



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE PEPTIDOS EN CAPSIDE

COMO MEDICACION INTRA CONDUCTO

TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL
DIPLOMA DE

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

P R E S E N T A

MICHAEL JOSEPH DELY ARROYO

PRESIDENTE

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODALES

DRA. MARIA ELENA DE LOS ANGELES HOFMANN SALCEDO

DRA. HAYDEE GOMEZ LLANOS JUAREZ

Tijuana, Baja California, México, Mayo 2016

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, BC a mayo del 2016

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EFFECTO ANTIMICROBIANO DE PEPTIDOS EN CAPSIDE COMO MEDICACION INTRACONDUCTO**

Propuesto por el **CD _MICHAEL_JOSEPH_DELY_ARROYO_**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

A T E N T A M E N T E

**PRESIDENTE
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ**

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, BC a

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EFFECTO
ANTIMICROBIANO DE PEPTIDOS EN CAPCIDE COMO MEDICACION
INTRA CONDUCTO**

Propuesto por el **CD _MICHAEL_ JOSEPH_ DELY_ ARROYO_**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
SINODAL
DRA.MARIA ELENA DE LOS ANGELES HOFMANN SALCEDO

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, BC a

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EFFECTO
ANTIMICROBIANO DE PEPTIDOS EN CAPCIDE COMO MEDICACION
INTRA CONDUCTO**

Propuesto por el **CD _MICHAEL_ JOSEPH_ DELY_ ARROYO_**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

A T E N T A M E N T E

SINODAL

DRA. HAYDEE GOMEZ LLANOS JUAREZ

Ccp.- Archivo.

Índice

Equipo de investigación	6
Abreviaturas y definiciones	7
Resumen.....	5-8
Antecedentes	9-11
Marco teórico	12
Pregunta de investigación	22
Justificación	30
Hipótesis	23
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos	24
Metodología	25
Diseño del estudio	25
Descripción de la población	25
Muestreo.....	26
Criterios de inclusión	26
Criterios de exclusión	26
Criterios de eliminación	26
Definición conceptual y operacional de las variables	27
Materiales y métodos	28-30
Procedimientos.....	30-34
Transporte y análisis de las muestras	34-35
Resultados	35

Análisis de resultados	35-36
Análisis por objetivos específicos	36-37
Anexos	38-44
Referencias bibliográficas.....	45-47

Equipo de investigación

Investigador principal:

Nombre: Michael Joseph Dely Arroyo

Grado: Cirujano dentista

Puesto: Estudiante de posgrado de Endodoncia en CUPIS UABC tijuana

Presidenta de Tesis

Nombre: Ana Gabriela Carrillo Varguez

Grado: Cirujano dentista con especialidad en endodoncia, maestría y doctorado en ciencias de la salud.

Puesto: coordinadora de posgrado en endodoncia de la Facultad de Odontología Tijuana UABC.

Asesor de Tesis:

Nombre: Alfredo Nuñez Rivera

Grado: Maestro en ciencias

Puesto: Estudiante doctorado en biotecnología, UNAM

Nombre: Fermin Nuñez Rivera

Grado: Cirujano dentista con especialidad en endodoncia

Puesto: Estudiante maestría en ciencias de la salud, UABC

Abreviaturas y definiciones

Abreviación	Definición
AMPs	péptidos antimicrobianos
VLPs	Capsídar partículas como-virus
PMCP	para-monoclorofenol
Ca(OH) ₂	<i>Hidróxido de calcio</i>
pH	potencial de hidrogeno
LB	Medio de cultivo deshidratado LB (Luria Bertani)
CCMV	CowpeaChloroticMottle Virus
UABC	Universidad autónoma de baja california
CUPIS	Centro universitario de posgrado e investigación
UFC	Unidades formadoras de colonias
E.F.	estreptococo fecalis
BC	Baja California

Resumen

El éxito del tratamiento de conductos depende de un adecuado abordaje, una correcta instrumentación, irrigación y obturación, con el objetivo primordial de optimizar la desinfección del sistema de conductos y así prevenir la reinfección. Hoy en día una novedosa herramienta para combatir este tipo de padecimientos es la nanomedicina, específicamente el uso de los péptidos antimicrobianos (AMPs), de manera concreta en el sistema de conductos radiculares e inducir el efecto bactericida en los agentes patógenos.

Cabe mencionar que los AMPs no solo tiene el potencial bactericida, si no que estos promueven la regeneración de la pulpa como también están implicados en el proceso des-inflamatorio, por lo que conlleva a una recuperación mas rápida del paciente. En este trabajo se pretende en capsidar partículas como-virus (VLPs) con un péptido antimicrobiano específico que sea capaz de inhibir de manera prolongada el proceso de infección presente en los órganos dentarios y a su vez de manera colateral inducir la regeneración ósea en caso de lesiones periapicales, e inhibir el proceso inflamatorio presente.

INTRODUCCION

Las variaciones anatómicas del sistema de conductos radiculares limita la acción mecánica de los instrumentos actualmente utilizados en endodoncia, es necesario la utilización de soluciones antimicrobianas para obtener la desinfección del sistema de conductos. Los microorganismos son los principales agentes etiológicos implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical del sistema de conductos.¹

Desde el año 1990 Nair y Sjogren recomendaban la desinfección mediante medicación intraconducto para eliminar los microorganismos residuales albergados en la complejidad de los conductos radiculares. Por lo tanto el abordar los tres componentes básicos de la endodoncia como es el desbridamiento mecánico, la desinfección química y un apósito antimicrobiano no logran eliminar previsiblemente microorganismos de el sistema de conductos radiculares.² Especies bacterianas tales como *Enterococcus faecalis* puede evadir los protocolos actuales y se encuentra comúnmente en los casos fracaso de origen endodóntico.³

En el 2002 Hoen resaltaba que la persistencia de infección e inflamación están asociados generalmente cuando no se consiguen los resultados deseados del tratamiento endodóntico no quirúrgico deseados por lo tanto se considera que la causa del fracaso endodóntico es multifactorial. 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 retratamiento.⁴

El desarrollo de un agente con actividad antimicrobiana de amplio espectro de efecto prolongado en la microflora endodóntica y que sea bien tolerado por los tejidos circundantes, siendo una valiosa adición al protocolo en el tratamiento de conductos radiculares.

La investigación sobre la caries y la enfermedad periodontal ha destacado el potencial de los péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos eficaces.⁵

La gran variedad de péptidos antimicrobianos, tanto catiónicos como aniónicos, 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.⁶

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 péptidos antimicrobianos 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 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 comprobado que los AMPs con aminoácidos modificados han mejorado la eficacia antimicrobiana y por tanto su aplicación clínica. ⁽⁶⁾

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. ⁽⁶⁾

En este trabajo se utilizaron como vector al CCMV y partículas tipo-virus (VLPs) que en capsídan al péptido (con actividad antimicrobiana, anti fúngica 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 se comprobó el potencial de los péptidos antimicrobianos en la regeneración celular.

Antecedentes

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. La mayoría de los microorganismos se encuentran unidos a la superficie dentro de un estructurado ecosistema denominado biofilm y no como organismos flotando libremente. El biofilm o biopelícula se puede definir como una estructura asociativa de una o varias estirpes bacterianas, embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos auto producida y que se encuentra adherida a una superficie o sustrato. 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.⁽⁷⁾

Es de gran importancia resaltar que en la endodoncia actual la forma de vida bacteriana es más resistente a los distintos germicidas conocidos, debido a la agrupación de las bacterias en biofilm y que se postula como la causa de fracaso en tratamientos de conductos aparentemente correctos. ⁽⁴⁾

En el año 2008 para Siqueira, los casos de infección periapical crónica deben considerarse al día de hoy, como causa principal de las infecciones de tipo biofilm.^{(8),(9)}

En el 2004 Svensäter y Bergenholtz constata, manifestaban que para la formación de un biofilm en el conducto radicular se requieren cuatro fases. ⁽¹⁰⁾ En la primera etapa 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.

En esta etapa el biofilm se puede consistir en un 15% de bacterias y un 85% de matriz de polisacáridos, además de contar con más de 300 capas de bacterias superpuestas. En cuanto a la supervivencia de un biofilm, se resalta que no es más resistente el biofilm compuesto que en solitario, sino aquel que cuanta con mayor número de bacterias con capacidad de auto agregarse. A más tiempo de evolución, más tiempo para mejorar y sofisticar los sistemas de defensa del biofilm por parte de diferentes estirpes bacterianas.⁽¹¹⁾

Incluso, al día de hoy, se considera a los microbiólogos como un factor de virulencia como son las bacterias con la capacidad de asociarse en biofilms, es decir, entre dos estirpes bacterianas distintas que presenten parámetros similares, que cuentan con permanencia en tejido vivo, capacidad de liberar endotoxinas, etc., se considera una estirpe más peligrosa aquella que haya mostrado más capacidad para iniciar un biofilm.⁽³⁾

En 2005 George y col. analizaron la estructura del biofilm de *E. faecalis* combinando medios ricos y pobres en nutrientes con medios aeróbicos y anaeróbicos en dientes extraídos.⁽²³⁾

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. ⁽²⁴⁾ 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, esto quizás se deba a que al aumentar la cantidad de microbios, éstos buscan nuevas

zonas de colonización, huyendo de la masificación.⁽²⁵⁾

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 antibacteriano químico sobre el metabolismo celular y capacidad para disolver tejido orgánico cuando se encuentra en íntimo contacto con él.^(8, 26)

En el año 2002 Distel y cols. 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. ⁽²⁴⁾ 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.

