



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ACONDICIONAMIENTO DE DENTINA RADICULAR CON UN
COMPUESTO DE GEL DE QUITOSANO Y PÉPTIDOS
DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS CAP Y CEMP1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MILDRED JONGUITUD BERNAL

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA

ASESOR: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Esp. RICARDO WILLIAMS VERGARA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

*A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, siempre fue mi más grande sueño poder estudiar aquí; gracias por brindarme tantas oportunidades de aprendizaje a lo largo de ocho años y formarme profesionalmente.*

*Al **Dr. Gonzalo Montoya**, por su tiempo, apoyo, paciencia, orientación y darme la oportunidad de conocer el área de investigación de odontología. Admiro su profesionalismo y dedicación.*

*A la **Dra. Myriam Martínez** y al **Esp. Ricardo Williams**, por asesorarme y compartir conmigo sus conocimientos y técnicas de trabajo para lograr concluir este proyecto de manera exitosa.*

A los miembros del laboratorio de Biología Periodontal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

*A la **Mtra. Irma E. López**, por la paciencia y atención para la observación en el microscopio Electrónico de barrido, de la Unidad de Microscopía. Facultad de Medicina, UNAM.*

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, **Clave: IA206522, IN206723.**

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

*A mis papás; **Liliana** y **Fidel**, por ser mi motivación y apoyar todos mis sueños desde pequeña. Son las personas más maravillosas y amorosas; este logro también es de ustedes, gracias por ser mis primeros pacientes, por creer en mí y siempre impulsarme a dar mi máximo esfuerzo. Los amo infinitamente.*

*A mi hermano **Carlos**, por cuidarme, quererme y siempre hacerme reír cuando el estrés me gana. Te amo mucho y eres el mejor compañero que la vida pudo darme.*

*A mi **Kofy**, por acompañarme en las noches de desvelo, animarme todos los días y recibirme con tanta felicidad y amor al llegar a casa después de un día difícil.*

*A mi **familia**, por confiar en mí, por permitirme iniciar mis prácticas profesionales con ustedes y por ser los mejores pacientes; especialmente agradezco a mi tía **Fabiola**, por acompañarme y darme su apoyo incondicional toda mi vida, te quiero demasiado.*

“La flor que florece en la adversidad es la más rara y hermosa de todas.”

Mulan

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
I. ANTECEDENTES.....	6
Tratamiento de conductos radiculares	
Preparación biomecánica	
Irrigantes	
Contaminación de conductos radiculares	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
Quitosano	
Proteínas CAP y CEMP1	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. HIPÓTESIS.....	11
V. OBJETIVO GENERAL.....	12
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
VII. METODOLOGÍA.....	13
Síntesis de péptidos	
Preparación de hidrogel de quitosano	
Preparación y tratamiento de las muestras de dentina radicular	
Ensayo mineralización	
Ensayo microbiológico	
VIII. RESULTADOS.....	15
IX. DISCUSIÓN.....	26
X. CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

El éxito del tratamiento de conductos radiculares se debe a un conjunto de factores que involucra el correcto manejo de la preparación biomecánica, de la irrigación, desinfección y la obturación de cada conducto. El principal objetivo de este tratamiento es eliminar el tejido pulpar que ha sufrido un daño irreversible: la dentina afectada, pulpa, desechos necróticos y los microorganismos; así como también ensanchar el conducto con la finalidad de prepararlo para ser obturado y generar un sellado apical adecuado. Durante la preparación biomecánica se puede generar una capa de barrillo dentinario que no permite la propagación de los medicamentos intraconductos hacia los túbulos dentinarios. Por lo tanto, es indispensable seleccionar los irrigantes que permitan la correcta desinfección y eliminación del barrillo dentinario que den lugar a conductos radiculares limpios, lisos y listos para su correcta obturación.¹

Hoy en día, el sistema de irrigación más efectivo es la combinación de una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración de 2.5 - 5%, el cual permite disolver los compuestos orgánicos, y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que es un agente quelante, que se usa normalmente a una concentración de 10 - 17%, ideal para eliminar la parte inorgánica; por lo que su combinación genera una mejor limpieza de los conductos radiculares y eliminar la capa de barrillo dentinario.¹ La dentina posee una red de anastomosis de túbulos dentinarios secundarios que fomenta el movimiento de fluidos y la entrada de contaminantes, e incluso microorganismos como *Enterococcus faecalis*. Todos estos factores, facilitan la degradación progresiva de la colágena, y aumentan la susceptibilidad a fracturas e infecciones recurrentes.²

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del acondicionamiento de la dentina radicular mediante el empleo de un hidrogel de quitosano (0.2%) combinado con un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento (CAP) y uno derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1). Estos estudios se realizaron mediante ensayos de microbiología y mineralización, con ayuda de perfilometría y microscopía electrónica de barrido. Los resultados obtenidos muestran que hay una actividad antimicrobiana en las superficies de dentina radicular tratadas con hidrogel de quitosano y las que se trataron con el hidrogel y los péptidos bioactivos; así como el sellado de túbulos dentinarios, generando una superficie homogénea del conducto; también encontramos precipitados debido a la combinación del hidrogel con CAPp-15.

