los lípidos que se encuentran en ambas membranas celulares^{69,79}. En las membranas de mamíferos, los lípidos que se encuentran más comúnmente en el lado extracelular de la bicapa de fosfolípidos son neutros, tales como la fosfatidilcolina y esfingomiélin. Por otro lado, la membrana de la célula bacteriana está compuesta esencialmente por los lípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina, y la fosfatidiletanolamina iónica bipolar (PE)⁷¹.

La carga negativa general que se encuentra en la membrana de las bacterias tiene un papel importante en la unión de algunos péptidos a estos microorganismos preferencialmente. Por otra parte, las bacterias Gram-negativas contienen lipopolisacáridos (LPS) en su membrana externa, y la pared celular de las bacterias Gram-positivas se enriquece en polisacáridos ácidos (teicoico y ácidos teicurónicos). Estas moléculas confieren una carga negativa a la superficie bacteriana, por lo que fueron seleccionados como objetivos para AMPs catiónicos⁶⁵.

La interacción y la acción de los AMPs con sus células diana depende en gran medida en la superficie celular, así como en la composición de aminoácidos de estos péptidos. Esta idea es apoyada por la alta conservación de residuos de aminoácidos cargados positivamente entre los péptidos presentes en los diferentes organismos⁷². Además, la estructura secundaria adoptada por el péptido

es esencial para la unión a compuestos cargados negativamente en la membrana diana, tales como fosfolípidos aniónicos⁷³. Dependiendo de las proporciones de péptido / lípidos y de afinidad, estas moléculas peptídicas pueden estar orientados perpendicularmente, lo que permite su inserción en la bicapa lipídica y la formación de poros transmembrana^{65,74}, (Fig. 1A).

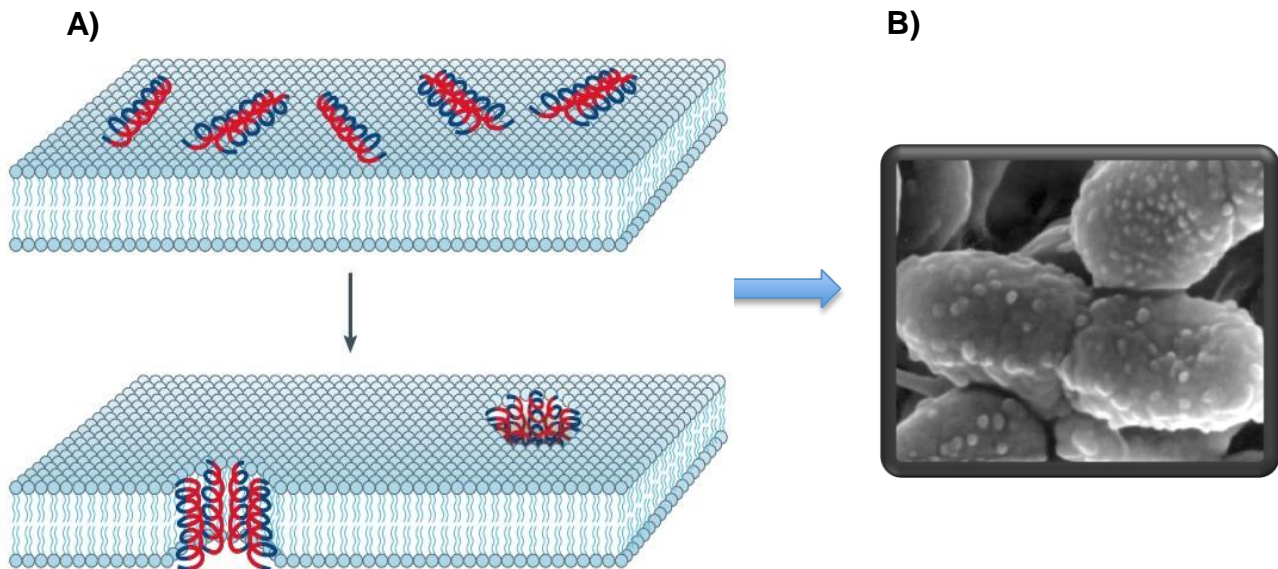


Figura 1. Inducción de muerte celular por los péptidos antimicrobianos.

A. En este modelo, los péptidos unidos se agregan y se insertan en la membrana de doble capa para que las regiones hidrofóbicas del péptido se alineen con los lípidos y las regiones hidrofílicas del péptido formen la región interior del poro. Las regiones hidrofílicas del péptido se muestran de color rojo y las regiones hidrofóbicas de la péptido se muestran de color azul. B. Células de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con ovine cathelicidin SMAP29 ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

En los seres humanos, se pueden encontrar pocos AAMPs, y su mecanismo de acción todavía no está claro. El Dermcidin (DCD-1L) es uno de los AAMPs humanos mejor estudiados. La expresión DCD-1L está restringida a células epiteliales, donde se expresa constitutivamente en las glándulas sudoríparas endocrinas, secretadas en el sudor y se transporta a la superficie epidérmica. Este péptido aniónico es capaz de eliminar agentes patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. Aureus* (resistente a metilina), *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas putida*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium*, y *Candida albicans*⁷⁶.

2.7 DERMCIDIN -1L

Hace 13 años, se descubrió el Dermcidin (DCD), un gen expresado en las glándulas sudoríparas endocrinas humanas. Su proteína precursora es secretada en el sudor, donde se produce a través del procesamiento proteolítico de una proteína precursora de 110 aminoácidos, que comprende 47 residuos de la parte C-terminal de la proteína, para dar lugar a péptidos antimicrobianos (AMPs) con un amplio espectro de actividad. El DCD no tiene homología con otros AMPs conocidos y muestra un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos patógenos^{75,76,77,78}.

Debido a su persistencia y abundancia, los péptidos derivados del Dermcidin contribuyen a la primera línea de defensa de la piel mediante la construcción de una barrera constante que recubre el epitelio. Especialmente en los lugares con mayor probabilidad de entrar en contacto con microorganismos patógenos, tales como la cara y las manos, una gran cantidad de DCD activo se han detectado en el sudor corporal y se considera el AMP más abundante en este fluido corporal. Otros AMP, como LL-37 y derivados proteolíticos, se han detectado en el sudor humano endocrino, sin embargo, a concentraciones 20 veces mas baja para ejercer la actividad antimicrobiana^{79,80}.

El DCD-1L, el cual se produce mediante la adición de un residuo de leucina a la parte C-terminal de DCD-1, muestra una mayor actividad antimicrobiana que el péptido parental ⁷⁷. Por lo tanto es importante destacar que el DCD-1L exhibe actividad contra *S. aureus* resistente a medicamentos, así como otras cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas⁷⁸. Recientemente, también se le ha atribuido un potencial antifúngico ⁷⁸.

Estudios recientes han demostrado que el DCD-1L aumenta su potencial de actividad antimicrobiana al interactuar con iones divalentes, como es el caso de Zn^{2+} , Na^{2+} , Ca^{2+} , etc ⁸¹ Fig (2). Esto al permitir la estabilización de las moléculas en forma de oligomero, y de esta forma interactuar con la membrana celular y promover la formación de canales iónicos, que conllevaran a la desestabilizar la membrana y promover la muerte celular. Por lo que se cree que el DCD representa una adaptación evolutiva a los mecanismos de resistencia bacteriana sobre la base de la repulsión electrostática de los AMPs catiónicos⁸¹.

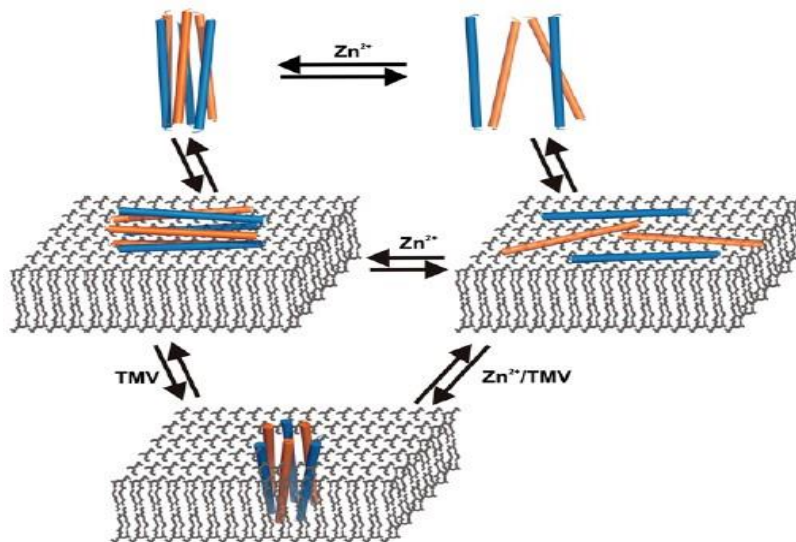


Figura 2. Modelo de interacciones del DCD con la membrana.

Los monómeros peptídicos del DCD están en equilibrio con la forma hexamérica del canal, que se estabiliza por la presencia de zinc. El canal puede ser translocado a la membrana tras la aplicación de un voltaje transmembranal, para formar un representación del modelo de barril.

2.8 EL USO DE VIRUS COMO VECTORES EN TERAPIAS BIOTECNOLÓGICAS.

Los tratamientos habituales para combatir procesos infecciosos asociados a bacterias y hongos (antibióticos, anti-fúngicos, quelantes y agentes químicos) no ofrecen ninguna especificidad hacia tejidos y parecen haber alcanzado un tope en su efectividad, debido a la que estos microorganismos en muchos casos generan resistencias a estos⁸². El desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas, cuya función sea el envío dirigido a células infectadas directamente en función a una única molecular blanco, está evolucionando como una nueva tendencia en el tratamiento contra procesos infecciosos^{82,83} (Fig. 3A). Dentro de este contexto, el concepto de introducir virus modificados, que específicamente se liberen dentro de los tejidos malignos, proporciona una oportunidad única de controlar una gran variedad de enfermedades, ya sea acarreado moléculas blanco de diferente naturaleza que combatan cierto padecimiento en particular⁸³.

Los virus han sido ampliamente estudiados desde diferentes enfoques, no solo como los agentes patógenos causantes de enfermedades sino también como vehículos para transportar algún tipo de material a diversos organismos. Existe evidencia reciente de casos específicos donde se reporta el uso de virus como tratamiento en pacientes con cáncer, en donde se utilizaron virus de baja toxicidad para tejidos normales y de alta capacidad citotóxica para células cancerígenas, dando como resultado efectos prometedores (Hansen RM, Libnoch JA . et al. 1978, Pack GT. et al. 1950)^{84,85}. Con base a estos antecedentes se han utilizado una amplia gama de virus como vectores en terapias génicas, como es el caso de los adenovirus, HSV-1, virus de la influenza, virus tipo replicon, reovirus, etc. Sin embargo todos estos virus son de origen animal, y no han sido del todo aceptados, ya que presentan efectos secundarios, por que son citotóxicos para células malignas pero también presentan actividad, en menor medida, en células normales. Debido a estas complicaciones hoy en día muchos grupos de investigación han empezado a trabajar con virus de plantas, ya que estos no presentan efectos citotóxicos en células de mamíferos. El virus del CCMV es un

buen modelo de estudio ya que es capaz de encapsidar una gran variedad de moléculas y es muy estable bajo varias condiciones (Fig. 3B), así como es capaz de ser genéticamente modificado sin comprometer su funcionalidad⁸³.