En el 2009 Kayaoglu y cols. 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.⁽²⁷⁾

En el 2008 Siqueira y Rôças recomiendan la medicación intraconducto como imprescindible y la equiparan en importancia a una adecuada instrumentación biomecánica.⁽⁸⁾

Marco teórico

MECANISMOS DE DEFENSA DEL BIOFILM

El biofilm bacteriano se caracteriza principalmente por su gran capacidad de resistencia. Esta cualidad se ve 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.⁽¹²⁻¹⁴⁾

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. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Las bacterias aglomeradas que conforman el biofilm no provocan infecciones agudas, sino crónicas, debido al tipo de metabolismo del mismo y sus características, este concepto lo bautizan como “biofilmlifestyle”.⁽⁸⁾

BACTERIAS QUE FORMAN UN BIOFILM

El grupo de organismos 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 canales infectados. 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 las especies gram-positivas y gram-negativas. En proyectos de cultivo realizados predominaron con más frecuencia *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, y un número limitado de otras especies en los conductos radiculares infectados .⁽¹⁰⁾

Los tipos bacterianos observados en el biofilm de origen endodóntico son, fundamentalmente, cocos, bacilos y filamentos, aunque ocasionalmente se han detectado espiroquetas.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

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.^(2, 21, 22)

En 2005 George y col. analizaron la estructura del biofilm de *E. faecalis* combinando medios ricos y pobres en nutrientes con medios aeróbicos y anaeróbicos en dientes extraídos.⁽²³⁾

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. ⁽²⁴⁾ 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, esto quizás se deba a que al aumentar la cantidad de microbios, éstos buscan nuevas zonas de colonización, huyendo de la masificación.⁽²⁵⁾

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 antibacteriano químico sobre el metabolismo celular y capacidad para disolver tejido orgánico cuando se encuentra en íntimo contacto con él.^(8, 26)

En el año 2002 Distel y cols. 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. ⁽²⁴⁾ 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.

En el 2009 Kayaoglu y cols. 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.⁽²⁷⁾

En el 2008 Siqueira y Rôças recomiendan la medicación intraconducto como imprescindible y la equiparan en importancia a una adecuada instrumentación biomecánica.⁽⁸⁾

Medicación intraconducto

La medicación intraconducto consta del uso interno de un medicamento con el objetivo de lograr efectos terapéuticos locales y no sistémicos. En endodoncia se relaciona este método a la aplicación 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.

Para lograr el éxito desaseado se debe coadyuvar con el uso de irrigantes locales y quelantes, agentes químicos de la instrumentación. Si el tratamiento de conductos radiculares no se realiza en una sola sesión se recomiendan agentes antimicrobianos, para la antisepsia 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.^(9, 28)

En órganos dentarios con pulpa necrótica, la medicación intraconducto resulta un coadyuvante valioso en la desinfección del sistema de conductos radiculares, sobre todo en lugares inaccesibles a la instrumentación. La medicación entre sesiones en el tratamiento de conducto de dientes infectados está indicada cuando se encuentra una anatomía compleja del conducto, en la cual ciertas 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 la carga bacteriana, con el propósito de lograr una 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.⁽²⁹⁾

Medicamentos empleados en la terapia Endodontica

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. ⁽³⁰⁾

2. Aldehídos

El formaldehído, paraformaldehído o trioximetileno, glutaraldehído 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. ⁽³⁰⁾

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. ⁽³⁰⁾

4. Clorhexidina

Esta sustancia al parecer tiene un gran potencial como medicamento intraconducto. Su sustantividad, 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%.⁽³¹⁾

El mecanismo antimicrobiano de la clorhexidina se relaciona con su estructura molecular de bisbiguanida catiónica. La molécula catiónica de la membrana celular interna cargada negativamente, causa filtración de componentes intracelulares y muerte celular. En bajas concentraciones es bacteriostática. En altas concentraciones causará la coagulación y precipitación del citoplasma y además es bactericida.⁽³²⁾

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 irrigante.⁽³³⁾

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 un número de buenas razones. Aunque no existen recomendaciones específicas sobre cuándo debería colocarse hidróxido de calcio, la indicación general es en la necrosis pulpar.⁽³⁴⁾ Introducido por

Herman, 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 bactericidas. 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.⁽³⁵⁾

Debido a su baja solubilidad, una gran cantidad de hidróxido de calcio puede ser compactado dentro del conducto con poco riesgo de irritación periapical. 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 tejidos.⁽³⁶⁾

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 limitados.

El hidróxido de calcio se utiliza mezclado con diversos vehículos que por lo general no tienen actividad antibacteriana significativa. 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.

Con respecto a los cambios de pH que puedan presentarse con los vehículos empleados, en el 2003 Solak y Oztan, utilizaron un medidor de pH digital y evaluaron vehículos acuosos como agua, en dos soluciones anestésicas y solución fisiológica, determinaron con los resultados que los cuatro vehículos demostraron cambios de pH similares que se encuentran entre 11 y 12 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. ⁽³⁷⁾ Esto lo demostró Wadachi en 1998, con los resultados obtenidos del escaneo con el microscopio electrónico, 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. ⁽³⁸⁾

Entre las desventajas del hidróxido de calcio se encuentran: 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.

En el 2001 Estrela reporto 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 *Estafilococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.⁽³⁹⁾

Bezerra en 1997 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 efectividad. 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 jeringa. (40)

En el 2004 Torres y cols. 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. (41)

En 1993 Nerwich encontró que OH 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. (42) Asimismo, como el *Enterococcus faecalis*, conocido con el microorganismo predominante de un 4-40% de las infecciones endodónticas puede igualmente penetrar de manera profunda dentro del túbulo dentinario, el cual puede ser eliminado del conducto radicular si se elimina la mayor parte de la infección intraconducto. (6)

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 serían los mejores agentes antibacterianos previniendo la posibilidad de una reinfección endodóntica. (5, 43)

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.

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 esfingomielina. 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}.

En los seres humanos, se pueden encontrar pocos AAMPs, y su mecanismo de acción todavía no está claro. El LL-37 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 meticilina), *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas putida*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium*, y *Candida albicans* ⁷⁶.

El uso de capsídes 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 tejido específicos y parecen haber alcanzado un tope en su efectividad, debido a la que estos microorganismos en muchos casos generan resistencias a estos. 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. 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 acarreando moléculas blanco diferente naturaleza que combatan cierto padecimiento en particular.

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 oncológica para células cancerígenas, dando como resultado efectos prometedores. 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 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 ojo de vaca moteado clorótico CCMV del caupi (CowpeaChloroticMottle Virus), es un buen modelo de estudio ya que es capaz de encapsidar una gran variedad de moléculas y es muy estable bajo varias condiciones, así como es capaz de ser genéticamente modificado sin comprometer su funcionalidad.⁽⁴⁴⁾

Chitosan como vehiculo de liberación controlada.

El Chitosan es un biopolímero biológicamente segura, se ha propuesto como un polímero bioadhesivo y son de continua interés para nosotros, debido a sus propiedades únicas y flexibilidad en un amplio rango de aplicaciones orales reportados ^(47, 48).

Capacidad libre de defensa radical de los hidrogeles preparados.

Cuando se produce una herida, en general se acompaña de síntomas clásicos de la inflamación, tales como dolor, enrojecimiento y edema. En la etapa de la inflamación, el objetivo principal es la eliminación de los desechos, el daño tisular, y las bacterias por los neutrófilos y los macrófagos. Estas células tienen un papel en la defensa antimicrobiana y desbridamiento de los tejidos desvitalizados por la producción de enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno ⁽⁴⁹⁾.

La cantidad de Especies reactivas de oxígeno no controlada es la principal causa de la incapacidad para continuar el proceso de curación y por lo tanto sería ideal para utilizar la capacidad antioxidante de los hidrogeles "de diseño" para detectar y luchar contra el exceso de radicales libres. Esto ha sido examinada usando un modelo previamente establecido conocido como la reacción de Fenton biológico a través del cual el HO radical libre se pueden generar en presencia de H₂O₂ (50).

Se informó anteriormente que el quitosano en forma de hidrogeles cuenta con propiedades antioxidantes, ya que estas estructuras cuentan con superficies reactivas. Se realizaron estudios de Bio- adhesivas con el fin de evaluar la idoneidad de este material. Se encontró que el efecto sinérgico favorable de radicales libres incorporado en el mecanismo de defensa de los nuevos materiales funcionales aumentó bioadhesión sostenible y, por tanto, actuó como material funcional multidimensional restaurativa con el potencial para aplicarlo en curaciones de heridas in vitro.

El biomaterial se mantuvo intacta después de 24 días de inmersión en saliva artificial. Se pensaba que la estructura microporosa de los geles podría conducir a altas áreas superficiales internas con baja resistencia a la difusión en los geles. El quitosano puede ser exitosamente incorporado en como material con una " doble acción restaurativa " capaz de inducir en la herida in vitro una mejorada curación, y a su vez si contiene un péptido tal como el LL-37, funcionan como biomateriales específicos capaces de iniciar una bio- reparación y bio- adhesión in vitro de una manera específica del sitio.

Pregunta de investigación

¿Ejerce un efecto antimicrobiano los péptidos en capsíde en órganos dentarios con necrosis pulpar?