ANTECEDENTES

El fracaso endodóntico se relaciona directamente con persistencia de bacterias en los conductos y el ápice, además de una deficiente calidad de las obturaciones realizadas³, ambas causas relacionadas con las variaciones anatómicas de los conductos radiculares, ya que pueden dificultar la limpieza y la correcta preparación biomecánica de los conductos radiculares. Por ello, se han desarrollado diferentes técnicas para poder cumplir con la llamada tríada endodóntica, la cual se compone de: asepsia, preparación biomecánica y el sellado apical; si alguna de estas no es realizada de manera correcta el tratamiento terminará fracasando. La preparación biomecánica adecuada del conducto radicular consiste en la total eliminación de la dentina que ha sido dañada, así como la pulpa, los microorganismos y la capa de barrillo dentinario que se encuentren en el mismo, y de esta forma acondicionarlo para poder incorporar el material de obturación que permita el sellado hermético. La presencia de la capa de barrillo dentinario podría evitar la difusión de los medicamentos intraconductos hacia las irregularidades del conducto y los túbulos dentinarios; además de no permitir la correcta adaptación de los materiales de obturación.¹ La eliminación del barrillo dentinario es posible mediante la utilización de irrigantes, como la combinación de una solución de hipoclorito de sodio, capaz de eliminar de compuestos orgánicos, y EDTA que elimina el componente inorgánico.¹

En el tratamiento de conductos radiculares, podemos realizar la preparación biomecánica con instrumentos manuales o rotatorios; con los instrumentos rotatorios, se logran tratamientos más eficaces, debido a su capacidad para recolectar y eliminar los desechos; además, al generar una rotación continua, se reduce el tiempo de instrumentación y ayuda a preparar el conducto de manera más segura.⁴ La aleación níquel-titanio (NiTi) es la opción ideal o de primera elección en la selección de instrumentos rotatorios para el tratamiento de conductos, ya que cuenta con características físicas importantes como ductilidad, maleabilidad y superelasticidad que le permiten volver a su forma después de una deformación significativa, además poseen resistencia a la deformación; diferenciándolo de otros metales como el acero inoxidable. El uso de estos instrumentos rotatorios de NiTi reduce el tiempo de trabajo; así como también, el riesgo de fractura dentro de los conductos con variaciones en la morfología radicular, pues estas limas siguen la ruta original del canal, especialmente en los conductos más curvos. A pesar de que los instrumentos rotatorios proporcionan una mayor eficacia en la limpieza de los conductos en comparación con las limas manuales convencionales, es importante tener cuidado de no provocar un evento adverso.⁵

Durante la conformación de los conductos radiculares, se forman capas tejido dental orgánico e inorgánico denominado barrillo dentinario; el cual, puede evitar la eliminación de los microorganismos e incluso dificultar la obturación final. Por tanto, su eliminación es de vital importancia para alcanzar un tratamiento de conductos exitoso, con la correcta desinfección de los conductos radiculares y tener una obturación hermética.⁶ Actualmente, el uso del EDTA como solución de irrigación, se basa en su capacidad quelante, incluso, su empleo ha demostrado tener la capacidad de incrementar la permeabilidad y limpieza de canales radiculares laterales y accesorios.² La acción del EDTA, en un rango de concentración de 15 al 18% y en un tiempo de aplicación de 1 a 5 minutos, se considera el principal agente quelante en endodoncia, ya que favorece la remoción de tejido inorgánico, permitiendo eliminar exitosamente el barrillo dentinario. Además del EDTA, se sugiere el empleo de una solución de hipoclorito de sodio, para remover el tejido orgánico.^{7,8} La solución de hipoclorito de sodio en una concentración del 2.5 a 5%, es el principal irrigante recomendado durante la preparación biomecánica debido a su capacidad para disolver tejidos orgánicos, además de poseer un importante efecto antimicrobiano.^{1,6,9} A pesar de que la solución de hipoclorito de sodio es el irrigante más empleado para la preparación y desinfección de los conductos radiculares, no logra eliminar, en su totalidad, todos los microorganismos; por lo cual, se han descrito diferentes protocolos donde se combinan diferentes irrigantes logrando disminuir la cantidad de bacterias intraradiculares. Desafortunadamente, se ha reportado la presencia de ciertos microorganismos asociados a infecciones recurrentes y han sido señalados como responsables de la mayoría de los fracasos del tratamiento endodóntico. Tal es el caso de *E. faecalis*, bacteria Gram positiva que puede penetrar los túbulos dentinarios y sobrevivir en condiciones nutricionales extremas. Esta bacteria ha demostrado ser capaz de formar biopelículas altamente resistentes a los irrigantes convencionales.¹⁰