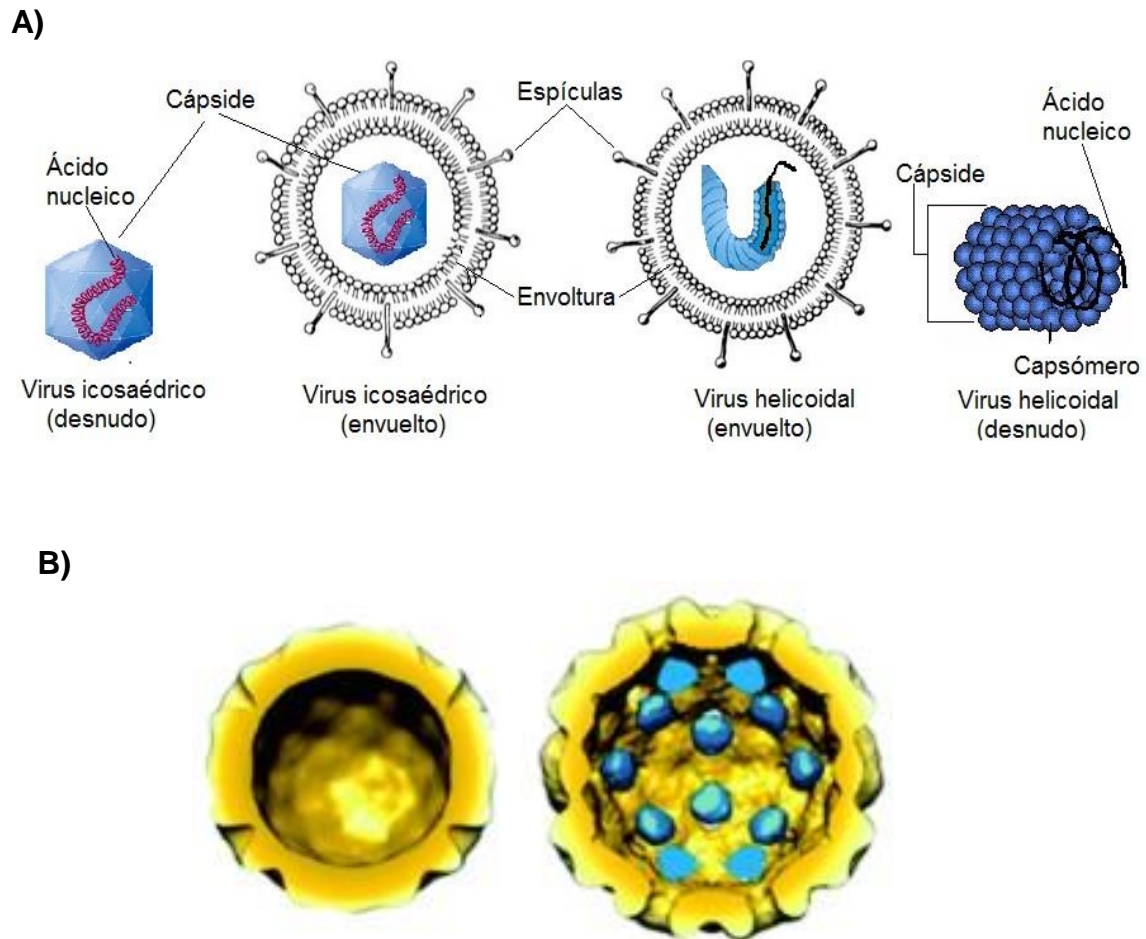


Figura 3. Representación esquemática de los componentes de los virus.

A. Representación esquemática de las diferentes estructuras y sistemas de empaquetamiento de partículas tipo virus. B. . Reconstrucción por criomicroscopía electrónica de transmisión del virus CCMV. En la imagen se observan los capsómeros en forma de hexámeros y pentámeros. (Imagen tomada de Michel *et al.*, 2006).

2.9 EL VIRUS DEL CCMV COMO MODELO DE ESTUDIO.

El CCMV es un virus de planta que pertenece al genero de los bromovirus, el cual esta constituido por una cápside icosaédrica (T=3) formada por 180 proteínas idénticas , compuesta de 12 pentámeros y 20 hexámeros (Bancroft et al. 1968)⁸⁶. Este virus tiene un diámetro exterior de 28 nm y cuenta con un peso molecular de 4.6×10^6 y puede encapsular moléculas de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de alrededor de 3000 nt (1×10^6 de peso molecular) (Finch et al., 1967, Bancroft et al., 1967). Sin embargo ya se ha demostrado que el CCMV es capaz de encapsular RNA heterólogo así como polímeros sintéticos aniónicos (Bracker et al., 1969). La estabilidad de este virus así como su proceso de ensamble y desensamble es importante ya que permite el encapsulamiento espontaneo de las moléculas de interés, y el cual se ha identificado que depende del pH de la solución y de la fuerza iónica (Bancroft JB, Hiebert E., 1967)⁸³ (Fig. 4). Además, la modificación química y funcional de la cápside de estos virus se han utilizado para la orientación y administración de fármacos o moléculas específicas de interés a células de mamífero (Destito et al., 2007; Gonzales et al., 2009; Yildiz et al., 2011; Steinmetz,N.F. et al., 2010, Wu et al., 2012)^{87,88,89,90,91}. Por lo que hoy en día no es sorprendente que se estén diseñando partículas tipo virus (VLPs) del CCMV que contienen una variedad de fármacos, péptidos, y toxinas que se han conjugado con algún péptido ligando para producir citotoxicidad selectiva contra patógenos específicos⁸⁸.

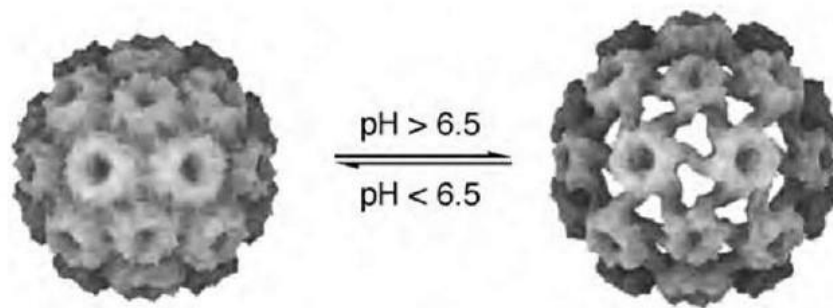


Figura 4. Esquema del proceso de hinchamiento reversible del CCMV dependiente de pH.

Este fenómeno permite un aumento del 10% en el tamaño de virus. Esta expansión provoca la formación de 60 aberturas separadas por ~ 20 a de diámetro. El virus hinchado permite el intercambio libre entre la cavidad del virus y el medio. En la forma nativa, los poros se cierran y no hay intercambio de moléculas.

II. JUSTIFICACIÓN.

El desarrollo de VLPs-(DCD-1L) como terapia biotecnológica nos permitirá controlar casos de infección prologada en órganos dentarios que presentan una alta carga bacteriana. Cabe mencionar que no existe reporte alguno de la utilización de VLPs-(AMPs) en casos endodónticos. Esta información abriría una ventana de opciones terapéuticas, ya que la utilización de estas partículas virales no solo se restringe a la rama endodóntica si no a la odontología en general.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el tratamiento empleado para la eliminación bacteriana en infecciones endodónticas, consiste en la irrigación del conducto radicular con agentes irrigantes de alto nivel biocida, como la Clorhexidina (CHX) y el Hipoclorito de Sodio (NaOCl). Sin embargo, las propiedades químicas de estos agentes, pueden dañar los tejidos periradiculares. Así mismo varios informes han demostrado que a pesar del uso de tales antisépticos, se producen fracasos en el tratamiento de conducto. Asimismo, se han registrado en casos de retratamientos que sólo el 33% de los órganos dentarios nuevamente obturados han mostrado éxito endodóntico, y el 24-77% de los casos resultaron como fracaso del tratamiento de conductos.¹³. Por lo tanto, ¿el uso de esta herramienta biotecnológica nos permitirá combatir infecciones endodónticas persistentes?

IV. HIPÓTESIS.

El uso de las VLPs-(DCD-1L) nos permitirá prolongar el tiempo de vida media de las moléculas cargo, al restringir su interacción con agentes contaminantes del medio. Por lo que esta terapia novedosa solucionara la mayoría de los inconvenientes presentes en el uso de medicamentos intraconducto, y conllevará a aumentar los casos de éxitos, evitando los posibles retratamientos.

V. OBJETIVO.

Demostrar que el DCD-1L encapsulados en las VLPs desencadenan un efecto antimicrobiano en casos de persistencia de infección.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto antimicrobiano del DCD-1L ante patógenos presentes en endodoncia.
2. Diseñar y construir VLPs derivadas del CCMV que encapsiden al DCD-1L.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria que se requiere de VPLs-DCD-1L para generar el efecto antimicrobiano.
4. Determinar que las VPLs-DCD-1L no generan ningún efecto citotóxico en células de origen humano.
5. Determinar la integridad de las VPLs-DCD-1L ante vibración ultrasónica pasiva.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Purificación CCMV

El virus CCMV es purificado de plantas caupi (*Vigna unguiculata* CV black eyes) infectadas con CCMV y la proteína de la cápside (CP) es aislada como se describió previamente (Cadena-Navaetal., 2011; Annamalai y Rao, 2005). La pureza del virus CCMV así como de la proteína purificada es determinada mediante Uv-vis y geles de poliacrilamida.

7.2 Síntesis de VLPs-(DCD-1L)

El DCD-1L es encapsidado por la proteína de la cápside del CCMV a un relación de 3:1 (CP:Péptido) para asegurarse del encapsulado completo del péptido tal como se describe en estudios previos con ssRNA (Cadena-Navaetal., 2011;

Annamalai y Rao, 2005). El autoensamble se lleva a cabo mediante la mezcla de CP y del péptido en buffer de proteína CP-CCMV (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1m MEDTA, 1m MDTT y PMSF 1 mM), seguido mediante diálisis en un buffer de ensamble de peptido (RAB: 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,2) durante la noche (12 horas) a 4 ° C, seguido por diálisis en buffer de virus (VB: acetato de sodio 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 4,8) durante 8 horas, todo a 4 ° C.

7.3 Caracterización de VLPs por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión.

Se verificara la integridad de las VLPs por medio de TEM. Alícuotas de 6µl de VLPs (0.1 µg/µl) se aplica a una rejilla de cobre (malla 400), que ha sido previamente recubierta con Parlodion y carbono. La muestra se deja sobre la rejilla durante 1 min, y se retira el exceso con papel de filtro Whatman #4, y después se tiñe con 6µl de acetato de uraniloal 1% por un 1 min. Se elimina el exceso de uranilo con el papel filtro. Las rejillas preparadas se mantienen y almacenan durante la noche en un desecador y se analizan con un microscopio electrónico de transmisión JEM1200-EX que funciona a 200 keV y equipado con una cámara digital. El análisis de las imágenes obtenidas por TEM será realizado usando el programa ImageJ.

7.4 Efecto antimicrobiano del DCD-1L.

Las bacterias (*E.faecalis* ATCC= 29212 y el aislado clínico) se crecieron en medio LB (Luria-Bertani), en tubos de ensayo de 10 ml durante 12 horas. El cultivo se llevo a una densidad óptica de 0.1 (A_{600}) con la finalidad de ajustar a 10^6 células por mililitro. Las bacterias se lavaron dos veces en buffer de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaHPO}_4$) mas 50mM de NaCl. Se realizaron cinéticas de concentraciones de toxicidad del péptido DCD-1L como de las VLPs-(DCD-1L) en cajas de 96 pozos. Las concentraciones se evaluaron de 10-100 µg/ml. El efecto antimicrobiano del

péptido se evaluó en cajas de Petri con agar LB al 15 % , con la finalidad de determinar su capacidad de formar colonias.

7.5 Análisis del efecto antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) por Microscopía Confocal.

Se tomaron 20 µl de los tratamientos realizados en las cinéticas de viabilidad de las placas de 96 pozos. La muestra se colocó en un porta objetos de vidrio al cual se le añadieron 20 µl del Fluoroforo FM4-64 el cual tiñe los lípidos de la membrana bacteriana. Las muestras se procesaron utilizando un microscopio Olympus FV1000, con el objetivo 60x y un láser de longitud de onda de 543 nm al 33% de intensidad. Las muestras fueron analizadas con el programa imagaJ.

7.6 Análisis del efecto antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Se tomaron 100 µl de los tratamientos realizados en las cinéticas de viabilidad de las placas de 96 pozos. La muestra se colocó en una membrana de nitrocelulosa Whatman de 0.45 µm y se dejó secar durante 40 min. Posteriormente la muestra se fijó con glutaraldehído al 2.5% durante 12 horas. La membrana se deshidrató utilizando acetona a diferentes concentraciones, desde 20%, 40%, 60%, 70%, 80%, 95% y 100%, durante 15 min cada condición. Las muestras se secaron durante 20 min a temperatura ambiente. Estos tratamientos se colocaron en una cinta de carbono para colocarles del baño de oro y proceder a procesar las muestras utilizando un microscopio JSM-5300 a 20kx. Las imágenes se analizaron utilizando el programa imageJ.

7.7 Ensayo de Sensidiscos.

Se tomó una muestra del cultivo inicial de *E. Faecalis* y del aislado clínico y se inoculó una placa de agar de LB al 15% en su totalidad. En discos de papel filtro Whatman se colocó una concentración de 10 µg del péptido DCD-1L y de las VLPs-(DCD-1L). Se tomó como control negativo el buffer de fosfatos y como

control positivo la ampicilina (1mg). Por ultimo se determino el diámetro del halo de inhibición de los sensibiliscos utilizando el programa imageJ.

7.8 Cultivo celular / Ensayos de biocompatibilidad de las VLPs-(DCD-1L) y del CaOH.

La línea celular Hela se mantienen en medio RPMI (Invitrogen). El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina y 50 µg de penicilina/estreptomicina. Todas las células se mantuvieron a 37° C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Estas células se retaron a la dosis letal media (10-100 µg) aplicada a las bacterias estudiadas y el CaOH a concentraciones muy bajas 10-500 µM .