¿Ejerce un efecto regenerativo celular los péptidos antimicrobianos en cultivo celular?

Justificación

El desarrollo de los péptidos en capsíde como terapia biotecnológica permitirá contralar casos de infección prologada en órganos dentarios que presentan una alta carga bacteriana y regeneración celular, ya que en la actualidad no se ha demostrado científicamente el principio activo de los diferentes agentes empleados como medicación intraconducto derivando en múltiples casos en re infecciones en el sistema de conductos, resaltando los múltiples avances en la endodoncia actual, hablando de irrigantes químicos y su activación, dejando un poco de lado la aplicación de la medicación intraconducto como terapia de elección en órganos dentarios con necrosis pulpar. Esta información abriría una ventana de opciones terapéuticas, ya que la utilización de una capsíde no solo se restringe a la rama endodóntica si no a la odontología en general.

Hipótesis

Evaluación del efecto regenerativo celular de péptidos antimicrobianos en cultivo celular.

Evaluación del efecto regenerativo celular de péptidos antimicrobianos en órganos dentarios con necrosis pulpar.

Objetivo general

1. Evaluar la capacidad de regenerar tejido celular de los péptidos in vitro.
2. Evaluar el aspecto radiográfico inicial de los sujetos con presencia de necrosis pulpar, a los 14 días después de haber aplicado la medicación intraconducto.

Objetivos específicos

Analizar el efecto antimicrobiano los péptidos en capsíde en órganos dentarios con necrosis pulpar, en comparación con el hidróxido de calcio en pasta y el protocolo de irrigación ultrasónica pasiva en los pacientes que acudan a consulta en el centro de especialidades de UABC (CUPIS) campus Tijuana.

Metodología

Diseño del estudio

Es de diseño experimental.

Descripción de la población

Población blanco

Pacientes con necrosis pulpar crónica en órganos dentarios #46, #36.

Población de estudio

Pacientes que acudan al CUPIS UABC Tijuana con necrosis pulpar crónica en órganos dentarios #46, #36, durante el periodo 2015-2. y 2016-1

Muestra

La muestra estará conformada por 15 pacientes con presencia de necrosis pulpar:

- 5 pacientes con presencia de necrosis pulpar, a los cuales se les realizo el protocolo de irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25%.
- 5 pacientes con presencia de necrosis pulpar, a los cuales se les realizo el protocolo de medicación intraconducto con hidróxido de calcio en pasta.
- 5 pacientes con presencia de necrosis pulpar, a los cuales se les realizo el protocolo de medicación intraconducto de péptidos en capsíde en pasta.

Atendidos en UABC (CUPIS) durante el periodo 2015-2 y 2016-1 y que cumplan con los criterios de inclusión.

Muestreo

Este se realizara de manera aleatoria, es decir serán atendidos los pacientes que acudan a consulta en los días y horarios de atención en el centro de especialidades de UABC, durante el periodo establecido.

Criterios de inclusión

1-Pacientes con presencia de necrosis pulpar crónica en órganos dentarios #36,#46.

2-Edad de 9 a 65 años.

3-Firmar el consentimiento informado.

4-No estar inmunodeprimido (patología agregada)

Criterios de exclusión

1-Pacientes embarazadas.

2-Pacientes que hayan estado en tratamiento de farmacoterapia.

3-Pacientes con necrosis pulpar aguda.

4-Pacientes con presencia de fracturas o fisuras.

5-Pacientes que no quieran firmar el consentimiento informado

Criterios de eliminación

1- Pacientes que no concluyan su tratamiento.

2- Mal manejo de la muestra.

Definición conceptual y operacional de las variables

variables	Conceptual	Operacional	Tipo de variable
VD efecto bactericida	Un efecto bactericida es aquel que produce la muerte a una <u>bacteria</u> . Un efecto bactericida está producido por sustancias bactericidas. Estas sustancias son secretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias.	Se medirá mediante el protocolo de unidades formadoras de colonias y técnica de densidad óptica.	Variable Numérica discreta
VI Péptidos en capsida	Los péptidos antimicrobianos son proteínas de origen natural	Se evaluara su uso como medicación	Categorica nominal

	que tienen propiedades antibióticas, generalmente están constituidos entre 12 y 50 aminoácidos.	intraconducto comparado con el hidróxido de calcio ya que es el medicamento de elección, aplicándolo en órganos dentarios 46 y 36 en conductos mesiales, en pacientes que acudan al centro de especialidades de la UABC (CUPIS)	
--	---	---	--

Materialles y métodos

Cultivo Celular Ensayo cierre de las heridas

1. Células que se desprenden de la placa de cultivo de tejidos usando 0,25% de solución de tripsina-EDTA en un tubo cónico de 15 ml por centrifugación, aspirar el sobrenadante, y colocar las células en un medio de cultivo de una nueva suspensión. Placa del número apropiado de células en una placa de 6 pocillos para el 100% de confluencia en 24 horas.



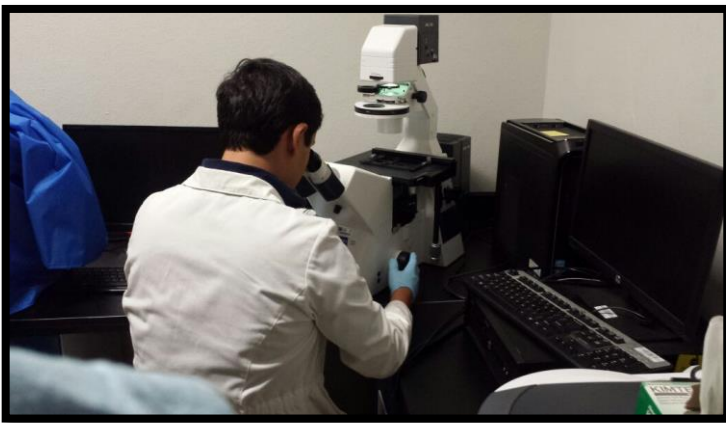
2. Se pueden necesitar exámenes para determinar el tiempo y el número de células para lograr el 100% de confluencia por el tipo celular y el tamaño de la que se utilizan también (por ejemplo, 1×10^6 células del melanoma B16F10 se siembran en un pocillo de una., Nota: placa de 6 pocillos 24 horas antes de la generación de la herida). Como alternativa, se pueden utilizar placas de 12 pocillos o de 24 pocillos.



3. Si está disponible, las células se puede sembrar (de ibidi LLC) en una placa de cultivo de tejido tratado de hacer la herida pre-fundido. Un inserto en el cultivo puede proteger la superficie de la placa del cultivo de tejido dañado por la punta de la pipeta., Si se utiliza un inserto de cultivo omitir el paso 1.2.
4. En un entorno estéril (por lo general una campana de bioseguridad) se utilizó una punta de pipeta I 200 para presionar firmemente contra la parte superior de la placa de cultivo de tejido y rápidamente hacer una herida vertical de abajo a través de la monocapa de células. Una punta de pipeta de tamaño diferente puede ser utilizada para hacer el tamaño de la herida que se desea. No use fuerza excesiva contra la placa de cultivo de tejidos con la punta de la pipeta, ya que puede dañar la superficie.
5. Se aspiró con cuidado los escombros y los medios de comunicación celular. Se añadió lentamente suficiente medio de cultivo contra la pared del pozo para cubrir el fondo del pozo y evitar separar las células adicionales. Después de la generación y la inspección de la herida una imagen inicial se debe tomar. Se colocó la placa de cultivo de tejido en una incubadora a la temperatura y concentración de CO₂ apropiado (típicamente 37 ° C y 5% CO₂).