Enterococcus faecalis

El género bacteriano *Enterococcus*, suele encontrarse como células únicas, en pares o en cadenas, son bacterias anaerobias facultativas, lo que implica que pueden crecer y desarrollarse con o sin la presencia de oxígeno; además, se caracterizan por ser resistentes a detergentes, etanol y a la desecación.¹¹ La presencia de *Enterococcus faecalis* es comúnmente frecuente en pacientes que tienen antecedentes endodónticos, ya sea un primer tratamiento de conductos, a la mitad o con un retratamiento de conductos.¹¹ Este microorganismo está muy asociado con las infecciones perirradiculares (infecciones endodónticas primarias), en periodontitis perirradicular aguda o abscesos agudos; pero también con infecciones endodónticas persistentes. *E. faecalis* puede penetrar los túbulos dentinarios y tiene la capacidad de formar biopelículas complejas que le proporcionan

nutrientes y protección a las células bacterias, aumentando su resistencia; e incluso, cuenta con la capacidad de anular la acción de los linfocitos. Del 4 a 40% de las infecciones endodónticas primarias está directamente relacionada con la persistencia de *E. faecalis* en los conductos radiculares, mientras que el porcentaje de *E. faecalis* en lesiones perirradiculares persistentes es mucho mayor, los casos de fracaso en tratamientos de conductos son 9 veces más probables de que este microorganismo sea el causante.^{11,12} Por lo anterior, se han llevado a cabo numerosos estudios para encontrar compuestos químicos que además sean biocompatibles y que al combinarlos con diferentes estrategias metodológicas permitan un tratamiento endodóntico exitoso.

El quitosano es un copolímero que se obtiene de la desacetilación de la quitina y está compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Es un compuesto no tóxico, estable, esterilizable, biocompatible, que ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes y hemostáticas.¹² Se ha reportado que debido a su carga positiva que le permite acumularse en las paredes celulares de las bacterias tiene propiedades bactericidas y bacteriostáticas. Además, debido a su versatilidad ha sido empleado para la síntesis de andamios rígidos, películas e hidrogeles, de forma que ha demostrado ser un agente ideal para múltiples aplicaciones.^{13,14} Particularmente, los hidrogeles de quitosano actúan como una red de cadenas que son utilizados como agentes que permiten la liberación controlada de diferentes fármacos y elementos terapéuticos como factores de crecimiento y secuencias peptídicas. En el área odontológica, el quitosano es empleado en tratamientos quirúrgicos como apicectomías cuando el tratamiento de conductos fracasa, en regeneración periodontal, en estomatitis subprotésica, entre otras. Es altamente útil en lesiones inflamatorias y ulcerosas en la cavidad bucal, así como para combatir ciertos patógenos como el caso de *Enterococcus faecalis*; sin embargo, su efectividad depende de factores como pH que está íntimamente relacionada con su concentración¹⁵; es por ello que se ha utilizado como irrigante en concentraciones del 0.1 - 3%. Si bien, el quitosano representa una adecuada alternativa como auxiliar en la ingeniería de tejidos, se han incorporado pequeñas moléculas como aminoácidos o péptidos para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, mucoadhesión y solubilidad, para brindar mayor seguridad y eficacia en su uso.¹⁴⁻¹⁶

El cemento radicular es un tejido mineralizado que recubre la raíz del diente; el estudio de su matriz extracelular ha permitido identificar dos proteínas: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP); específicamente, estas proteínas han demostrado jugar un papel importante en los procesos de biomineralización, debido a su capacidad para promover la formación y crecimiento de cristales de apatitas con importancia biológica.¹⁶⁻¹⁹ Estudios realizados en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, han demostrado que la proteína del cemento 1 (CEMP1) juega un papel muy importante durante la cementogenesis; promueve la migración, proliferación y diferenciación de células del ligamento periodontal; es capaz de activar vías de señalización e inducir la expresión de proteínas que participan en el proceso de biomineralización. Es una proteína compuesta de 247 aminoácidos, glicosilada, fosforilada y termoestable, que ha demostrado tener la capacidad de regular la composición y morfología de los cristales de hidroxapatita (**Tabla 1**).¹⁹⁻²³

10	20	30	40	50
MGTSSTDSQQ	AGHRRRCSTSN	TSAENLTCLS	LPGSPGKTAP	LPGPAQAGAG
60	70	80	90	100
QPLPKGCAAV	KAEVGIPAPH	TSQEVRIHIR	RLLSWAAPGA	CGLRSTPCAL
110	120	130	140	150
PQALPQARPC	PGRWFFPGCS	LPTGGAQTIL	SLWTWRHFLN	WALQQREENS
160	170	180	190	200
GRARRVPPVP	RTAPVSKGEG	SHPPQNSNGE	KVKTITPDVG	LHQSLTSDPT
210	220	230	240	
VAVLRAKRAP	EAHPPRSCSG	SLTARVCHMG	VCQGQGDTE	GRMTLMG