7.9 Ensayos de integridad de las VLPs.

Se analizó la estabilidad de las VLPs al enfrentarla a factores externos, como es el caso de temperatura. Para analizar este parámetro se colocaron 5 µg las VLPs silvestres, purificadas de las plantas, en tubos eppendorf y se calentaron a 60 °C durante 60 y 120 minutos utilizando un baño maría. Posteriormente estas partículas se observaron en un gel de agarosa al 1% de buffer de virus, el cual se corrió en una cámara de electroforesis a 50 V durante 3 horas a 4 °C.

Otro parámetro que se midió fue la vibración ultrasónica, para ello se utilizó de igual forma 5 µg de las VLPs, las cuales fueron sometidas a 200 watts durante 3 ciclos de 30 segundos cada uno. Este prueba se realizo utilizando el equipo Vibra Cell (Sonic & Matirials). Su análisis posterior se llevo a cabo por microscopia electrónica de transmisión (TEM).

7.10 Tipo de Estudio

- Experimental

7.11 Criterios de inclusión:

- Bacterias patógenas involucradas en infecciones endodónticas,

- Péptidos con acción antimicrobiana de amplio espectro
- El uso de VLPs de gran estabilidad

7.12 Criterios de exclusión

- Bacterias no asociadas a procesos de infección endodóntico
- Péptidos con un alto potencial citotóxico
- VLPs de baja estabilidad

7.13 Criterios de eliminación

- Ensayos *in vivo*
- Estandarización de su uso en la fase clínica (vehículo mediante el cual se aplicara la terapia)

VII. RESULTADOS

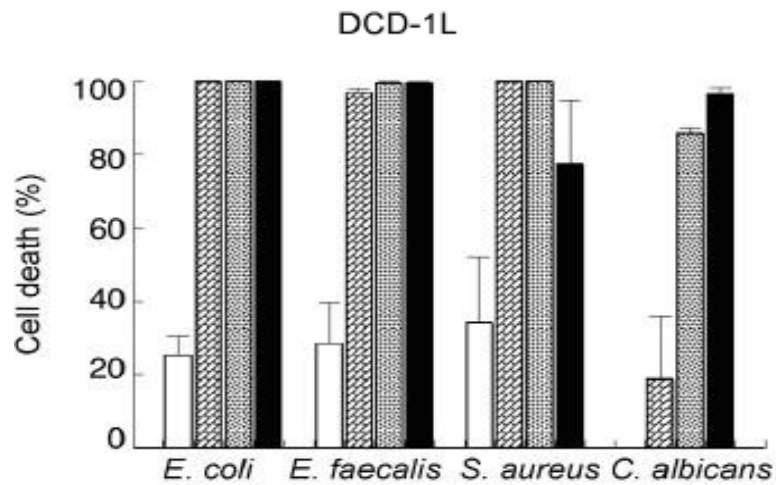
8.1 Determinar el efecto antimicrobiano del DCD-1L ante patógenos presentes en endodoncia.

Durante trabajos previos se ha demostrado la actividad de diversos AMPs contra una gran variedad de bacterias patógenas, de manera específica ya se ha elucidado la mínima concentración inhibitoria, 10-100 µg/ml, del DCD-1L contra patógenos como E. Coli, Enterococcus Faecalis, S. Aureus y Candida albicans, los cuales se encuentran presentes en infecciones endodónticas. En este estudio se crecieron las cepas a una densidad de 2×10^6 células/ml en tubos de ensayo y se adiciono la concentración mínima inhibitoria, incubándose por 18 horas a 37° C, (Fig. 5A). En todas las cepas probadas se encontró alrededor de 100% de mortalidad dato que solo se observa en un grupo limitado de AMPs. Conforme con estos resultados también se demostró cual es el mecanismo de acción que lleva a cabo el DCD-1L, utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM) se observo como los péptidos interactúan con la membrana permitiendo una desestabilización, lo que conlleva a una desintegración de la misma, (Fig. 5B).

Cabe mencionar que ya que este péptido es de origen humano, el cual se utiliza como parte de defensa del sistema inmune innato, se ha comprobado su alto grado de biocompatibilidad en ensayos *in-vitro*.

Por lo que estas características convierten a esta molécula en un posible candidato terapéutico para tratamientos endodónticos.

A)



B)

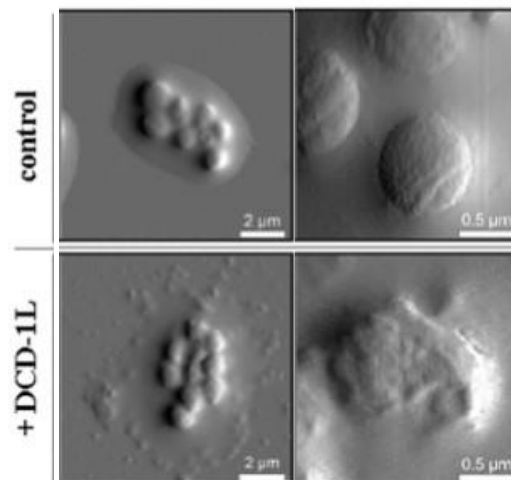


Figura 5. Potencial antimicrobiano del DCD-1L.

A. El DCD-1L fue probado ante *E.coli*, *E.faecalis*, *S.aureus*, *C.albicans* durante 4 horas a pH 7.4 a concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ (1 barra), 10 $\mu\text{g/ml}$ (2 barra), 50 $\mu\text{g/ml}$ (3 barra), 100 $\mu\text{g/ml}$ (4 barra). B. Imágenes de AFM de *S.aureus* tratadas con DCD-1L.

8.2 Diseñar y construir VLPs derivadas del CCMV que encapsiden al DCD-1L.

En la actualidad los virus son utilizados como nanocontenedores de materiales tales como fármacos, material genético, nanopartículas, enzimas, etc., con el fin de explorar su uso como vectores de transfección hacia células blanco para corregir alguna enfermedad. Por ello esta herramienta se ha convertido en uno de los principales temas de estudio en la biomedicina.

Como ya se ha mencionado uno de los principales inconvenientes del uso de los AMPs en la endodoncia es su tiempo de vida media, ya que estos son susceptibles a degradación por proteasas, por lo que la exposición de esta terapia en el conducto se ve limitada a una ventana de tiempo muy corta. En base a los antecedentes este estudio tiene como objetivo solucionar esta principal desventaja al encapsidar al DCD-1L utilizando al virus del CCMV, y así protegerlo de una posible degradación y a su vez aumentar su estabilidad.

Para lograr una correcta encapsidación se probaron diversas condiciones de ensamble, variando la relación entre la proteína de la cápside (CP) y la del péptido, esto con la finalidad de encontrar el parámetro idóneo que nos permitiera encapsidar de manera mas eficiente la mayor cantidad de péptido. Se realizaron ensayos de encapsidación en buffer de ensamble variando la concentración de proteína de la cápside y manteniendo constante la concentración del péptido, se utilizaron 10 µg del DCD-1L y 10, 30, 60, 90 µg de CP, obteniendo relaciones 1:1, 1:3, 1:6 y 1:9 de DCD-1L: CP. Cabe mencionar que se realizo un segundo muestreo, utilizando las mismas relaciones y concentraciones entre CP:DCD-1L de ensayo anterior, mas sin embargo en esta ocasión se vario la concentración del DCD-1L y se mantuvo constante la concentración de la CP.

Estos ensambles se realizaron utilizando membranas de diálisis montadas en tubos eppendorf en un volumen final de 50 µl de muestras y en un litro de buffer de ensamble, esto se monto en a 4° C en agitación constante durante un periodo

de 24 horas. Una vez ensambladas las cápsides se transfirieron las muestras a buffer de virus para acidificar las moléculas y estabilizarlas, esto se realizó de igual forma en un volumen de un litro de buffer de virus por 12 horas. Culminado este proceso se analizaron las diversas muestras por microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los resultados nos permitieron seleccionar la relación 1:3 (DCD-1L:CP) del resto, ya que se observó que bajo estas condiciones se logró una muy eficiente encapsidación de péptido (Fig.6). Como control negativo observamos que en las condiciones donde variábamos la concentración del DCD-1L y no de la CP, no se formaban estructuras delimitadas, se observaban malformaciones, aglomerados y cápsides abiertas, (Fig.7). Estos resultados demuestran que el virus del CCMV es capaz de encapsidar de manera eficiente al DCD-1L, y por su alto grado de eficiencia ya reportado del virus nos garantiza no encontrar cápsides vacías y el 100% del péptido encapsidado. Cabe mencionar que no existía reporte alguno de la encapsidación de estas moléculas en algún vector viral, por lo que este trabajo toma una relevancia sobresaliente al desarrollar un sistema que permita estabilizar y proteger una molécula de interés biológico.

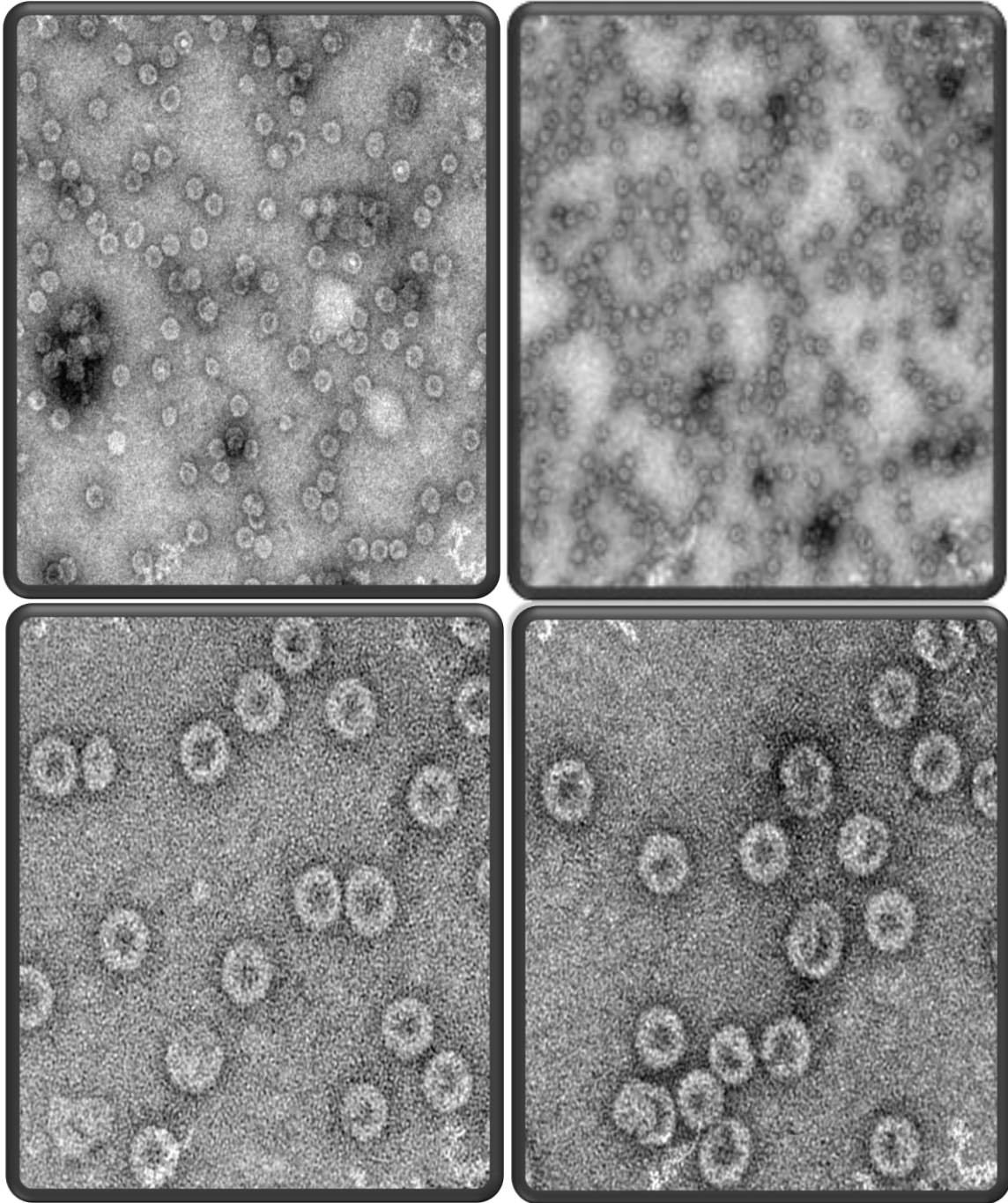


Figura 6. Imágenes de las VLPs-(DCD-1L).