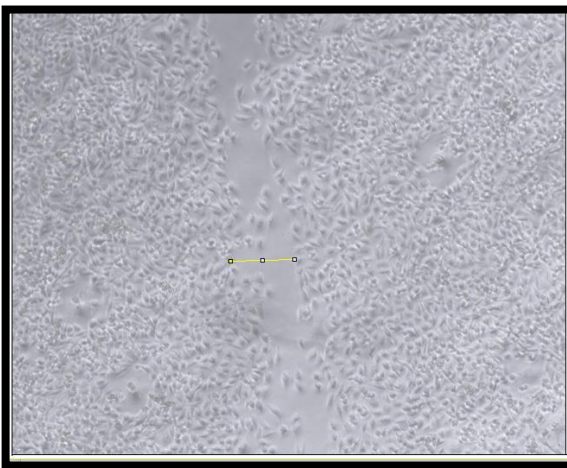
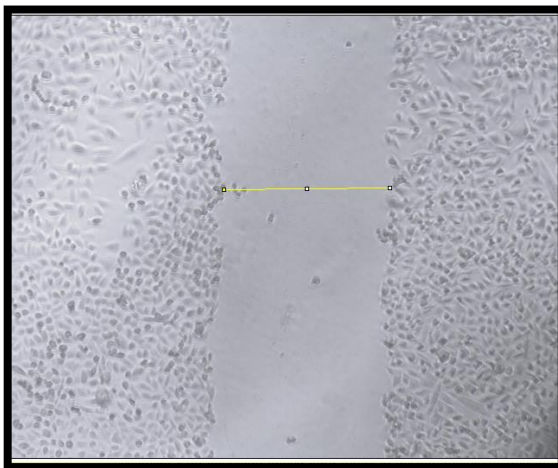
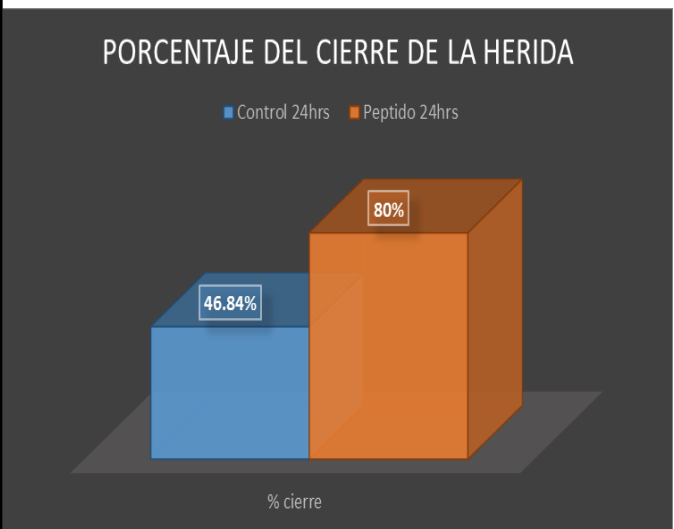
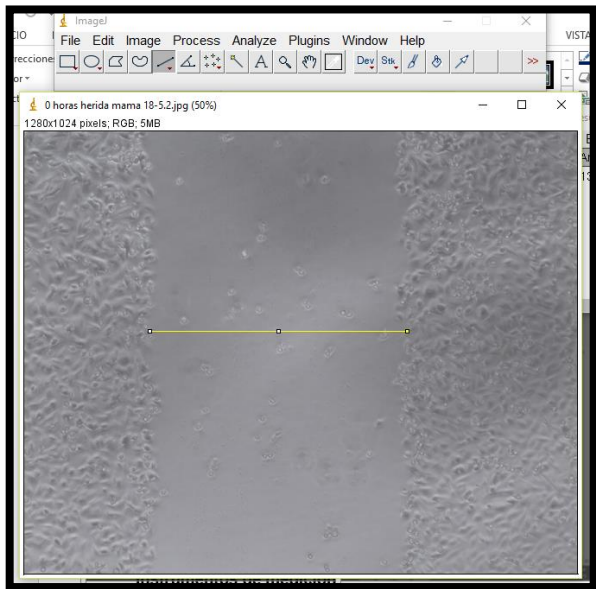


6. En varios puntos de tiempo, por ejemplo, cada 3 horas, se retiró la placa de la incubadora y se colocó bajo un microscopio invertido para tomar una imagen instantánea y para comprobar si hay cierre de la herida. Si la microscopía de lapso de tiempo disponible, tomar una foto cada X número de minutos (por lo general a partir de cada 5 minutos) para cualquier duración de tiempo en una cámara de temperatura controlada y CO₂. Dependiendo del tipo de célula, el tiempo de cierre de la herida puede variar.



7. Para analizar los resultados de las imágenes de captura, se midió la distancia de un lado de la herida al otro usando una barra de escala. Se analizó y claramente presentes cierre de la herida en el tiempo utilizando un gráfico de barras o gráfico de dispersión.

8. Para analizar las imágenes con lapso de tiempo, se importó las imágenes en el software ImageJ (disponible gratuitamente en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para hacer un video. Para ello ImageJ abierta, haga clic en Archivo, Importar y, Secuencia de imágenes. Encuentra el archivo con imágenes; haga clic en la primera foto en el archivo. Guardar vídeo seleccionando Archivo, Guardar como, y AVI. Migración de las células individuales se pueden observar para caracterizar el movimiento direccional.⁴⁶



Instrumentos de medición

A continuación se describen los instrumentos de medición necesarios para realizar esta investigación. Los cuales son los protocolos de unidades formadoras de colonias y de densidad óptica para medir la acción antimicrobiana de los péptidos en capsíde.

Unidades formadoras de colonias

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Esta técnica no pretende detectar a todos los microorganismos presentes, pero el medio de cultivo, las condiciones de temperatura y la presencia de oxígeno, permiten seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante en diferentes alimentos; por ejemplo, las bacterias mesofílicas aerobias, o mesófilos aerobios son un indicador general de la población que pueden estar presente en una muestra y, por lo tanto, de la higiene con que ha sido manejado el producto. Este grupo en particular, se determina en la mayor parte de los alimentos, pero para algunos productos, también es importante determinar la presencia de bacterias termofílicas, psicofílicas y/o psicrotróficas para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento. La técnica básica es la misma, pero cambian las condiciones de incubación, medios de cultivo y algunos otros detalles, que se mencionan en la técnica. Si se modifican las condiciones de incubación o se somete la muestra a algún tratamiento previo, el método puede aplicarse también a la detección de otros grupos como anaerobios o esporulados, desde luego, con la adecuada selección de medios de cultivo. El método permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la

influencia de diversos factores por lo que es muy importante apegarse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones.

Técnica

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo; la técnica para realizar este procedimiento se describe en “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

1. Se consideran “representativas” las cajas que tienen un número de colonias dentro del rango de **sensibilidad del método**, en este caso, **entre 25 y 250 UFC**.

2. Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, se aplica el factor de dilución, que es el inverso y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y potencias de 10. Cuando el tercer dígito del promedio es 4 o menor, se omite dejando el número de 2 cifras significativas. Por ejemplo, si en una caja se cuentan 312 UFC, se debe reportar como 31×10^1 , porque el tercer dígito es 2 y se redondea al segundo dígito. Cuando el tercer dígito es 5 o superior, el segundo dígito se redondea al siguiente, por ejemplo si en una caja se cuantifican 199 UFC se reportará como 20×10^1 UFC, porque el tercer dígito es superior a 5. En el ejemplo 5 del cuadro 2, el promedio es de 237.5 en la dilución 10⁻³, por lo que se reportará como 24×10^4 UFC.

3. Cuando las 2 placas de una dilución contienen un número de colonias características dentro del rango de sensibilidad del método, se promedian los números y se multiplica por el inverso de la dilución.
4. Cuando hay una placa con crecimiento extendido, no se consideran ésta ni su duplicado.
5. Cuando una de las 2 placas de una dilución es representativa y la otra no, se consideran ambas y se promedian.
6. Cuando hay placas representativas en 2 diluciones subsecuentes, se promedian cada una con su duplicado (aunque el duplicado no lo sea), se aplica el factor de dilución a cada una y luego se promedia nuevamente.
7. Si en las placas no hay colonias (o no son características del grupo en estudio), reportar el resultado como: menos de un (grupo) en 10-x (la más baja utilizada), por ejemplo $< 100 / g$ si la dilución más baja fue 10^{-2} ó $< 1 / mL$ si la muestra se sembró directamente, sin diluciones. Se agrega la leyenda: "valor estimado".
8. Si no hay placas representativas pero hay alguna con un número menor de UFC., se consideran las de la menor dilución y se agrega "valor estimado".
9. Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Agregar la leyenda "valor estimado".
10. Se cuentan como una sola colonia: • Cadenas o pequeños grupos no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias y que están separadas de otras colonias o cadenas.

Colonias extendidas como película entre el fondo de la caja y el agar y que se diferencian claramente de otras. • Colonias como película en las orillas de la caja, sobre la superficie del agar.

Confiabilidad

Se considera “crecimiento extendido” el que se presenta cuando las colonias abarcan más del 50 % de la superficie de la caja, con o sin inhibición de crecimiento; en ese caso, y/o cuando la inhibición exceda el 25 % de la superficie de la caja, se considera que las placas no son representativas y por lo tanto no se toman en cuenta.

Procedimientos

En el presente estudio se realizaron tratamientos de conductos en órganos dentarios #36, #46 multiradicales por un solo operador dedicado exclusivamente a la práctica de la endodoncia, solo se consideró una endodoncia por paciente.

En la historia clínica se recogieron los siguientes datos:

- Diagnostico pulpar (necrosis pulpar) del órgano dentario a tratar, mediante la observación clínica directa de presencia o ausencia de dentina infectada a nivel de cámara pulpar, durante la apertura cameral. Se obtuvieron tres grupos en función a la aplicación de la medicación intraconducto:

1-Grupo control (protocolo de irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25%).

2-Medicación intraconducto con hidróxido de calcio en pasta.

3-Medicación intraconducto con péptidos en capsíde en pasta.

- Diagnostico radiográfico: basado en la radiografía preoperatoria.

- Sexo del paciente.

- Edad del paciente.

- Nomenclatura del diente tratado y se especificó en el odontograma.

- Historia médica del paciente en la que se recogió la presencia de enfermedades sistémicas previas, así como su tratamiento y alergias.

-Se les pidió que firmaran el documento de consentimiento informado sin antes explicarles su contenido para lograr su aceptación.

Propósito de los análisis

En este análisis se evaluó la eficacia antimicrobiana de los péptidos en capsíde en gel, en comparación con el hidróxido de calcio en pasta y el protocolo de irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25%

Criterios de valoración

1-Evaluación radiográfica inicial: Los casos pueden ser considerados como éxito, fracaso u incierto, desde el punto de vista radiográfico. Éxito si:

- (a) Los contornos y el espacio del ligamento periodontal se encuentran normales,
- (b) El ligamento periodontal se encuentra ensanchado solo alrededor de excesos de material de obturación.

Los casos se consideran fracaso si:

- a. Se evidencia la disminución de la imagen radiolúcida perirradicular,
- b. No se evidencia los cambios en la rarefacción.
- c. Aparición de una rarefacción nueva.
- d. disminución de la saturación de píxeles en programa imageJ.