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de la proteína CEMP1

Por otro lado, la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) fué la primera proteína aislada del cemento radicular. El gen que codifica a esta proteína se localiza en el brazo corto del cromosoma 10, en la región 13-14. Este gen durante los procesos de transcripción origina, gracias a un splicing, dos isoformas: la proteína 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1 o HACD1, la cuál está formada por 288 aminoácidos y participa en el metabolismo de los lípidos, y la otra isoforma, denominada CAP, constituida por 140 aminoácidos y donde los últimos 15 aminoácidos de esta proteína marcan la diferencia entre las dos isoformas (**Tabla 2**). La proteína CAP se expresa en cementoblastos, en algunas poblaciones de células del ligamento periodontal, en células del folículo dental, promoviendo la diferenciación y adhesión de las mismas. Además, las células periodontales crecidas, *in vitro*, en presencia de CAP son capaces de formar tejido

mineralizado. Estudios en sistemas libres de células, han demostrado que tiene la capacidad de promover la formación de cristales de hidroxiapatita y, en estudios *in vivo* promueve la formación de tejido óseo *de novo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata y tibias de conejo. ^{18,20,24,25}

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	
KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE VSFPS	CCFSIAVIFM	

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína CAP

Los estudios recientes con estas proteínas han permitido identificar pequeñas secuencias aminoacídicas (péptidos bioactivos) con la capacidad de mimetizar algunas de sus funciones. Los péptidos bioactivos han tomado gran relevancia en su aplicación biomédica, ya que nos brindan ventajas importantes en comparación a las proteínas: son más específicos, poseen mayor estabilidad físico-química, se sintetizan con mayor facilidad en comparación con las proteínas, son más económicos y menos inmunogénicos. ^{19,25-28} Con base en lo anterior, el péptido 15 derivado de la proteína CAP (CAP-p15) es una secuencia constituida por los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo de CAP; marcados en negritas en (**Tabla 2**) (VSFPSCCFSIAVIFM). Se ha reportado que este péptido bioactivo tiene una gran afinidad por la hidroxiapatita, promoviendo su formación y crecimiento en un sistema libre de células y promover la formación de hidroxiapatita carbonatada en superficies de TiO₂ biofuncionalizadas con esta secuencia peptídica. Además, se ha demostrado que juega un papel importante en el proceso de biomineralización; ya que, es capaz de inducir la formación de cemento radicular y hueso en modelos *in vivo*. ^{20,27,28} Por otro lado el péptido 3 de la proteína del cemento (CEMP1-p3), está formado por 20 aminoácidos; marcados en negritas en (**Tabla 1**) (QPLPKGCAAVKAEVGIPAPH). Se ha demostrado que este péptido CEMP1-p3, tiene una alta afinidad por los cristales de fosfato octacálcico (OCP) y promueve su transformación cristalina hacia hidroxiapatita, esta capacidad podría estar asociada a que cuenta con una estructura secundaria en forma de doble hélice, donde el grupo imidazol de la histidina es capaz de funcionar como donador de electrones hacia la superficie de hidroxiapatita en un ambiente fisiológico. ^{21,25,27,28}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El éxito del tratamiento endodóncico depende de la limpieza integral y la conformación del sistema de conductos radiculares. Durante el tratamiento del conducto radicular, se puede dejar sin preparar más del 35% de la superficie del conducto, aún con la ayuda de tecnología avanzada; por lo que, es fundamental contar con un adecuado sistema de irrigación. El principal objetivo de los irrigantes durante el tratamiento de conductos es que con el manejo químico y mecánico tengamos como resultado conductos radiculares limpios, desinfectados, lisos y listos para su correcta obturación. Hoy en día, se han desarrollado diversas estrategias como el uso de agentes químicos, ultrasonidos y láser con la finalidad de lograr la completa limpieza que no se realiza con la preparación biomecánica. Sin embargo, los agentes químicos empleados pueden generar la disolución irreversible e inespecífica de la dentina, que la hace susceptible a filtraciones, fracturas y a la colonización de microorganismos como *E. faecalis* que comprometen el éxito del tratamiento.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Debido al problema que genera la contaminación de conductos por *Enterococcus faecalis*, la biomineralización es una estrategia efectiva para el acondicionamiento de la dentina radicular con la finalidad de recuperar las características fisicoquímicas de la dentina. En este trabajo se plantea el uso de un péptido derivado de la proteína CAP (CAPp-15) y un péptido derivado de CEMP1 (CEMP1-p3), que han demostrado promover la formación y crecimiento de cristales de HAp; combinado con un hidrogel de quitosano que ha demostrado tener propiedades antimicrobianas, y podría brindar el beneficio adicional de eliminar las bacterias que persisten dentro de los conductos radiculares después de los procedimientos de limpieza y modelado.