Se utilizó la relación 3:1 de CP:DCD-1L para observar por microscopía electrónica de transmisión la eficiencia de encapsidación del péptido. Pudiendo observar el 100% de cápsides formadas lo que garantiza la totalidad de péptido encapsidado.

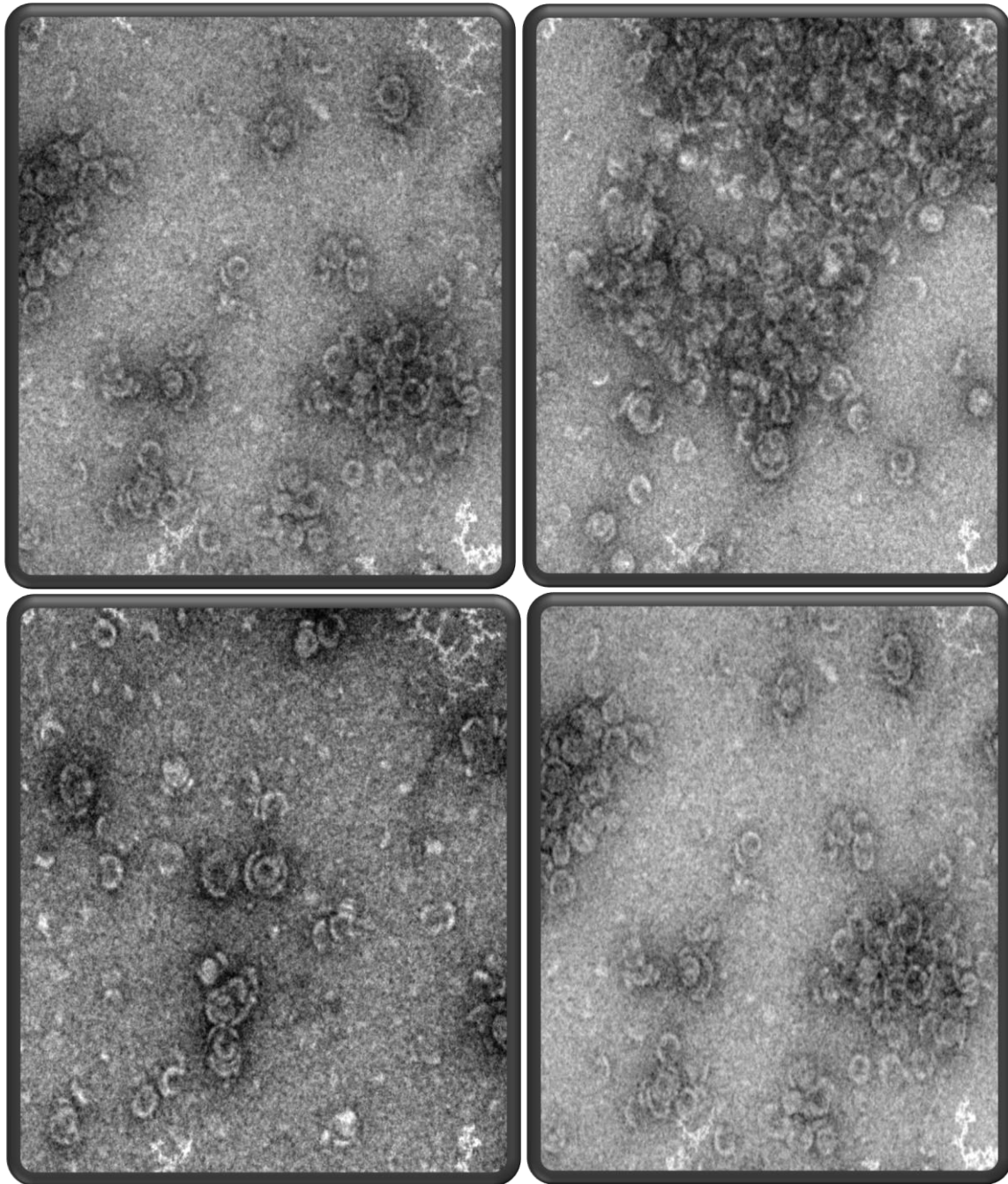


Figura 7. Formación de VLPs aberrantes.

Se realizaron ensayos como control negativo de encapsidación para garantizar que nuestros resultados fueran confiables. Utilizando la relación 1:3 de CP:DCD-1L observamos que la no se formaban estructuras bien delimitadas, si que encontrábamos cápsides abiertas malformaciones y aglomerados. Lo que refleja una baja eficiencia o casi nula de encapsidación de péptido.

8.3 Determinar la concentración mínima inhibitoria que se requiere de VLPs-DCD-1L para generar el efecto antimicrobiano.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la mas baja cantidad de algún agente antimicrobianos que se requiere para inhibir el crecimiento de un microorganismo. En este estudio se calculo la MIC de las VLPs-(DCD-1L) tomando como base las concentraciones ya reportadas del péptido (10-100 μg) que logran eliminar el 100% de las bacterias monitoreadas.

Para realizar los ensayos que sustenten nuestro objetivo se realizaron ensayos de encapsidación a mayor escala, en bolsas de diálisis en un volumen final de 2 ml, utilizando 250 μg del DCD-1L y 750 μg de CP. Culminado este proceso, el volumen final recuperado se correlaciono con la concentración inicial de péptido utilizado, obteniendo una concentración de 10 μg de VLPs-(DCD-1L) por cada 94 μl . Una vez fabricadas las VLPs se realizaron ensayos de toxicidad en placas de 96 pozos, en los cuales se inocularon 50×10^4 células/ml de *Enterococcus faecalis* y se expusieron a las VLPs-(DCD-1L) por 18 horas a 37°C . Se utilizo una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de VLPs-(DCD-1L), realizando 10 replicas (200 μl / pozos) por condición, dentro de las cuales incluimos al antibiótico ampicilina (200 $\mu\text{g/ml}$) como control de mortalidad, al péptido DCD-1L desnudo y el buffer de ensamble mas 100 mM de NaCl, como control negativo (Fig.8). Cabe mencionar que se utilizo 100 mM de NaCl ya que como se ha mencionado anteriormente en estas concentraciones de iones divalente el DCD-1L tiende a formar una estructura de oligomero y permite el anclaje de los péptidos en la membrana, formando un canal ionico que conlleva a la disrupción de la membrana. Por lo tanto bajo estas condiciones de sales el péptido aumenta su espectro de actividad antimicrobiana.

Para probar que efectivamente el tratamiento con VLPs-(DCD-1L) tenia el mismo efecto que el péptido desnudo, y argumentar que la encapsidación de estas moléculas no compromete la actividad antimicrobiana del DCD-1L, se tomaron 50

μ l de las diferentes condiciones realizadas en las placas de 96 pozos y se evaluó su crecimiento en medio LB sólido en cajas Petri, (Fig. suplementarias). Estas placas se incubaron a 37° C durante 12 horas. A su vez de manera aleatoria, de las placas de 96 pozos, se analizó por medio de microscopia, tanto confocal como electrónica de barrido (SEM), si las bacterias sufrían algún cambio en su morfología o si se presentaba una disrupción de la membrana celular, como ya se demostraba en reportes previos utilizando al péptido desnudo.

Conforme a lo esperado observamos que los tratamientos con las VLPs-(DCD-1L) no hubo crecimiento celular en las placas de Petri, mismo resultado obtenido con el péptido desnudo y la ampicilina (Fig.8), lo que nos representaba un resultado exitoso y prometedor. Datos que se confirmaron en los estudios por microscopia, ya que se observó un evidente cambio en la morfología de las células e inclusive por SEM se logró apreciar como la membrana celular se encuentra desintegrada (Fig.9). También se realizó un video, utilizando el microscopio confocal, para evaluar in vivo y en tiempo real como es que las VLPs-(DCD-1L) llevaban a cabo su efecto antimicrobiano. Estas imágenes evidenciaron como es que las bacterias se vuelven estáticas y se observan en aglomeraciones con cambios morfológicos evidentes (Fig. 10).

Para sustentar a un más estos resultados se realizaron pruebas de sensibilidad para evaluar la capacidad de las VLPs-(DCD-1L) de formar halos de inhibición y compararlo su efecto con el de antibióticos ya reportados (Fig.11A). De manera sorprendente bajo la misma concentración de VLPs-(DCD-1L), 10 μ g, que de ampicilina se observa claramente que las VLPs-(DCD-1L) presentan un halo de inhibición mayor que la del antibiótico, e inclusive mayor que el del péptido desnudo, (Fig.11B).

En base a todos estos resultados podemos argumentar que el encapsular al DCD-1L no afecta su actividad antimicrobiana, ya que las VLPs-(DCD-1L) presentan el mismo, o tal vez mayor, efecto citotóxico que el del péptido desnudo.

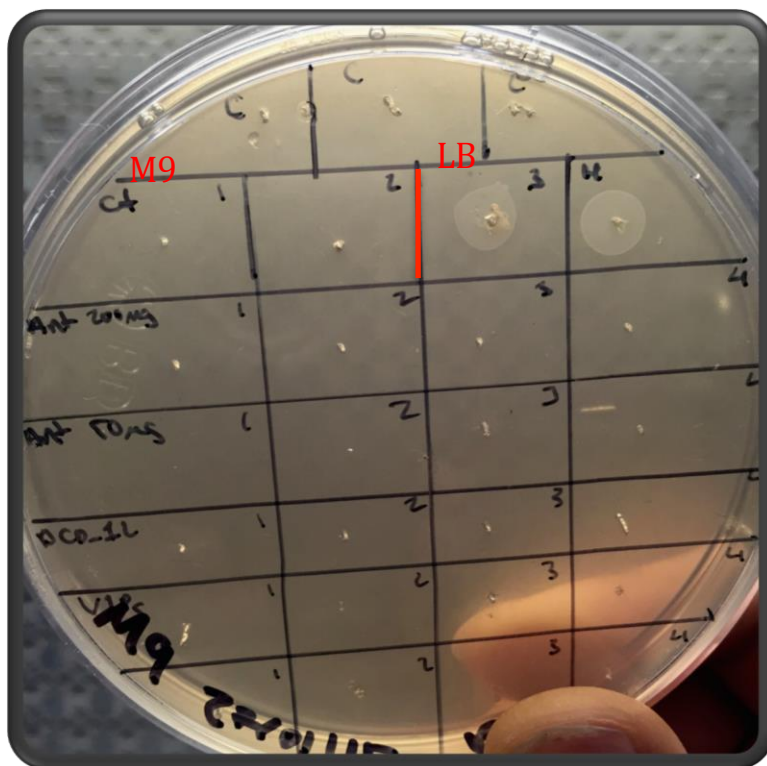


Figura 8. Efecto antibacteriano de las VLPs-(DCD-1L).

Se inoculó un cultivo de *E. feacalis* y se incubó durante 18 horas con las VLPs-(DCD-1L), DCD-1L y ampicilina, para evaluar su potencial de crecer en medio LB al 15% de agar.