2-Evaluación clínica: El tratamiento realizado al paciente, debe constar de varias fases: (a) examen visual de tejidos blandos, (b) palpación de tejidos alrededor del diente tratado y/o adyacentes, (c) percusión del diente tratado y/o adyacentes, (d) medición de surcos gingivales y (e) interrogatorio al paciente.

3-Evaluación bacteriológica: se tomó una muestra bacteriológica de los conductos, previa a la obturación final de los mismos, para evaluar los resultados a mediano y largo plazo

PROCEDIMIENTO CLINICO

- 1- Todos los pacientes fueron anestesiados con anestesia local del tipo lidocaína + epinefrina (1:80000). (Scandonest 2 %) (Septodont).
- 2- Se procedió al aislamiento con dique de goma. (blossom).
- 3-Se realizó la apertura con una fresa redonda de carburo #4 (Pearson) y se regularizaron las paredes de la cámara pulpar con una fresa Endo Z. (Dentsply).
- 4-Se permeabilizó con una lima del nº 10 (c+ file Dentsply) y se estableció la longitud de trabajo con lima 15 o 20 (tipo k Dentsply) con el localizador electrónico de ápice APEX ID(SybronEndo)®,confirmándose ésta radiográficamente digital (schick).
- 5- El protocolo se realizó con una técnica crown-down con limas rotatorias 25/08 K3XF (SybronEndo) para el ensanchando el tercio coronal.
- 6-Se realizó la instrumentación manual con limas K® (#10-15-20 o 25 Dentsply), manejando así el tercio apical manualmente, logrando un tope apical.
- 7-Se instrumentó con el sistema TF ADAPTIVE ML2 35/06 (SybronEndo)) en mesiales de molares inferiores y vestibulares de molares superiores y ML3 50/04 en distales de molares inferiores y palatinos de molares superiores.
- 8-La irrigación se realizó todo el tiempo con hipoclorito sódico al 5.25% con jeringas de 10 ml , con aguja vista 27 j haciendo el protocolo de irrigación ultrasónica pasiva por 20 segundos en 3 ocasiones con una punta de ultrasonido tipo u # 20 y terminando con una irrigación final con EDTA (smearclear) .
- 9- Se secaron los conductos con puntas de papel TF ADAPTIVE.
- 10- se realizó un lavado con agua inyectable, para la recolección de la muestra y se colocó en un medio LB.

11-a) Una vez terminado el proceso de instrumentación, se procedió a colocar una torunda de algodón y se colocó cemento Cavit® como restaurativo provisional .(grupo control)

11-b) Una vez terminado el proceso de instrumentación, se procedió a colocar hidróxido de calcio (viardent) como medicación intraconducto y se colocó cemento Cavit® como restaurativo provisional.

11- c) Una vez terminado el proceso de instrumentación, se procedió a colocar péptidos en capsíde en pasta como medicación intraconducto y se colocó cemento Cavit® como restaurativo provisional.

12-En una segunda cita se procedió a la recolección de la muestra con el mismo protocolo en los 3 grupos el cual consiste a la remoción del cemento Cavit® y posteriormente la eliminación de la medicación intraconducto con agua bidestilada ,recolectando con la misma el contenido intraconducto en la jeringa hipodérmica de 10ml , posteriormente se sellaron con el porta agujas y se colocaron en una bolsa de esterilizar, una vez realizado este procedimiento se procedió al secado del conducto con puntas de papel estériles y se colocaron en el medio LB.

13-Se obturaron mediante condensación lateral con gutapercha, puntas accesorias fine- fine y MF® dentsply, espaciadores de níquel titanio D11T de Nordent y AH-Plus® (Dentplay) como cemento sellador.

14- Posteriormente se procedió a hacer el sembrado de la muestra en cajas petri en un agar nutritivo con la técnica de barrido con la espátula de triangulo y se colocaron en la incubadora durante 12 horas, las muestras obtenidas en un periodo de tiempo de 7 días.

Con el objetivo de observar la presencia de bacterias mediante el protocolo de unidades formadoras de colonias y el proceso de densidad óptica.

15- Se analizó el aspecto radiográfico en los órganos dentarios tratados en este estudio con la finalidad de observar la cicatrización radiográfica inicial de la lesión basada en la radiografía preoperatoria para observar su evolución.

16-Otro punto que se evaluó fue el aspecto clínico, con la finalidad de observar la presencia de inflamación del mucoperiostio del órgano dentario tratado, así como la presencia o ausencia de fistula en la zona.

Los pacientes fueron informados de la posible presencia de dolor en los días siguientes al tratamiento. Se les entregó un cuestionario, que debían rellenar y remitir.

Transporte y análisis de las muestras

Las muestras tomadas de la medicación intraconducto serán analizadas por medio de un examen al fresco. Las puntas de papel se almacenaran en un tubo de ensayo con medio LB, así como el contenido líquido obtenido mediante presión negativa con una jeringa hipodérmica de 5ml con agua bidestilada, como medio de transporte, este tubo se mantendrá a una temperatura corporal 37 y serán transportadas para realizar el manejo de la muestra al laboratorio de bionanotecnología de la UNAM campus Ensenada .

Las muestras, serán procesadas por un técnico del laboratorio capacitado en los protocolos de UFC y densidad óptica y posteriormente realizará el llenado de la hoja de ingreso de muestra.

Las muestras fueron tomadas por

- CDEE MICHAEL JOSEPH DELY ARROYO Y CDEE Fermín Núñez Rivera

El análisis de las muestras se realizó por

- MC Alfredo Núñez Rivera

En el laboratorio de bionanotecnología de la UNAM campus Ensenada.

Resultados

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos serán analizados utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión 22.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

En el plan de análisis se expone y detalla, de acuerdo a los objetivos propuestos, las medidas de resumen de las variables y cómo serán presentadas (cuantitativas y/o cualitativas), indicando los modelos y técnicas analíticas que se utilizarán para comprobar las hipótesis del estudio.

Análisis por objetivos específicos

Decidir el plan de análisis estadístico es el adecuado para nuestros datos no es un proceso mecánico. Depende de cada situación en particular y de los conocimientos del investigador para justificar el porqué de su decisión.

-Para lograr lo programado en el objetivo específico #1, en el cual se pretende Evaluar bacteriológicamente los órganos dentarios con necrosis pulpar, por medio de la recolección muestral intraconducto, donde se pretende observar la presencia de bacterias en un biofilm endodontico en los casos a evaluar , teniendo 3 grupos, un grupo control y 2 grupos con medicación intraconducto. Usaremos un análisis estadístico Anova , ya que buscamos comparar los 3 grupos en 3 diferentes momentos siempre y cuando mis resultados sigan una distribución normal de no ser así se va a utilizar el plan de análisis estadístico kruskal wallis ya que es una prueba no paramétrica sin distribución normal, así como evaluar sus proporciones para cada grupo.

-Para lograr lo programado en el objetivo general , en el cual se pretende 1.Evaluar la capacidad de regenerar tejido celular de los péptidos antimicrobianos in vitro., por medio de la observación in vitro de la reparación de la herida del cultivo celular .