HIPÓTESIS

El empleo independiente del hidrogel de quitosano, así como de los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15 con el hidrogel de quitosano promoverán la formación de minerales y tendrán un efecto inhibitorio en la adhesión y formación de biopelícula extracelular de *E. faecalis* en la superficie dentinaria intraconducto.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p3 en un hidrogel de quitosano en el acondicionamiento de dentina radicular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la dentina radicular acondicionada con el empleo individual de los péptidos derivados de CAP-p15 y CEMP1-p3 en un hidrogel de quitosano.
- Determinar el efecto del hidrogel de quitosano en una concentración del 0.2% sobre la dentina radicular incubada en una solución fisiológica simulada.
- Determinar el efecto del péptido derivado de CAP-p15 en un hidrogel de quitosano sobre la dentina radicular incubada en una solución fisiológica simulada.
- Determinar el efecto del péptido derivado de CEMP1-p3 en un hidrogel de quitosano sobre la dentina radicular incubada en una solución fisiológica simulada.
- Evaluar la eficacia del hidrogel de quitosano a una concentración del 0.2% sobre la formación de biopelícula producida por *E. faecalis* sobre la dentina radicular.
- Evaluar la eficacia del péptido derivado de CAP-p15 en un hidrogel de quitosano sobre la formación de biopelícula producida por *E. faecalis* sobre la dentina radicular.
- Evaluar la eficacia del péptido derivado de CEMP1-p3 en un hidrogel de quitosano sobre la formación de biopelícula producida por *E. faecalis* sobre la dentina radicular.

METODOLOGÍA

Péptidos bioactivos

La síntesis de los péptidos bioactivos seleccionados se llevó a cabo a partir de la técnica de Sheppard por fase sólida (Fmoc), el grado de pureza (>90%) se determinó a partir de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La síntesis de los péptidos se solicitó a la casa comercial New England Peptide (NEP, Ipswich, MA, EUA). Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos bioactivos seleccionados se obtuvieron a partir del análisis *in silico*.

Preparación de hidrogel de quitosano

Se preparó un hidrogel disolviendo quitosano (310-375 KDa y 75% de desacetilación, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en ácido acético al 1%, se dejaron en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 hrs y obtuvimos una solución homogénea de 0.2% (p/v). Al hidrogel se le agregó 200 µg de cada uno de los péptidos biofuncionales.

Preparación de muestras de dentina radicular

Se eligieron dientes premolares extraídos con fines ortodóncicos con una raíz recta, que estuvieran libres de caries en la superficie radicular, y que el ápice del diente se estuviera completamente cerrado. Se excluyeron las muestras molares y premolares multirradiculares, con grietas o fracturas radiculares, conductos curvos, con tratamiento de conducto radicular previo, con reabsorción radicular o presencia de calcificación. A las muestras radiculares se les realizó un corte a nivel de la corona clínica para obtener raíces de 14 mm de longitud. Las raíces se instrumentaron con iRace R1#15.06, R2#25.04, R3#30.04; con un torque de 1.5 Ncm y una velocidad de 600 rpm (FKG, Suiza) para simular el retratamiento (ensanchamiento de los conductos a 35/40 mm). Los canales radiculares se irrigaron con lavados de EDTA al 17% y NaOCl al 2.5% (6 mL) alternando entre cada instrumentación, y un último lavado con EDTA al 17% (1 mL). Todo el protocolo de irrigación se combinó con ultrasonido instrumentando con U files; ISO 25, (NSK pack of 6, Kanuma City Tochigi, Japón).

Tratamiento de las muestras de dentina radicular

Las raíces se seccionaron para obtener el tercio medio de la raíz (aproximadamente 15 mm), el tercio cervical y el tercio apical se descartaron del estudio. A los discos obtenidos del tercio medio de la raíz, se les realizaron surcos longitudinales en las superficies bucolinguales utilizando un disco de diamante sin penetrar el canal, luego se dividieron con un cincel. Las muestras seccionadas en 2 mitades se esterilizaron en autoclave. Las muestras obtenidas se agruparon de manera aleatoria en 4 grupos (n=10). G1, grupo control que consistió en muestras sin tratamiento; G2, muestras con la aplicación del hidrogel de quitosano al 0.2%; G3, consistió en el tratamiento con hidrogel de quitosano al 0.2% adicionado con 200 µg de CEMp1-p3 ; G4, fué el grupo tratado con hidrogel de quitosano al 0.2% adicionado con 200 µg de CAP-p15.