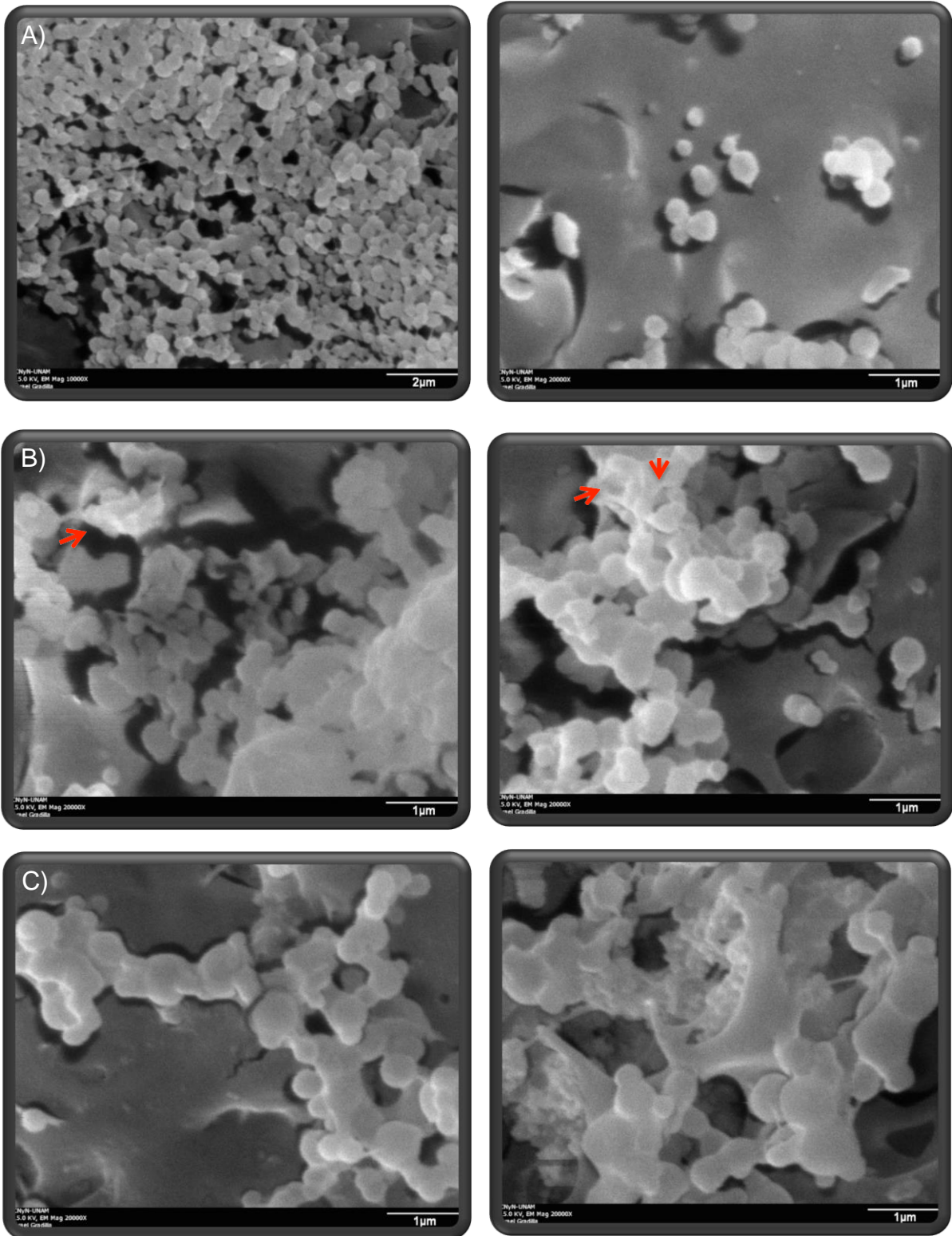


Figura 9. Análisis del daño a la membrana celular ocasionado por las VLPs-(DCD-1L).

De las cinéticas de citotoxicidad en la caja de 96 pozos , se tomaron 50 µl para procesarlos y evaluar el efecto de los tratamientos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A. Se tomó como control el E.faecalis en presencia de la solución buffer. B. Se evaluó el potencial del DCD-1L libre, sin encapsidar. C. Se aplicó la misma concentración de VLPs-(DCD-1L), 50 µg/ml, para contrarrestar su efecto con los tratamientos anteriores.

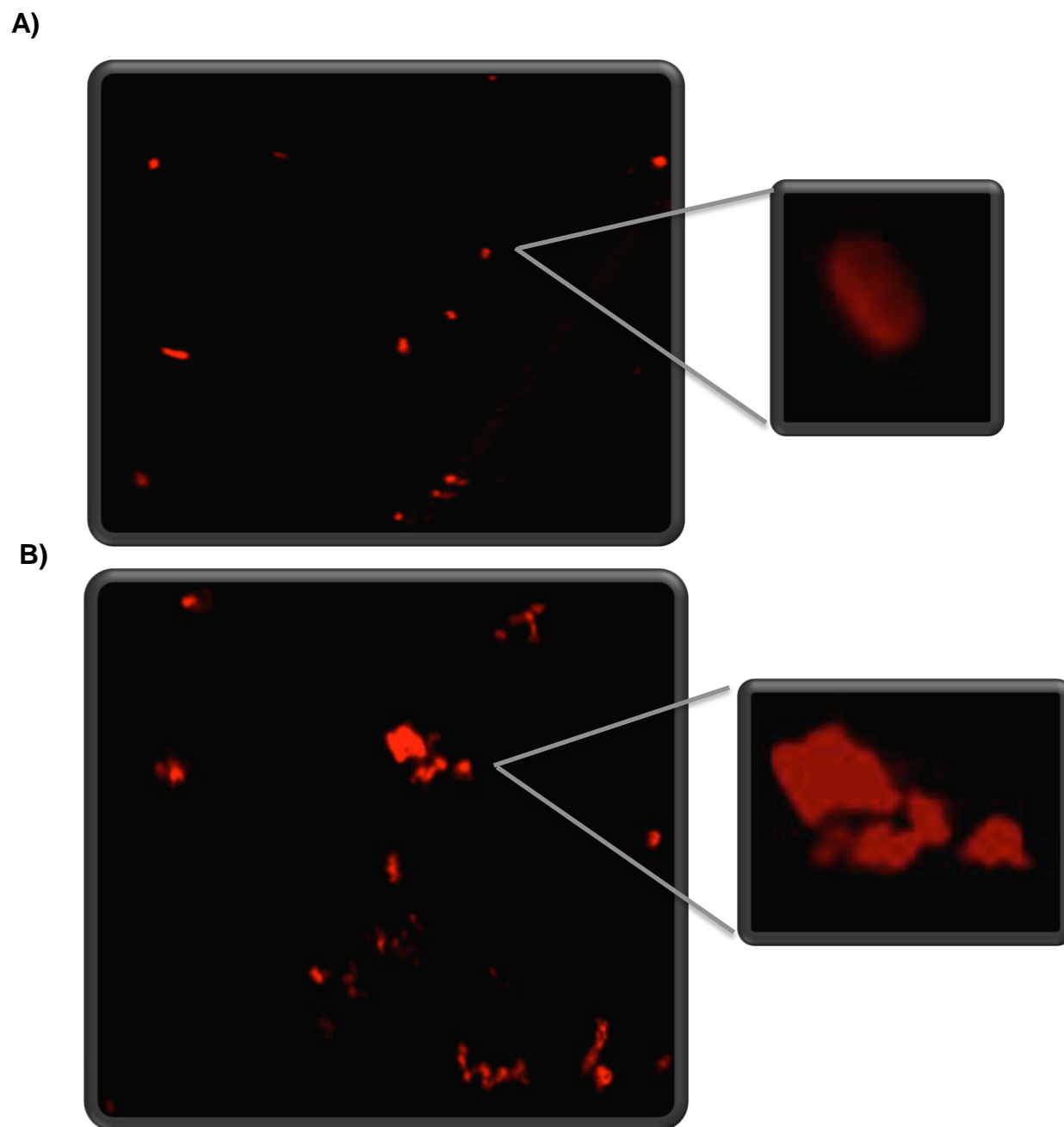
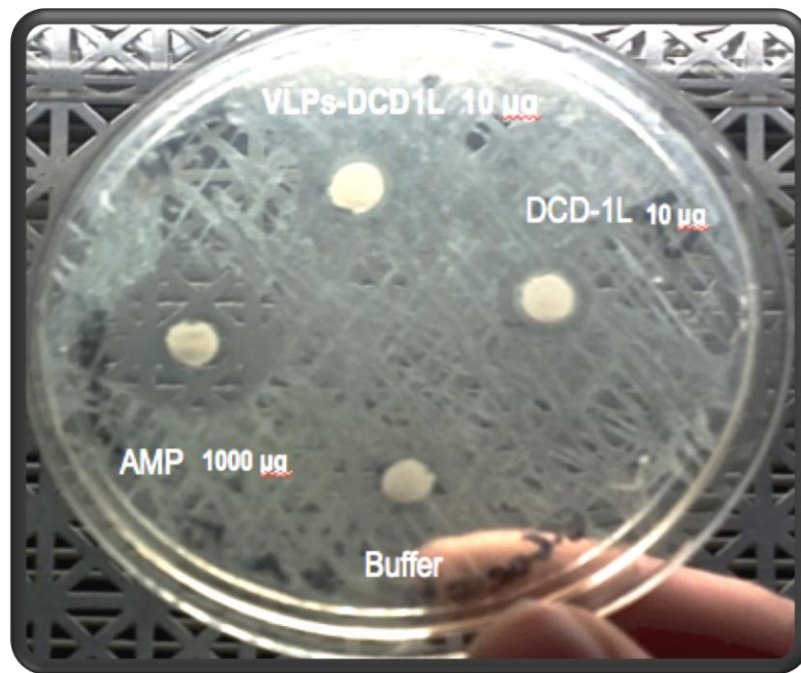


Figura 10. Efecto de las VLPs-(DCD-1L) sobre la morfología de E.faecalis.

Se evaluó la capacidad de las VLPs-(DCD-1L) de generar daño en la membrana y un cambio en la morfología celular. Esto utilizando el fluoróforo FM4-64, el cual reconoce los lípidos de la membrana celular. A. Control del cultivo de E.faecalis en presencia de la solución buffer. B. Se incubó el cultivo en presencia de 50 µg/ml de VLPs-(DCD-1L).

A)



B)

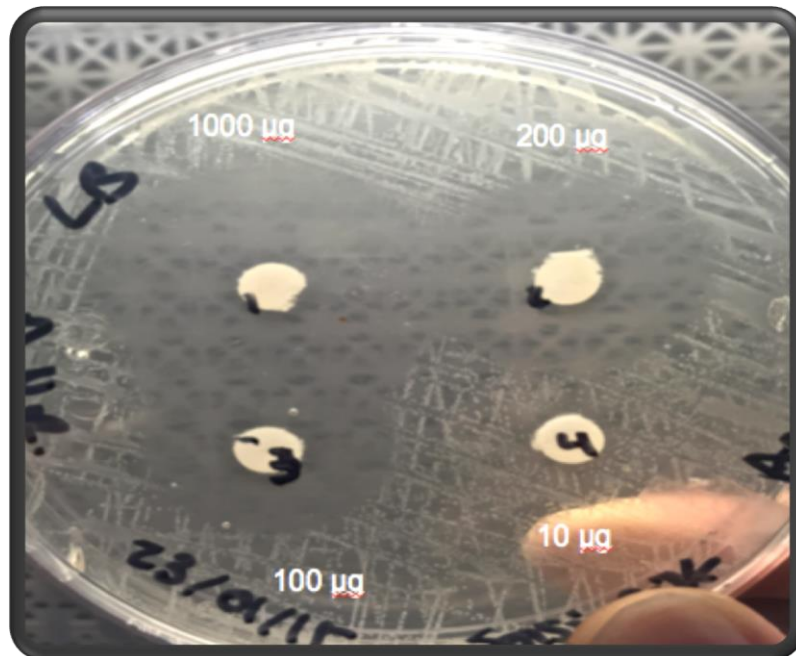


Figura 11. Ensayos de sensidisco de las VLPs-(DCD-1L).

Se utilizaron discos de papel filtro Whatman para aplicar el tratamiento correspondiente y evaluar la capacidad de formar halos de inhibición en los cultivos de *E. faecalis*. A. En placas de medio LB al 15% se analizaron diferentes condiciones tratamientos (Buffer, Ampicilina, DCD-1L, VLPs-(DCD-1L). B. Se analizo diferentes concentraciones de ampicilina para contrarrestar el tamaño del halo de inhibición conforme a la concentración utilizada, con respecto al efecto observado con las VLPs-(DCD-1L).

8.4 Determinar que las VPLs-DCD-1L no generan ningún efecto citotóxico en células de origen humano.

En base a que se conoce las limitaciones de biocompatibilidad de los actuales tratamientos que se utilizan en endodoncia como medicamentos intraconducto, se realizaron ensayos de toxicidad en células de origen humano para evaluar si las VLPs-(DCD-1L) presentaban alguna complicación.

Tomando como referencia al CaOH, el principal tratamiento actualmente utilizado como medicamento intraconducto, se comparo el daño efectuado a la línea celular HELA, la cual proviene de células de cáncer de cérvix. En base a que se conoce que el CaOH es altamente abrasivo y presenta una biocompatibilidad nula, se utilizaron bajas concentraciones de este, (Fig.12C,D,E) Conforme con los ensayos realizados anteriormente se utilizo la misma concentración de VLPs-(DCD-1L) y se observo que no se generaba ningún efecto citotóxico (Fig.12B), las células presentaban la misma morfología que en el control, sin tratamiento, contrarrestando con lo observado con el CaOH en donde se aprecia como las células se desintegraron en su mayoría por el efecto su alto grado de alcalinidad.

Estos resultados sustentan el hecho de que el DCD-1L es de origen humano, por lo que presenta un alto grado de compatibilidad y un efecto nulo de citotoxicidad. Aunado a esto existen reportes del potencial del DCD-1L para estimular la sobrevivencia celular, por lo que podría resultar un beneficio agregado, el promover la regeneración tisular.