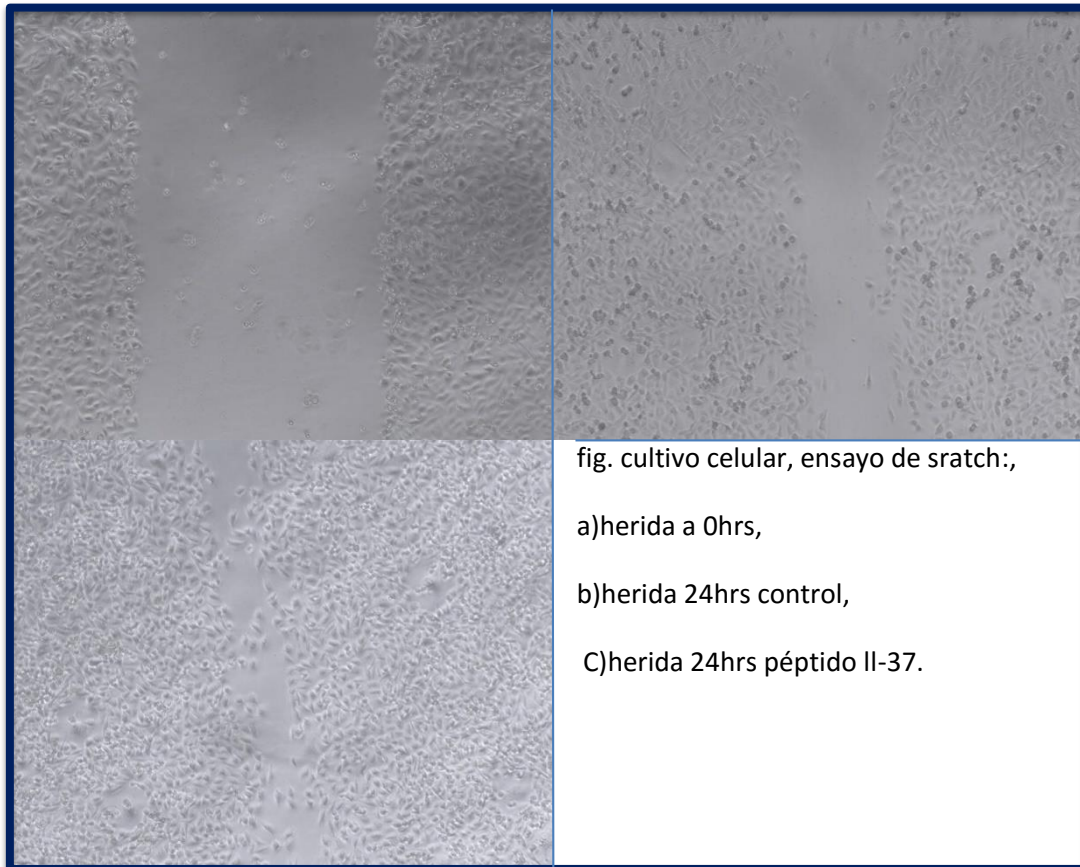
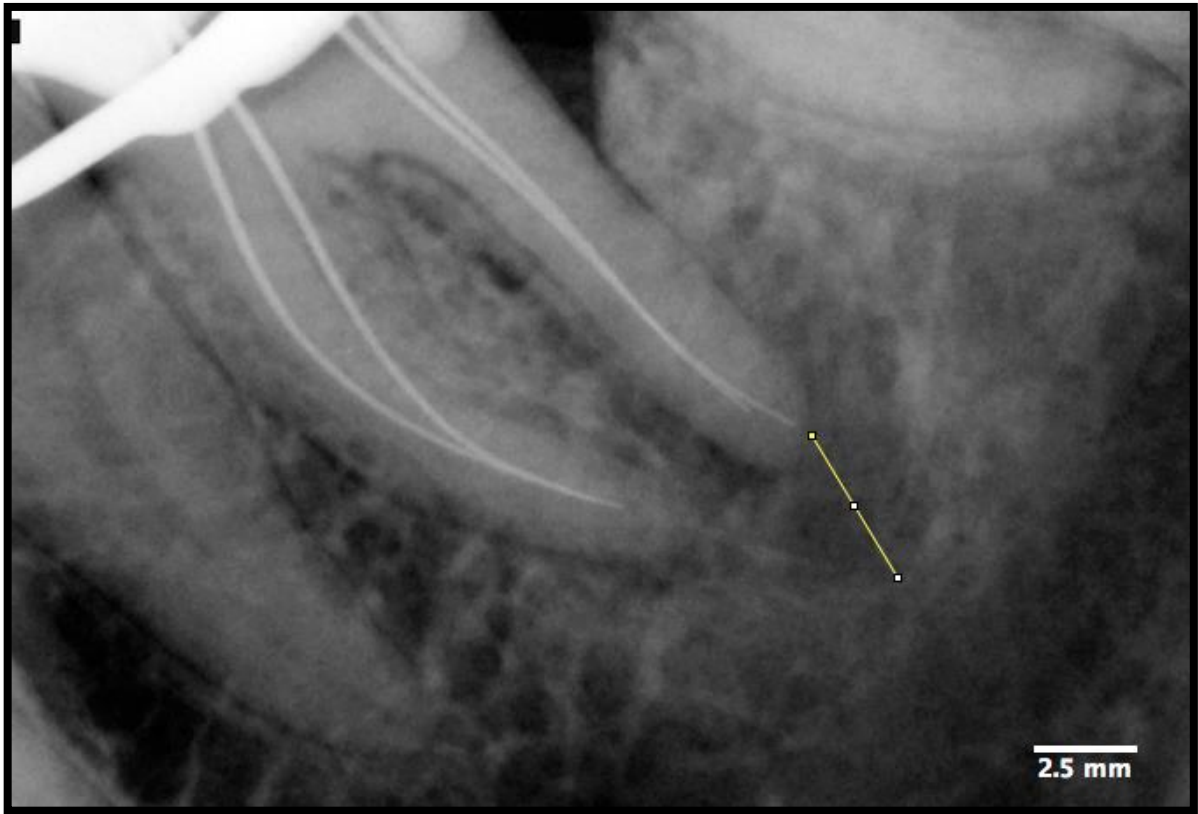


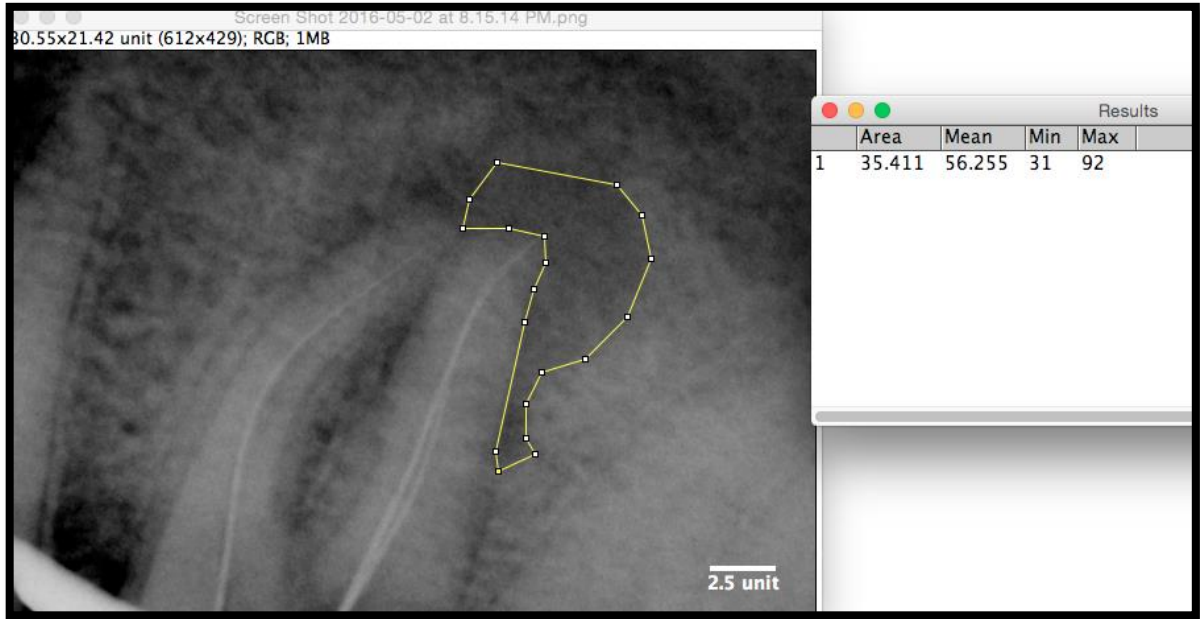
fig. cultivo celular, ensayo de scratch;
a)herida a 0hrs,
b)herida 24hrs control,
C)herida 24hrs péptido II-37.

- Para lograr identificar lo planteado en el objetivo específico #1, en el cual se pretende evaluar el aspecto radiográfico inicial de órganos dentarios con necrosis pulpar, por medio de la toma de radiografías , donde se pretende medir la saturación de pixeles para tratar de medir la regeneración osea , teniendo 3 grupos, un grupo control y 2 grupos con medicación intraconducto.

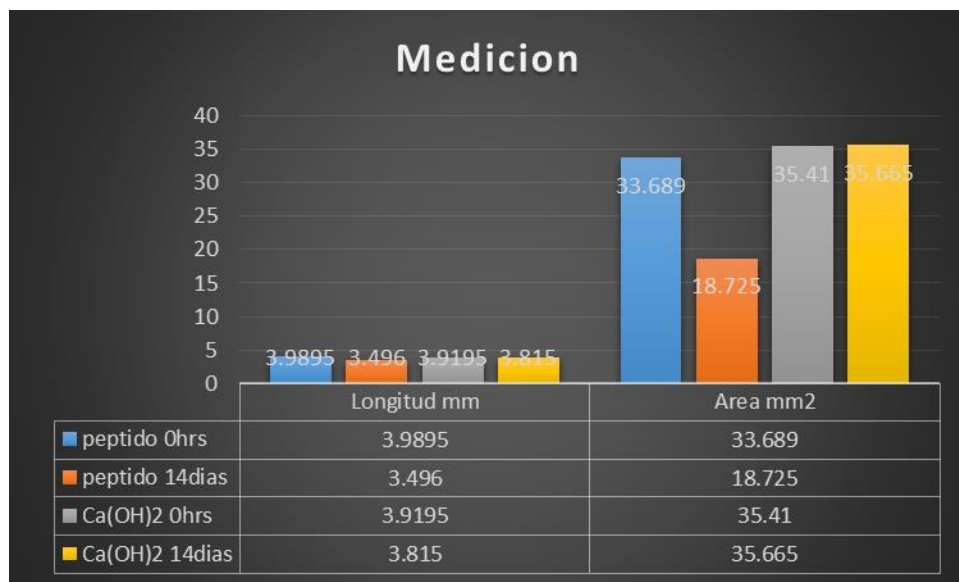
Se estableció una escala de 2.5mm, se realizaron varias medidas de longitud de extensión de la lesión radiolucida para sacar una media:



Se tomó el área de la lesión



Obteniendo como resultados los siguientes:



Gráfica. Evaluación radiográfica por densitometría.

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 37o C. 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 acabo el DCD-1L, utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM) se observó como los péptidos interactúan con la membrana permitiendo una desestabilización, lo que conlleva a una desintegración de la misma (fig.1).