Ensayos de mineralización

A las muestras de los grupos G2-4 se agregaron 10 µl del hidrogel, correspondiente a cada grupo, dejando desecar a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, todas las muestras fueron sumergidas en 3ml de una solución fisiológica simulada (MgCl₂ 0.2 mM, CaCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 4 mM, KCl 16 mM, NH₄Cl 4.5 mM en buffer HEPES 20mM con un pH de 7) y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 10 días. Durante el periodo de incubación, se realizaron 3 cambios de solución, en cada cambio de solución se agregaron 10 µl del hidrogel. Al terminar el periodo de incubación, las muestras se lavaron con agua desionizada por 50 seg y se desecaron a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Ensayos microbiológicos

Se incluyeron 16 muestras en total para los cuatro grupos ya establecidos (n=4), las cuales se esterilizaron mediante luz UV durante una hora, posteriormente, se agregó un total de 30µl del hidrogel correspondiente a cada grupo y dejamos desecar a temperatura ambiente.

A partir de un cultivo de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)), se preparó una suspensión estándar en medio de cultivo líquido infusión cerebro-corazón (BHI) en la que se obtuvieron 1x10⁹ células/mL. La concentración bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.1 (a 600 nm). Para la realización de la infección del tejido dentinario se siguió, con algunas modificaciones, el protocolo reportado por Del Carpio-Perochena et al.²⁹ En breve, cada muestra se colocó individualmente en un tubo de centrifuga de 1.5 ml y se inoculó con 500µl de suspensión de *E. faecalis*. Los tubos fueron centrifugados 4 veces durante 5 minutos a 5,000g para facilitar

la penetración bacteriana. Posterior a cada ciclo de centrifugación, las superficies radiculares fueron adicionadas con 100µl de la suspensión de células frescas. Posteriormente, cada muestra fue incubada individualmente bajo agitación constante a 37°C durante 24 horas. Después del período de infección, las muestras se lavaron con 1 mL de agua destilada para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente, las muestras infectadas (n=3) con *E. faecalis* fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido. Cada experimento se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estándar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad Prism TM.

RESULTADOS

Péptidos bioactivos

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos bioactivos evaluados en el presente estudio se determinaron con ayuda de las herramientas ExPasy y Scansite. CEMP1-p3 es una secuencia de 20 aminoácidos que se localiza a partir del aminoácido 51-69 de la secuencia de la proteína completa; es un polipéptido hidrofílico con un peso molecular teórico de 1.98 kDa, y un punto isoeléctrico alcalino que al encontrarse en un medio fisiológico adquiriría una carga positiva, es una molécula hidrofílica.^{21,25,27} Por otro lado, el péptido CAP-p15 es una secuencia de 15 aminoácidos que podría adquirir una carga negativa en condiciones fisiológicas de acuerdo a su naturaleza acídica, tiene un peso molecular de 1.65 kDa y un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.48; lo que nos indica que este péptido tiene una carga negativa cuando está presente en una disolución a un pH fisiológico (pH ~7.4).^{20,27,28} El hidrogel de quitosano (0.2%), se combinó de manera independiente con CEMP1-p3 y CAP-p15, obteniendo soluciones homogéneas a pesar de las diferencias hidrofílicas de ambas secuencias peptídicas. **(Tabla 3)**

Péptido	CEMP1-p3		CAP-p15	
Secuencia	QPLPKGCAAVKAEVGIPAPH		VSFPSCCFSIIVIFM	
Aminoácidos	20		15	
Polaridad	Polares	Apolares	Polares	Apolares
	Sin carga: Q-C Positivos: K-H Negativos: E	P-L-G-A-V-I	Sin carga: S-C	V-F-P-I-A-M
Peso Molecular	1.98kDa		1.65kDa	
Punto Isoeléctrico	8.21		5.48	
	Hidrofílico		Hidrofóbico	

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15, a través de ExPasy y Scansite.

El tratamiento de conductos de todas las muestras se realizó con ayuda de dos irrigantes alternados entre las instrumentaciones (EDTA al 17% y la solución de hipoclorito de Sodio al 2.5%). El protocolo endodóntico establecido en este trabajo nos permitió contar con muestras libres de tejido orgánico y de barrillo dentinario, lo cual fue corroborado con el microscopio estereoscópico. Dicho análisis nos permitió observar, analizar y realizar una selección de las muestras a emplear para los ensayos de mineralización y microbiológicos.



Figura 1. Microfotografía del tercio medio de la raíz donde se aprecia el conducto bien delimitado y limpio.

Evaluación de las superficies radiculares acondicionadas con cada uno de los grupos experimentales (G2, G3, G4), además de las superficies control (G1), mediante perfilometría.