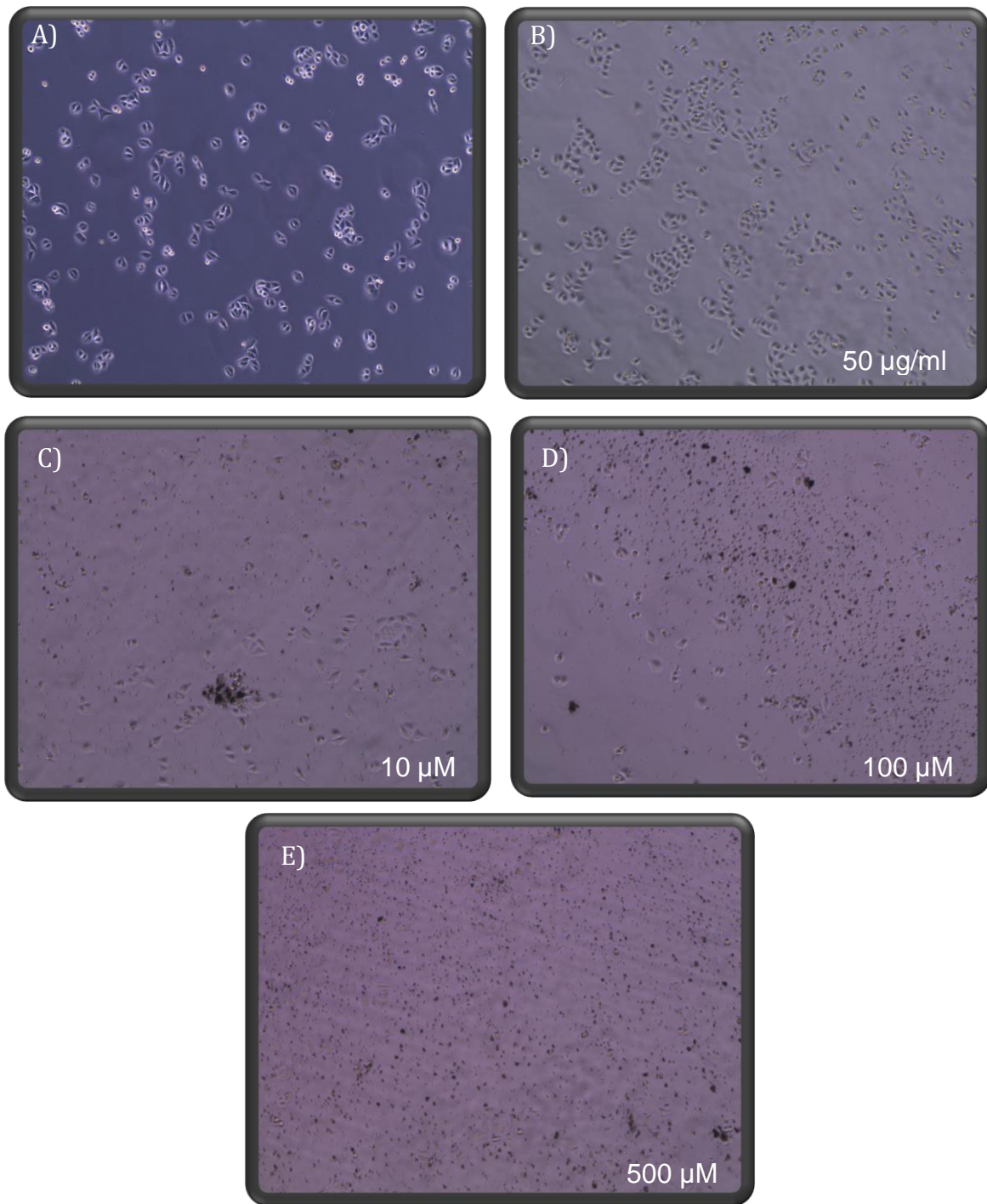


Figura 12. Ensayo de biocompatibilidad de las VLPs-(DCD-1L).

Se evaluó el efecto citotóxico de las VLPs-(DCD-1L) utilizando la línea celular HeLa, y se contrarrestó con la toxicidad del Ca(OH)₂. A. Como control se utilizó la solución buffer. B. Se agregaron 50 µg de las VLPs-(DCD-1L). Se utilizó el Ca(OH)₂ a diferentes concentraciones que van desde 10 µM (C), 100 µM (D) y 500 µM (E).

8.5 Determinar la integridad de las VPLs-DCD-1L ante vibración ultrasónica pasiva.

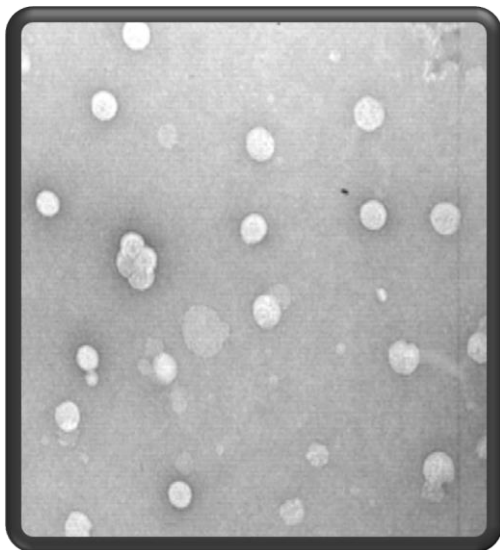
Uno de los protocolos empleados en la terapia endodóntica para distribuir a lo largo del conducto los diferentes agentes irrigantes es la vibración ultrasónica pasiva. Por lo que, este procedimiento podría comprometer la difusión, integridad y el potencial antimicrobiano de las VLPs, y por lo tanto afectar el potencial uso de esta terapia en endodoncia.

Para evaluar este parámetro las partículas fueron sometidas a una alta fuerza de vibración ultrasónica de 200 watts durante 3 periodos de 30 segundos y no se observó ningún disturbio o desintegración de la membrana de la cápside y por ende tampoco del péptido (Fig.13A) Cabe mencionar que los equipos convencionales utilizados en endodoncia solo aplican una fuerza menor a los 10 watts.

Otra condición adversa que se podrían enfrentar las VLPs en su uso en tratamientos endodónticos es la temperatura, ya que muchos materiales selladores utilizados requieren de temperaturas elevadas e inclusive el uso de algunos agentes químicos en el conducto varían la temperatura de este. Por lo que de igual forma se sometieron a las VLPs a una temperatura de 60 °C durante 60 y 120 minutos. Su integridad se observó mediante geles de agarosa 1 % en buffer de virus, y no se observó que la muestra se perdiera durante los primeros 60 minutos mas sin embargo 120 minutos las VLPs ya se habían desintegrado (Fig. 13B) Cabe mencionar que ningún protocolo en tratamientos endodónticos implica someter al conducto a temperaturas elevadas por un periodo de 2 horas.

En base a los antecedentes ya mencionados y a estos resultados obtenidos, el virus de CCMV es muy estable bajo diversas condiciones adversas como: temperatura, concentración de sales, pH, solventes, etc. Evaluando estos resultados podemos argumentar que las VLPs diseñadas no sufrieron ningún daño estructural, por lo que resultan idóneas para implementarse en tratamientos endodónticos.

A)



B)

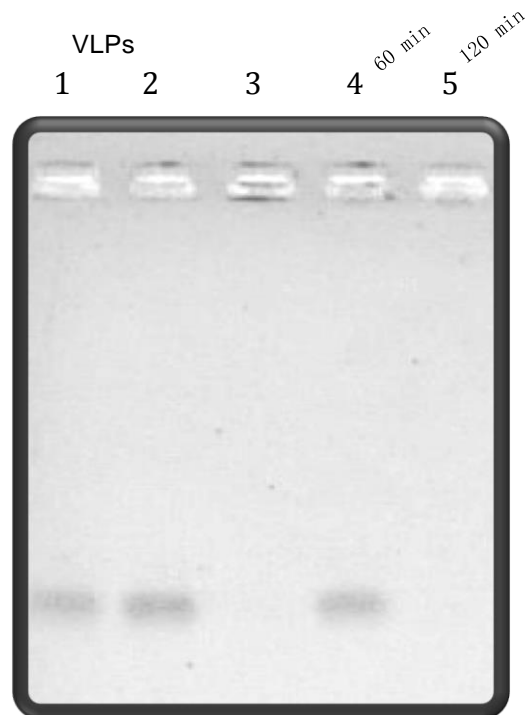


Figura 13. Estabilidad de las VLPs.

Para medir la estabilidad de estas partículas se sometieron a vibración ultrasónica y a temperaturas altas. A. Micrografía electrónica de las VLPs que se les aplicó vibración ultrasónica, a 200 watts. B. Gel de agarosa al 1% donde se analizó la estabilidad de las VLPs al calentarlas a 60 °C. Carril 1: Muestra sin calentar a los 60 minutos, carril 2: Muestra sin calentar a los 120 minutos, carril 4: Muestra calentada por 60 minutos, carril 5: Muestra calentada por 120 minutos.

VIII.DISCUSIÓN

El tratamiento endodóntico se basa en erradicar la invasión bacteriana presente en los conductos radiculares y para lograr este objetivo se han empleado el uso de medicamentos para disminuir esta carga bacteriana, sin embargo algunos de ellos se consideran altamente tóxicos y carcinógenos y por ellos se han descartado en la práctica endodóntica⁹². Se han realizado evaluaciones in-vitro donde se ha probado el potencial de los AMPs ante patógenos endodónticos, y además se ha comprobado su alta biocompatibilidad⁵⁹. Por lo que los AMPs podrían ser la mejor

alternativa como medicamento intraconducto. Sin embargo, el principal inconveniente de estas moléculas es su corto tiempo de acción, ya que son susceptibles a degradación proteolítica.

El enfoque primordial de este estudio radica en lograr la encapsidación del DCD-1L, péptido de amplio espectro antibacteriano y antifúngico, con el virus del CCMV para así lograr aumentar su tiempo de vida media en el conducto, evitando su degradación. Cabe mencionar que no existe reporte alguno de la encapsidación de AMPs en algún vector viral, por lo que el trabajo toma una relevancia significativa.

En base a los resultados obtenidos al encapsidar el DCD-1L, podemos argumentar que el potencial antimicrobiano del péptido no se ve afectado. Sin embargo, en los ensayos de sensidisco podemos observar que las VLPs-(DCD-1L) presentaron un mayor halo de inhibición que al utilizar el péptido desnudo, lo que podría deberse a que las VLPs permiten una liberación del DCD-1L de manera desfasada, ya que en distintos estudios han demostrado que el CCMV libera el 50% de su carga de manera inicial y posteriormente se disocia el resto. Esto podría permitir que los péptidos se distribuyan de manera uniforme en la membrana celular, en una mayor cantidad de bacterias, y no solo se acoplen de forma abundante en un número limitado de bacterias. Aunado a esto las VLPs-(DCD-1L) presentaron un alto grado de biocompatibilidad con respecto al Ca(OH)_2 .

Cabe destacar el potencial del virus del CCMV como nanocontenedor de AMPs, ya que después de someterlo a vibración ultrasónica y calentarlo a $60\text{ }^\circ\text{C}$, conservo su estabilidad. Sin tomar en cuenta que estudios previos demuestran que este virus es resistente a una gran cantidad de agentes químicos, concentraciones de sal elevadas, condiciones de pH adversas, etc.

Basándonos en toda esta información expuesta podríamos proponer a las VLPs-(DCD-1L), y en general a las VLPs-(AMPs), como una potencial medicamento intraconducto, ya que podría sustituir a cualquiera de los medicamentos actualmente utilizados en procesos de desinfección endodóntica.

IX.CONCLUSIONES.

1. Se comprobó potencial antimicrobiano del DCD-1L ante patógenos presentes en infecciones endodónticas.
2. Las VLPs derivadas del CCMV fueron capaces de encapsidar de manera eficiente al DCD-1L.
3. El potencial antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) fue semejante a la actividad del péptido libre.
4. La biocompatibilidad de las VLPs-(DCD-1L) fue idónea, no se observó ningún efecto citotóxico. Mientras que el uso de Ca(OH)_2 desintegro todo el cultivo celular.
5. Se comprobó la estabilidad de las VLPs-(DCD-1L) ante vibración ultrasónica y altas temperaturas.