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)

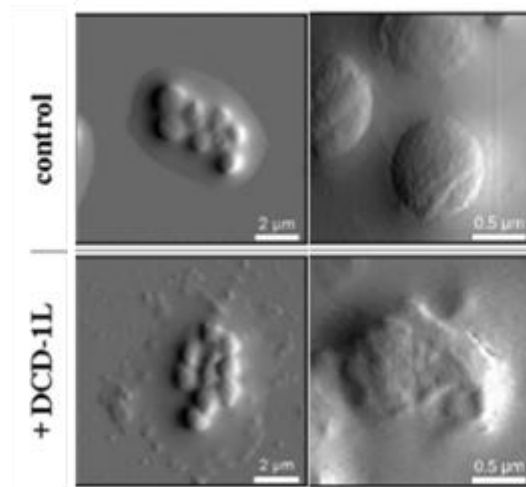
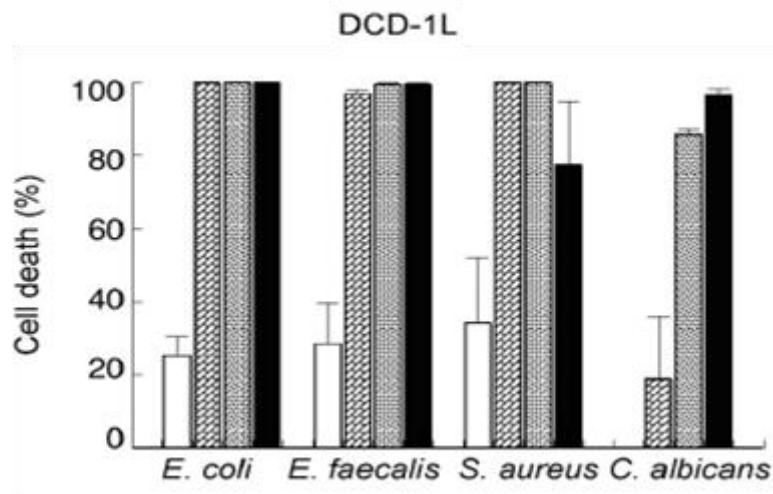


Figura1. Potencial antimicrobiano del DCD-1L.

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 µg/ml (1 barra), 10 µg/ml (2 barra), 50 µg/ml (3 barra), 100 µg/ml (4 barra). B. Imágenes de AFM de *S.aureus* tratadas con DCD-1L.

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 más 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 realizó un segundo muestreo, utilizando las mismas relaciones y concentraciones entre CP:DCD-1L de ensayo anterior, mas sin embargo en esta ocasión se varió 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 montó en a 40 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 microscopía 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. 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 mal formaciones, aglomerados y cápsides abiertas,. 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.

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 endodóntica. 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 biocompatibilidad.⁵⁹ 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 comprobar el efecto regenerativo celular del péptido LL-37, así como también su expresión en la disminución del área radiolúcida de la lesión.

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.

CONCLUSIÓN

1. La regeneración celular del péptido LL-37 fue idónea, no se observó ningún efecto citotóxico. Mientras que el uso de Ca(OH)_2 desintegro todo el cultivo celular.
2. Se observó una disminución del 12.46% de la lesión radiolúcida con la medicación intraconducto de VLPs(DCD-1L)
3. El potencial antimicrobiano de las VLPs-(DCD-1L) fue semejante a la actividad del péptido libre.
4. Se comprobó potencial antimicrobiano del DCD-1L ante patógenos presentes en infecciones endodónticas
5. Las VLPs derivadas del CCMV fueron capaces de encapsidar de manera eficiente al DCD-1L.

Anexo 1 Hoja de ingreso de la muestra

Elaboró:	Reviso:	Aprobó:
Dependencia:		
Fecha:	Fecha:	Fecha:

[illegible]

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA, TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIOS DE
INVESTIGACIÓN Y AUTORIZACION PARA USO Y DIVULGACION DE
INFORMACION DE SALUD.**

**Acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y el
Reglamento de la Ley General de Salud**

TÍTULO DEL ESTUDIO: Evaluación radiografica inicial y clinica de péptidos en capsíde en órganos dentarios con necrosis pulpar.

PATROCINADOR DEL ESTUDIO: UABC, UNAM

INVESTIGADOR: Michael J. Dely, Fermin Nunez

LUGAR DONDE SE LLEVARÁ A CABO EL ESTUDIO: Tijuana, Baja California

NÚMEROS DE TELÉFONOS ASOCIADOS AL ESTUDIO:

6641662201, 6462036097

Este formulario de consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pregunte al investigador o a cualquier personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que usted no entienda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este formulario de consentimiento para pensar sobre su participación en este estudio o para discutirlo con la familia o amigos antes de tomar su decisión.

I- INTRODUCCIÓN

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación. Antes de que usted decida participar en el estudio por favor lea este formulario cuidadosamente y haga todas las preguntas que tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y beneficios.

II- PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

Evaluar la acción antimicrobiana de los péptidos en capsíde como medicación intraconducto en órganos dentarios con necrosis pulpar.

1-Pacientes con presencia de necrosis pulpar crónica en órganos dentarios#36,#46.

2-Edad de 9 a 65 años.

3-Firmar el consentimiento informado.

4-No estar inmunodeprimido (patología agregada)

III- PARTICIPANTES DEL ESTUDIO:

¿Quién puede formar parte de este estudio?

Incluya criterios generales elegibilidad y exclusión de participantes.

Criterios de inclusión

- 1-Pacientes con presencia de necrosis pulpar crónica en órganos dentarios#36,#46.
- 2-Edad de 9 a 65 años.
- 3-Firmar el consentimiento informado.
- 4-No estar inmunodeprimido (patología agregada)

Criterios de exclusión

- 1-Pacientes embarazadas.
- 2-Pacientes que hayan estado en tratamiento de farmacoterapia.
- 3-Pacientes con necrosis pulpar aguda.
- 4-Pacientes con presencia de fracturas o fisuras.
- 5-Pacientes que no quieran firmar el consentimiento informado

Criterios de eliminación

- 1-Pacientes que no concluyan su tratamiento.
- 2-Mal manejo de la muestra.

¿Cuántas personas se espera que participen en este estudio?

15

IV- PROCEDIMIENTOS:

¿Qué exactamente me harán en este estudio?R= se seguirán los protocolos normales de un tratamiento de conductos, se tomara muestra bacteriana mediante un lavado con 3ml de solución salina en la 1er cita y en la 2da cita, se tomaran radiografías de seguimiento en la 1er cita, , 7 días, 1 mes, 2 mes , 3mes.

¿Cuáles serán los procedimientos de investigación en los que participaré si decido entrar en el estudio?

En la toma de muestra y en la toma de radiografías

¿Cuánto tiempo me tomará participar en este estudio?

3 meses

¿Cuándo terminará mi participación?

3 meses

V-RIESGOS O INCOMODIDADES:

Incluya la información acerca de todos los riesgos o incomodidades pertinentes al estudio, medicamentos, instrumentos o procedimientos que va a utilizar. Incluya los efectos adversos que se conozcan y si aplica, incluya información de que puede haber efectos adversos que son desconocidos a este momento.

Incluya los riesgos de otros procedimientos si es necesario, especialmente de cualquier procedimiento invasivo.

VI- BENEFICIOS

Es probable que usted no reciba ningún beneficio personal por participar en este estudio. Su enfermedad, condición, síntomas] podrían mejorar como resultado de su participación en este estudio, aunque no hay ninguna garantía de que esto suceda. La información de este estudio de investigación podría conducir a un mejor tratamiento para el futuro de esta [enfermedad, condición, síntomas]

Además el tratamiento de conductos le costara solo 540pesos y obtendrá la restauración postendodontica de primera fase gratuitamente.

VII- SE PRECISA LA VOLUNTARIEDAD EN LA PARTICIPACIÓN. En cualquier momento el paciente podra desistir de participar en la investigacion. Se puntualiza la retirada voluntaria

VIII- COSTOS

He leído y me han explicado los lineamientos que involucra ser parte de una investigacion, por lo que autorizo participar en la misma como paciente

Nombre y firma del paciente:

Nombre y firma de padre o madre en caso de ser menor de edad

Nombre y firma del 1er testigo

Nombre y firma de 2do testigo

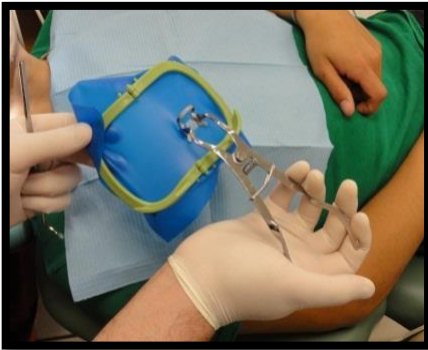
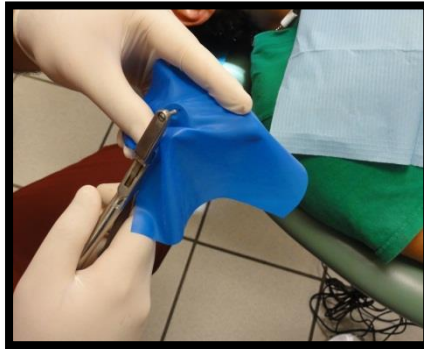
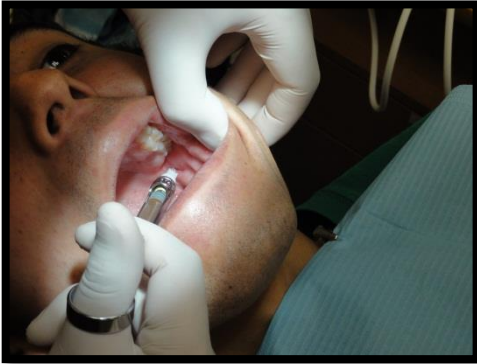
Fecha:_____