Mediante el análisis de perfilometría (**Figura 2**) podemos observar que todas las muestras presentan una profundidad promedio de $31.4\mu\text{m}$, dicha profundidad del hemiconducto fue similar en todos los grupos de estudio. Al llevar a cabo el análisis de la rugosidad de los conductos podemos observar que las muestras de G2 y G3 muestran superficies con rugosidad muy similares entre sí. Dicha homogeneidad puede corroborarse en las imágenes tridimensionales; sin embargo, particularmente las muestras de G4 muestran diferencias importantes en su topografía, que pudiera estar asociado a la presencia de esta secuencia peptídica de naturaleza hidrofóbica.

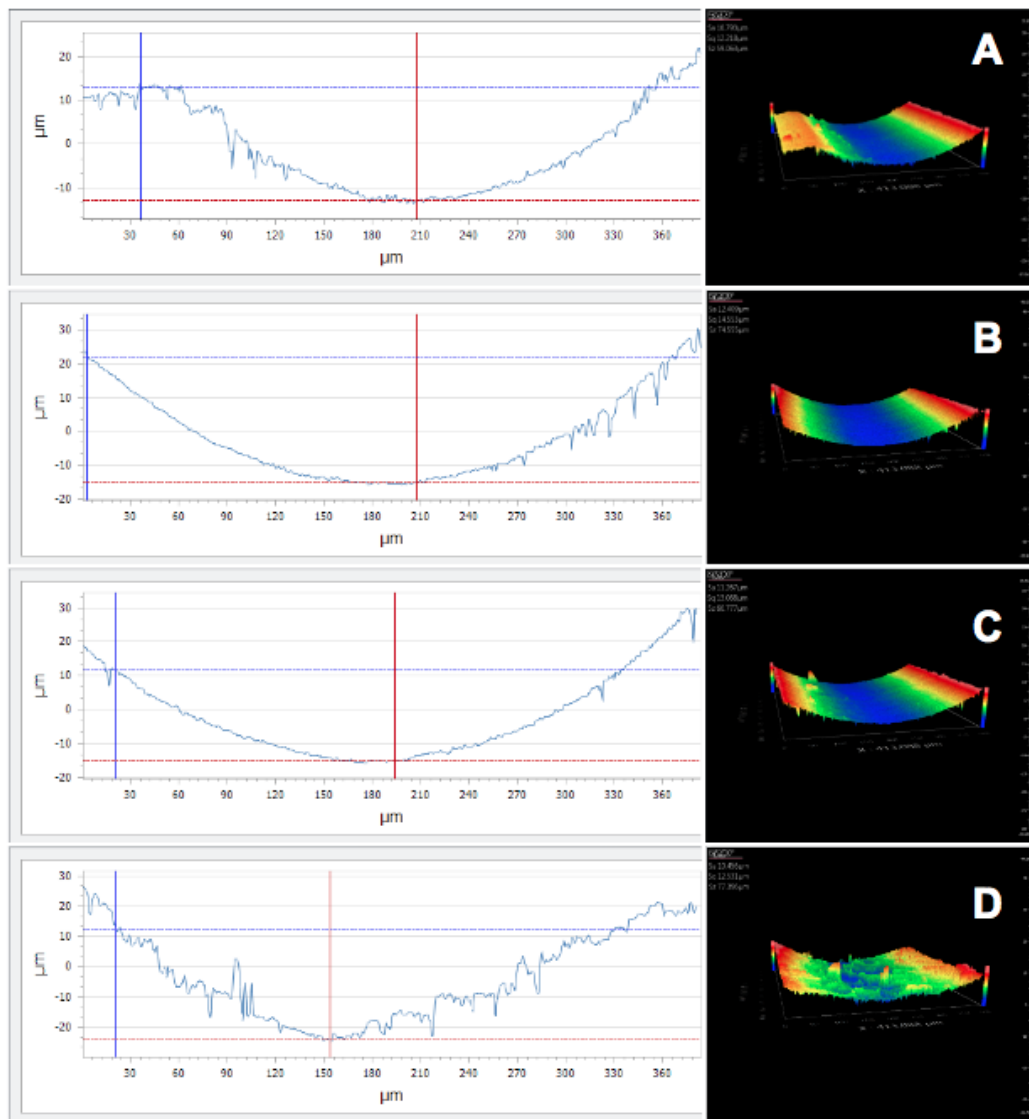
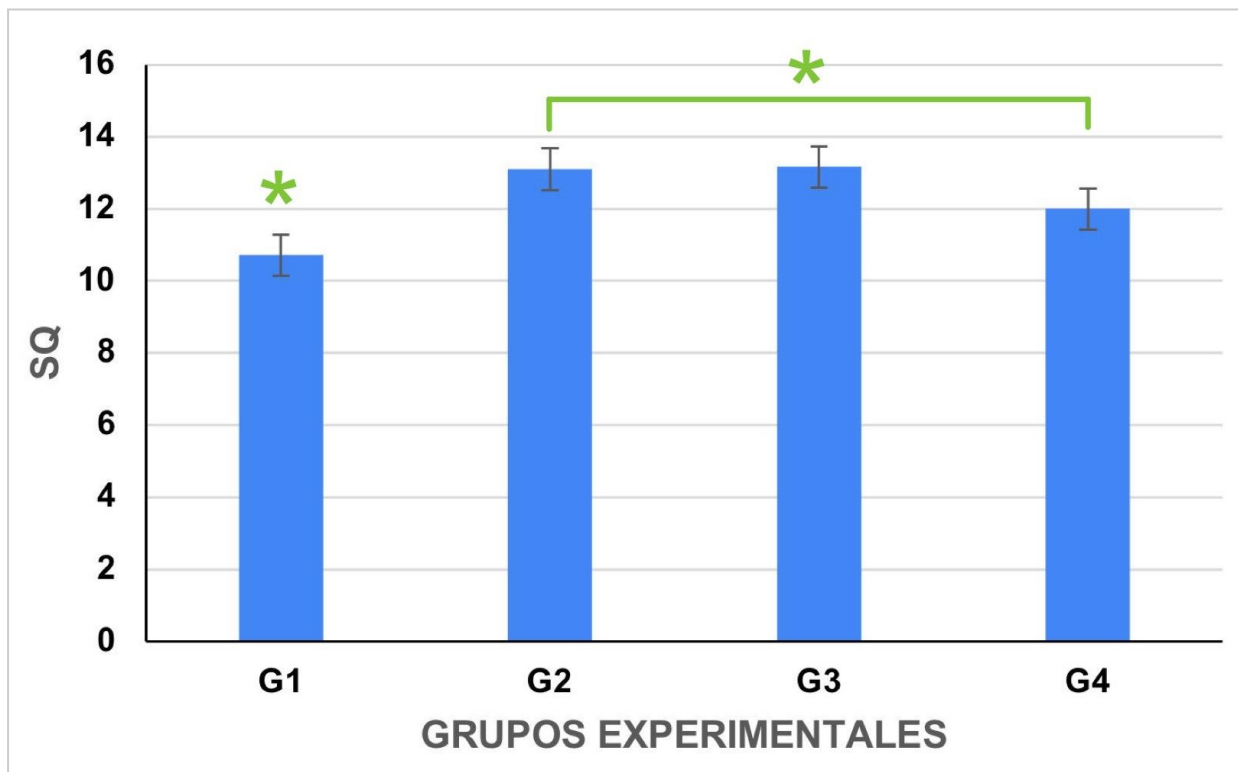