X. PERSPECTIVAS

1. Analizar el potencial, *in-vitro*, de las VLPs-(DCD-1L) contra la totalidad de los patógenos presentes en endodoncia, esto tanto en biofilm como en suspensión. Y así poder estandarizar una dosis letal media universal.
2. Encapsidar un mayor numero de AMPs, que contengan un potencial antimicrobiano mayor o de igual actividad.
3. Medir el potencial de regeneración tisular que promuevan las VLPs-(AMPs).
4. Evaluar el potenciar de las VLPs-(AMPs) en ensayos *in-vivo*, en pacientes que presenten un cuadro de necrosis pulpar crónica. Con la finalidad de utilizar un cocktail de diferentes AMPs en un mismo tratamiento.
5. Analizar la posible aplicación de esta terapia biotecnológica en otra áreas de la odontología.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Deivanayagam Kandaswamy and Nagendrababu Venkateshbabu. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010 Oct-Dec; 13(4): 256–264.
2. Claudio Poggio et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite-based irrigating solutions. *Int J Artif Organs* 2010; 33 (9): 654-659
3. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral. Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 1965; 20, 340–349.
4. Nair PNR, Sjogren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long term light and electron microscope follow-up study. *J Endod* 1990; 16, 580–588.
5. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing. *International Endodontic Journal* 1991; 24, 119–125.
6. Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *International Endodontic Journal* 2006; 39, 343–56.
7. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 1998 ;85, 86–93. Michael M. Hoen, and Frank E. Pink.
8. Michael M. Hoen and Frank E. Pink. Contemporary Endodontic Retreatments: An Analysis based on Clinical Treatment Findings. *J Endod*. 2002; 28 (12): 834-836
9. Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries associated microorganism in vitro. *Peptides* 2010; 31, 2003–2008.
10. Domenico Ricucci and José F. Siqueira, Jr. Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings. *J Endod* 2010;36:1277–1288

11. V Liu, et al. Antibacterial efficacy of casein-derived peptides against *Enterococcus faecalis*. *Australian Dental Journal* 2012; 57: 339–343
12. Jin-Kyung Lee, et al. Antibacterial Efficacy of a Human α -Defensin-3 Peptide on Multispecies Biofilms *J Endod* 2013; 39:1625–1629
13. Winfred SB, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent* 2014;8:254-60.
14. March PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent.Clin.N. Am* 1999; 43:599-614. Costerton JW, Cheng G, Gersey TI, Ladd JG, Nickel M. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu.Rev.Microbiol* 1987; 41:435-64.
15. Costerton JW, et al. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994;176: 2137-42. ,
16. Costerton JW, et al Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45. ,
17. Costerton JW, et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
18. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001;9:50-2.
19. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 2009;35:493-502.
20. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:870-8.
21. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004;9:27-36.
22. de Paz LC. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33:652-62.
23. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006;32:434-7.
24. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J*

- Endod 2006;32:312-8.
25. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996;44:79-87.
 26. Bender IB, Seltzer S, Turkenkopf S. To culture or not to culture *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1964;18, 527–540.
 27. Sundqvist GK Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* 1992; 7, 257–262.
 28. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306
 29. Love RM. Microbiology of caries and dentinal tubule infection. In: Fouad AF, ed.
 30. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231-52.
 31. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.
 32. Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006;39:343-56.
 33. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.
 34. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.
 35. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.
 36. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left

- in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995;28:95-9.
37. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988;14:125-7.
 38. De la Casa ML, López ME, Raiden G. Acción solvente de soluciones de irrigación endodóncica. *Endodoncia* 2006;24:214-8.
 39. Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Orstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod* 2009;35:46-9.
 40. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod.* 2001; 27(12):765-7.
 41. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod.* 2002; 28(3):163-7.
 42. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as and intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003; 29(5):338-9.
 43. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza- Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003; 36(9):604-9.
 44. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003; 29(9):562-4.
 45. Lin S, Zuckerman O, Weiss EI, Mazor Y, Fuss Z. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod.* 2003; 29(6):416-8.
 46. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root

- canal: in vivo study. J Endod 2004; 30(2):84-7.
47. Walton RE, Holton IF Jr, Michelich R. Calcium hydroxide as an intracanal medication: effect on posttreatment pain. J Endod. 2003; 29(10):627-9.
 48. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int Endod J. 1999; 32(4):257-82.
 49. Roach RP, Hatton JF, Gillespie MJ. Prevention of the ingress of a known virulent bacterium into the root canal system by intracanal medications. J Endod. 2001; 27(11):657-60.
 50. Beltes PG, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kortsaris AH. In vitro release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. J Endod. 1997; 23(7):413-5.
 51. Solak H, Oztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. J Oral Rehabil. 2003; 30(4):436-9.
 52. Wadachi R, Araki K, Suda H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. J Endod. 1998; 24(5):326-30.
 53. Safavi K, Nakayama TA. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. J Endod. 2000; 26(11):649-51.
 54. Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Lili Luschke Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. J Endod. 2001; 27(12):720-3.
 55. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. J Endod. 2002; 28(2):94-8.
 56. Torres CP, Apicella MJ, Yancich PP, Parker MH. Intracanal placement of calcium hydroxide: a comparison of techniques, Revisited. J Endod. 2004; 30(4):225-7.
 57. Staehle HJ, Thomä C, Müller HP. Comparative in vitro investigation of different methods for temporary root canal filling with aqueous suspensions of calcium hydroxide. Endod Dent Traumatol. 1997; 13(3):106-12.
 58. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod. 1993; 19(6):302-6.

59. Sofi Beaula Winfred, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent*, 2014;2:2.
60. Batoni G, et al. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: Advantages and limits. *Curr Med Chem* 2011;18:256-79. Tao R, Tong Z, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides* 2011;32:1748-54.
61. Hancock, R. E., and Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8, 402–410. doi: 10.1016
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511 .
62. Lai, Y., and Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131–141.
- Nakatsuji, T., and Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol.* 132, 887–895
63. Vizioli, J., and Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 494–496 Brogden, K. A.
64. Bechinger, B., Zasloff, M., and Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 2, 2077–2084
65. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250
66. Mehra, T., Koberle, M., Braunsdorf, C., Mailander-Sanchez, D., Borelli, C., and Schaller, M. (2012). Alternative approaches to antifungal therapies. *Exp. Dermatol.* 21, 778–782.
67. Harris, F., Dennison, S. R., and Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 585–606.
68. Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J., and Hancock, R. E.. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086–2092.
69. Dathe M., Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. 1999. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462 71–8710

70. Matsuzaki K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462 1–1010.1016/S0005-2736(99)00197-2.
71. Lohner K. (2009). New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* 28 105 11610.4149/gpb_2009_02_105.
72. Yeaman M. R., Yount N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 27–5510.1124/pr.55.1.2.
73. Matsuzaki K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1788 1687–169210.1016/j.bbamem.2008.09.013.
74. Castanho M. A. (2012). The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. Bacteria. *Front. Immunol.* 3:236.10.3389/fimmu.2012.00236
75. Schitteck B, Paulmann M, Senyurek I, Steffen H: The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets* 2008; 8: 135–143.
76. Paulmann Maren, et al. Structure-Activity Analysis of the Dermcidin-derived Peptide DCD-1L, an Anionic Antimicrobial Peptide Present in Human Sweat. 2012, *J. Biol. Chem.* 287, NO. 11, pp. 8434–8443
77. Schitteck B, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2001; 2: 1133–1137.
78. Lai, Y. P., Peng, Y. F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L. F. and Wu, Z. R. (2005) Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 243-250 .
79. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL: Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1090–1095.
80. Park JH, Park GT, Cho IH, Sim SM, Yang JM, Lee DY: An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat. *Exp Dermatol* 2011; 20: 369–371.

81. Lucia Becucci et al. Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: influence of lipid charge, pH and Zn²⁺ on its interaction with a biomimetic membrane. *Soft Matter*, 2014, 10, 616–626.
82. Bancroft JB., Hiebert E., Bracker CE. 1969. The effect of various poly-anions on shell formation of some spherical viruses. *Virology* 39: 924-930.
83. Bancroft JB., Hiebert E. 1967. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acids isolated from small spherical virus. *Virology* 32: 354-356.
84. Hansen RM., Libnoch JA. 1978. Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch Intern Med.* 138: 1137-1138.
85. Pack GT. 1950. Note of the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *Arch Dermatol Syph.* 62: 694-695.
86. Bancroft, J. B., Hiebert, E., Rees, M. W., and Markham, R., 1968, Properties of cowpea chlorotic mottle virus, its protein and nucleic acid, *Virology* 34:224-239.
87. Destito, G., Yeh, R., Rae, C.S., Finn, M.G., Manchester, M., 2007. Folic acid mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells. *Chem. Biol.* 14, 1152–1162
88. Gonzales, M.J., Plummer, E.M., Rae, C.S., Manchester, M.J., 2009. Interaction of Cowpea Mosaic Virus (CPMV) nanoparticles with antigen presenting cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 4, e7981.
89. Yildiz, I., Shukla, S., Steinmetz, N.F., 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 901–908.
90. Steinmetz, N.F. 2010. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomed.* 6:634–641.
91. Wu Z., Chen K., Yildiz I., Dirksen A., Fischer R., Dawson P.E., Steinmetz N.F., 2012. Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. *Nanoscale.* 4: 3567–3576.

XIII APÉNDICE

Soluciones y Buffers

Las soluciones y buffers utilizados en los experimentos se muestran a continuación:

Buffer de inoculación de virus.

0.01 M de fosfato de sodio,
0.01 M de cloruro de magnesio, pH = 6.

Buffer de extracción de virus.

0.5 M acetato de sodio,
0.08 M acetato de magnesio, pH de 4.5.

Buffer de virus de suspensión.

50 mM de acetato de sodio,
8 mM de acetato de magnesio, pH de 4.5.

Solución de sacarosa al 25 %.

Se utiliza para los gradientes de sacarosa.
125 g de sacarosa
500 ml de buffer de virus de suspensión.

Buffer de desensamble de CCMV.

500 mM de cloruro de calcio (CaCl_2),
50 mM de Tris-HCl, pH = 7.5,
1 mM de EDTA,
1 mM de DTT,
0.50 mM de PMSF.

Buffer de proteína.

1 M de cloruro de sodio (NaCl),
20 mM Tris-HCl pH = 7.5,
1 mM de EDTA,
1 mM de DTT,
1mM PMSF.

Buffer de ensamble de VLPs.

50 mM de cloruro de sodio,
50 mM de Tris-HCl, pH = 7.2,
10 mM de cloruro de potasio,
5 mM de cloruro de magnesio,
1 mM de DTT, 0.5 mM de PMSF

Buffer de Electroforesis de Virus y VLPs.

0.1 M sodium Acetato de sodio pH 6,
1 mM EDTA

Buffer TE.

10 mM Tris-HCl, pH de 7.2 y
1 mM EDTA.

Solución PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonyl).

inhibidor de proteasas.
0.67 M PMSF diluido con isopropanol.

Solución DTT (Ditiotreitol).

Agente reductor de los enlaces disulfuro de las proteínas (S-S) a grupos sulfhidrilo (SH). Permiten desplegar completamente una proteína, además sirve como conservador.
0.19 M DTT en isopropanol.

EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético).

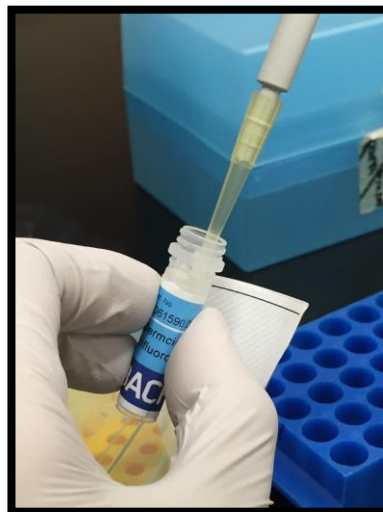
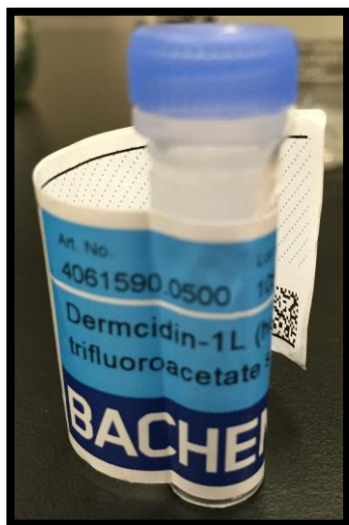
Agente quelante de iones metálicos como Ca^{2+} y Mg^{2+} .
0.45 M EDTA, pH 8.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB). Es un medio de cultivo líquido que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Disolver 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en un litro de agua desionizada y autoclaveada.

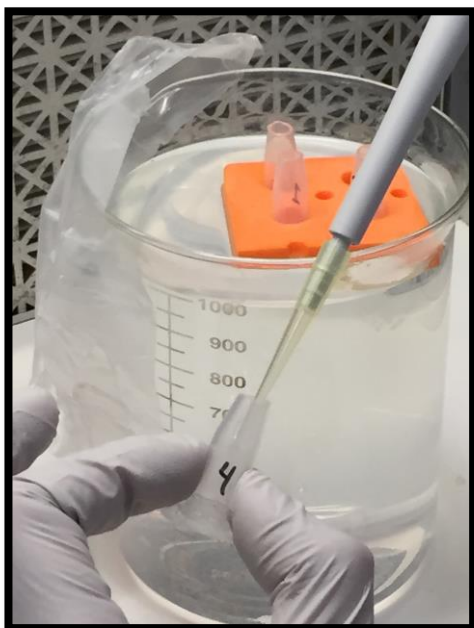
Para preparar medio LB solido, agar incorporar 15 g de agar por litro de medio LB antes de autoclavar.