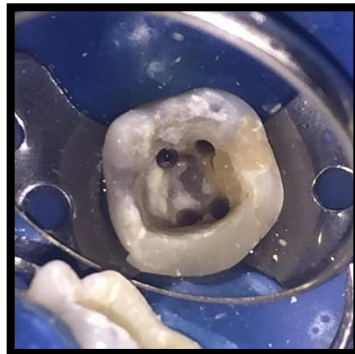
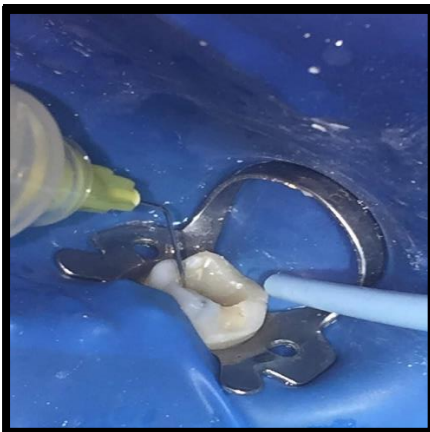
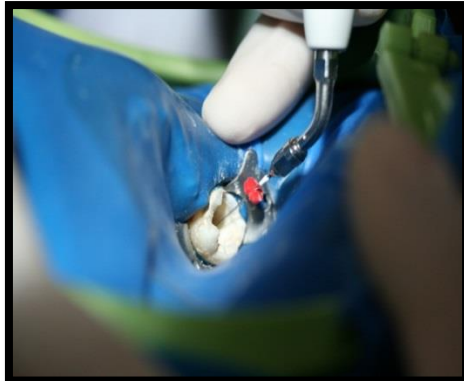
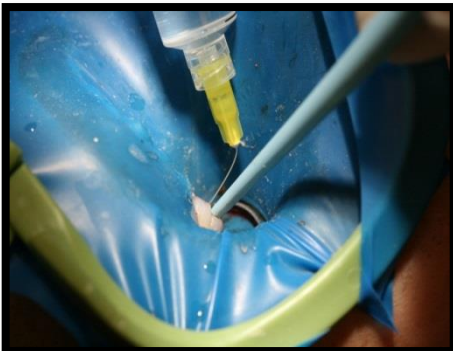


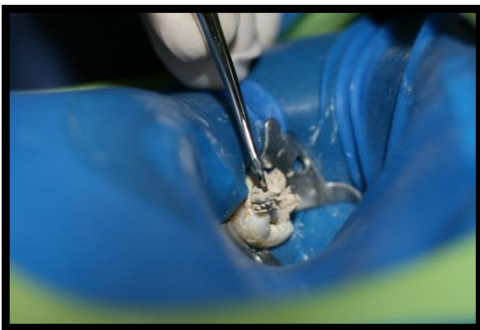
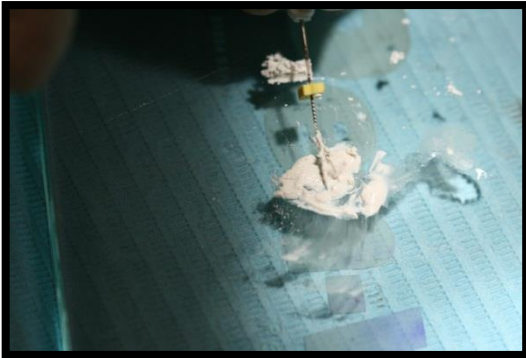
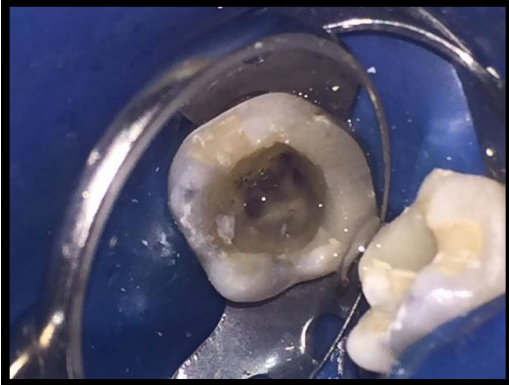
Anexo 3 Cuadro de observaciones por variable de interés

	Incubador a 24hrs	Observac ión de la muestra 24 hrs	Observac ión de la muestra 48 hrs	Observaci ón de la muestra 168hrs	Unidades formadora s de colonias	Densidad óptica
Grupo control: irrigación ultrasónic a pasiva						
Hidroxido de calcio en pasta						
Peptidos en capside en pasta						

Anexo 4 **Fotografías del protocolo clínico**







Referencias bibliográficas

1. Kakehashi S SH, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1965;20:340-9.
2. Wu M, Dummer P, Wesselink P. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006(39):343-56.
3. G S. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992;18(9):427-30.
4. Ricucci D, Siqueira J, Bate A, Ford TP. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2009(35):493-502.
5. Tao R, ZTong, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides.* 2011;32(8):1748–54.
6. Winfred S, Meiyazagan G, Panda J, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan V, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent.* 2014;8(2):254-60.
7. Costerton J, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Microbial biofilms *J Bacteriol* 1995;49(7):11-45.
8. Siqueira JJ, . IR. 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):870-80.
9. Siqueira J, Rocas I. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:291-301.
10. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics.* 2004(9):27-36.
11. Chavez-de-Paz L. Redefining the persistent infection in root canals: posible role of biofilm communities. *J Endod* 2007(33):652-62.
12. Clegg M, Vertucci F, Walker C, Belanger M, Britto L. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006(32):434-7.
13. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22.
14. Khemaleelakul S, Baumgartne J, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006(32):312-8.
15. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996(44):79-87.
16. Costerton J, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* *J Bacteriol* 1994(176):2137-42.
17. Costerton J. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001(9):50-2.
18. Nair P, 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(32):312-52.

19. Khemaeelakul S, Baumgartner J, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006(32):312-8.

20. Costerton J, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994(176):2137-42.

21. Sena N, Gomes B, Vianna M, Berber V, Zaia A, Ferraz C, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006(39):878-85.

22. Abdullah M, Gulabivala K, Moles D, Spratt D. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005(31):30-6.

23. George S, Kishen A, Song K. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005(31):867-72.

24. Distel J, Hatton J, Gillespie M. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002(28):689-93.

25. Peters L, Wesselink P, Moorer W. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995(28):95-9.

26. 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.

27. Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, . DØ. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod* 2009(35):46-9.

28. Costerton J, Cheng G, Gersey T, Ladd J, Nickel M. Bacterial biofilms in nature and disease. *Microbiol.* 1987(41):435-64.

29. Siqueira J, Rôças I. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research* 2009;88:969-81.

30. Medicación Intraconducto Empleada en la Terapia Endodóntica de Dientes con Necrosis Pulpal [Internet]. 1998.

31. Weber C, McClanahan S, Miller G, Diener-West M, Johnson J. 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.

32. Gomes B, Sato E, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Filho FS-. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003;29(9):604-9.

33. 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.

34. Walton R, Holton I, Michelich R. Calcium hydroxide as an intracanal medication: effect on posttreatment pain. *J Endod.* 2003;29(10):627-9.

35. Behnen M, West L, Liewehr F, Buxton T, JCMcPherson. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod.* 2001;27(12):765-7.

36. Fava L, Saunders W. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999;32(4):257-82.
37. Solak H, Oztan M. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehabil*. 2003;30(4):436-9.
38. Wadachi R, Araki K, Suda H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. *J Endodon*. 1998;24:326-30.
39. Estrela C, Rodrigues-de-Araújo C, Bammann LLL, Pecora J. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod*. 2001;27(12):720-3.
40. Bezerra L, Leonardo M, Faccioli L, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod*. 1997;23:86-90.
41. Torres C, Apicella M, Yancich P, Parker M. Intracanal placement of calcium hydroxide: a comparison of techniques, Revisited. *J Endod*. 2004;30(24):225-7.
42. Nerwich A, Figdor D, Messer H. Ph changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993;19(6):302-6.
43. Batoni G, Maisea G, Brancatisano F, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: Advantages and limits. *Curr Med Chem*. 2011;18:256-79.
44. Yildiz I, Shukla S, Steinmetz N. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;22:901-8.
45. Ulrich H.N. Dürr, U.S. Sudheendra, Ayyalusamy Ramamoorthy, Review LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 1408–1425
46. Keren I. Hulkower * and Renee L. Herber, Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery, Platypus Technologies, LLC, 5520 Nobel Drive, Suite 100, Madison, WI 53711, USA, ISSN 1999-4923
47. Perchyonok, V.T.; Zhang, S.; Oberholzer, T. Chitosan and gelatin based prototype delivery systems for the treatment of oral mucositis: From material to performance in vitro. *Curr. Drug. Deliv*. 2013, 10, 144–150.
48. Nair, A.B.; Kumria, R.; Harsha, S.; Attimarad, M.; Al-Dhubiab, B.E.; Alhaider, I.A. In vitro techniques to evaluate buccal films. *J. Control. Release* 2013, 166, 10–21.
49. Chapple, I.L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol*. 1997, 24, 287–296.
50. Fenton, H.J.H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans*. 1894, 65, 899–910.