XIV. ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS- Síntesis de VLPs-(DCD-1L)



Dermcidin-1L, Trifluoroacetate salt- 0.5 mg (human)

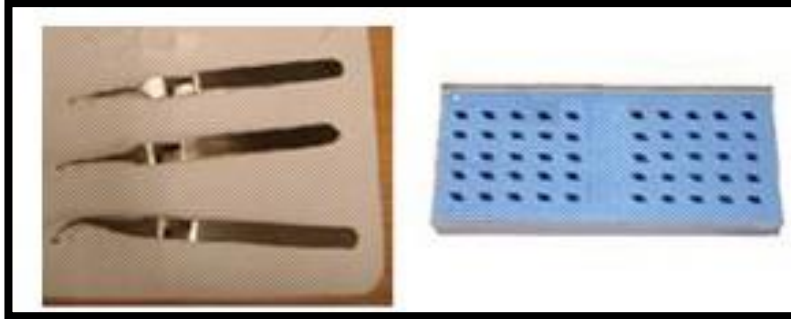


Autoensamble P-CCMV



Diálisis en Buffer de Ensamble

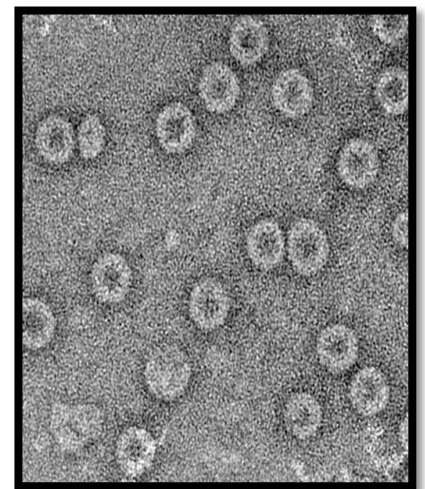
Caracterización de VLPs por medio de microscopia electrónica de transmisión.



Rejilla de cobre (malla 400)

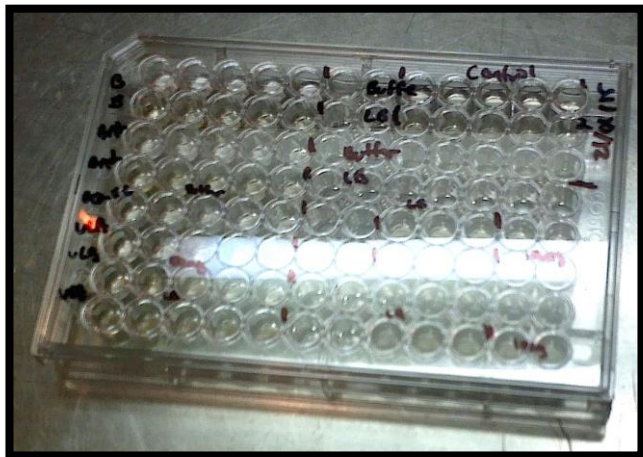


Microscopio Electrónico de Transmisión- JEM1200-EX



Relación 1:3 (DCD-1L:CP)

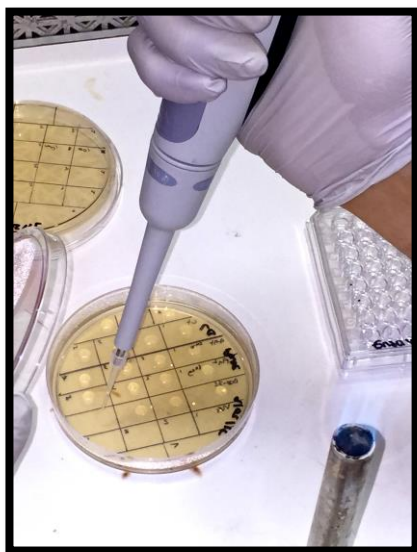
Efecto antimicrobiano del DCD-1L.



Caja de 96 pozos



Densidad óptica de 0.1 con la finalidad de ajustar a 10^6 células por mililitro



Cajas de Petri con agar LB al 15 %



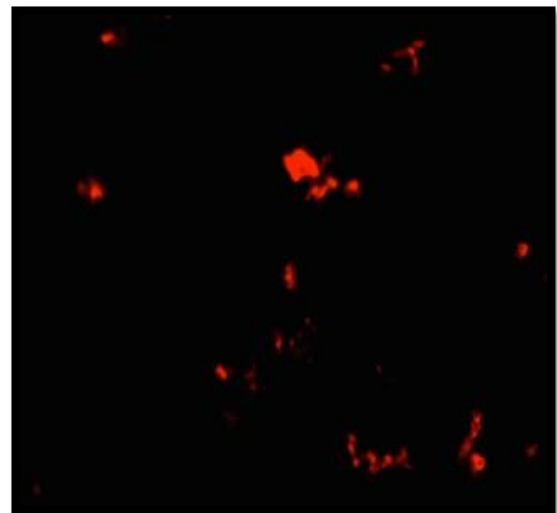


Incubadora

Análisis del efecto antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) por microscopía confocal.

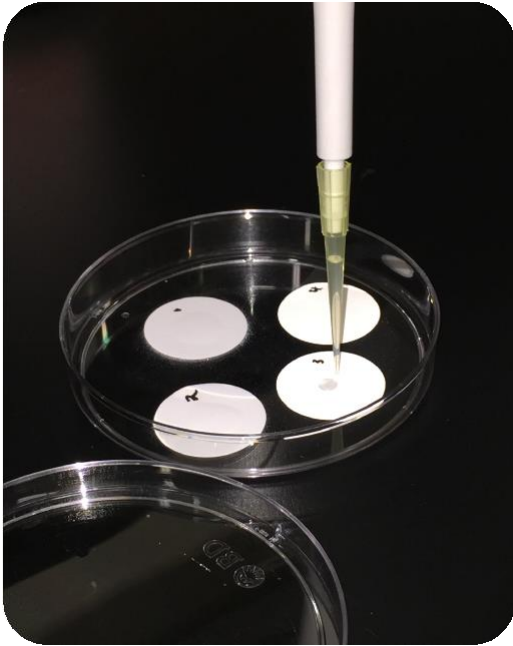


Microscopio Olympus
FV1000

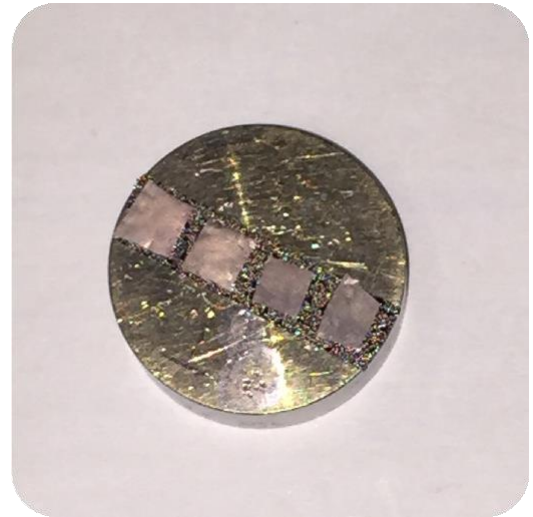


Objetivo 60x/ Láser de longitud
de onda de 543 nm al 33% de
intensidad.

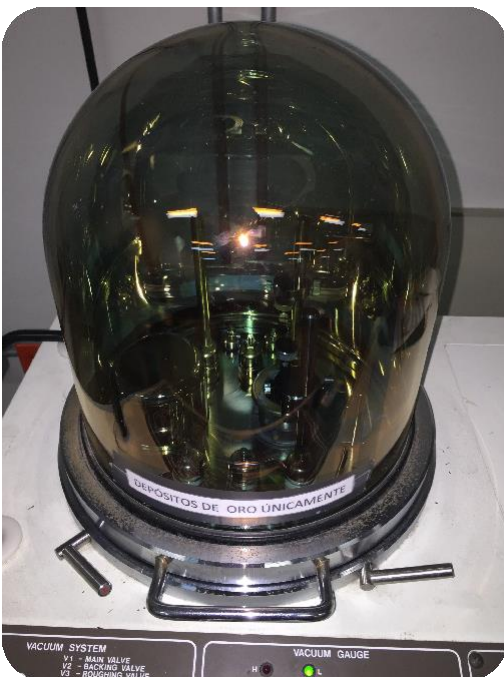
Análisis del efecto antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) por microscopia Electrónica de Barrido (SEM)



Muestras en membrana de nitrocelulosa Whatman de 0.45 μm , deshidratadas con acetona.

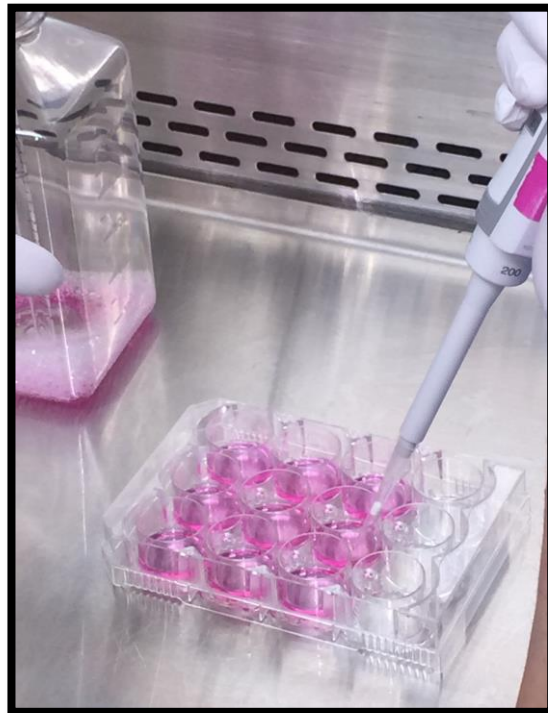
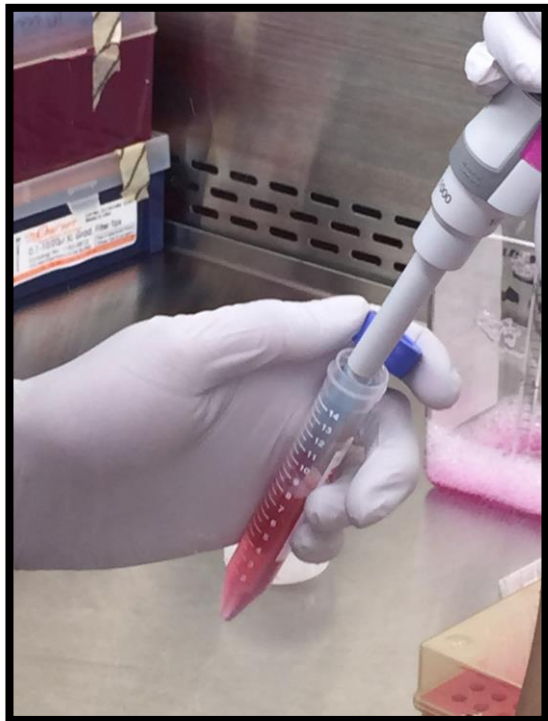


Tratamientos colocados en cinta de carbono después del baño de oro.



Microscopio JSM-5300 a 20kx

Cultivo celular / Ensayos de biocompatibilidad de las VLPs-(DCD-1L) y del CaOH.



Línea celular Hela en medio RPMI (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina y 50 μ g de penicilina/estreptomicina.



Células a 37° C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂

ABREVIATURAS

- **AAMP**: Péptidos Antimicrobianos Aniónicos

- **AFM**: Microscopia de Fuerza Atómica

- **AMPs**: Péptidos Antimicrobianos

- **Ca**: Calcio

- **Ca(OH)₂**: Hidróxido de Calcio

- **CCMV**: Cowpea Chlorotic Mottle Virus

- **CHX**: Clorhexidina

- **CP**: Cápside

- **DCD**: Dermcidin

- **DTT**: Ditioneitol

- **EDTA**: Ácido Etilendiaminotetraacético

- **LB**: Luria Bertani

- **LPS**: Lipopolisacáridos

- **MIC:** Concentración Mínima Inhibitoria

- **mM:** Milimolar

- **NaOCl:** Hipoclorito de sodio

- **RNA:** Ácido ribonucleico

- **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

- **OMS:** Organización Mundial de la Salud

- **PG:** Fosfatidilglicerol

- **pH:** Potencial de Hidrógeno

- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonil

- **SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido

- **TEM:** Microscopía Electrónica de Transmisión.

- **VLPs:** Partículas tipo-virus

- **Zn:** Zinc

- **µg:** microgramos