Figura 2. Profundidad de las muestras con estudio de perfilometría;
A) G1, B) G2, C) G3, D) G4.

Con ayuda del perfilómetro se realizó un análisis cuantitativo de la superficie completa del hemi-conducto de cada grupo, y se obtuvieron los promedio de la rugosidad aritmética (Sa) y cuadrática (Sq) \pm desviación estándar (**Tabla 4**). Los resultados muestran que si hay diferencia significativa entre el grupo G1 (sin tratamiento) y los grupos experimentales (G2-4) que podría deberse a las características propias del hidrogel al formar una capa más o menos uniforme en todo el conducto. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el valor de rugosidad de las muestras entre los grupos experimentales (G2-4) (**Gráfica 1**).

Superficie	Sa	Sq
G1	9,26 $\mu\text{m} \pm 1.39$	10,71 $\mu\text{m} \pm 1.39$
G2	10,97 $\mu\text{m} \pm 1.44$	13,10 $\mu\text{m} \pm 1.61$
G3	11,28 $\mu\text{m} \pm 0.73$	13,16 $\mu\text{m} \pm 0.91$
G4	10,08 $\mu\text{m} \pm 2.83$	12,00 $\mu\text{m} \pm 3.11$

Tabla 4. Promedio de rugosidad \pm desviación estándar en perfilometría, donde Sa: rugosidad aritmética y Sq: rugosidad cuadrática, en las superficies por grupo.



Gráfica 1. Análisis de resultados por grupo de rugosidad cuadrática, valor promedio \pm desviación estándar ($p=0.0002$).

A continuación se muestran imágenes tridimensionales obtenidas en el perfilómetro, en donde se realizó el análisis de la topografía de toda la longitud de los conductos de las muestras (**Figura 3**). Las muestras G1 (sin tratamiento) y aquellas recubiertas con el hidrogel de quitosano al 0.2% (G2), muestran una superficie con topografía homogénea a lo largo del conducto (**Figura 3 A y B**). La superficie del conducto de las muestras de G3, muestran homogeneidad topográfica. Sin embargo, las muestras de G4 nos permiten observar una superficie irregular a lo largo de todo el conducto, que podría explicarse a la presencia de CAP-p15 cuya naturaleza hidrofóbica da lugar a la formación de agregados moleculares.

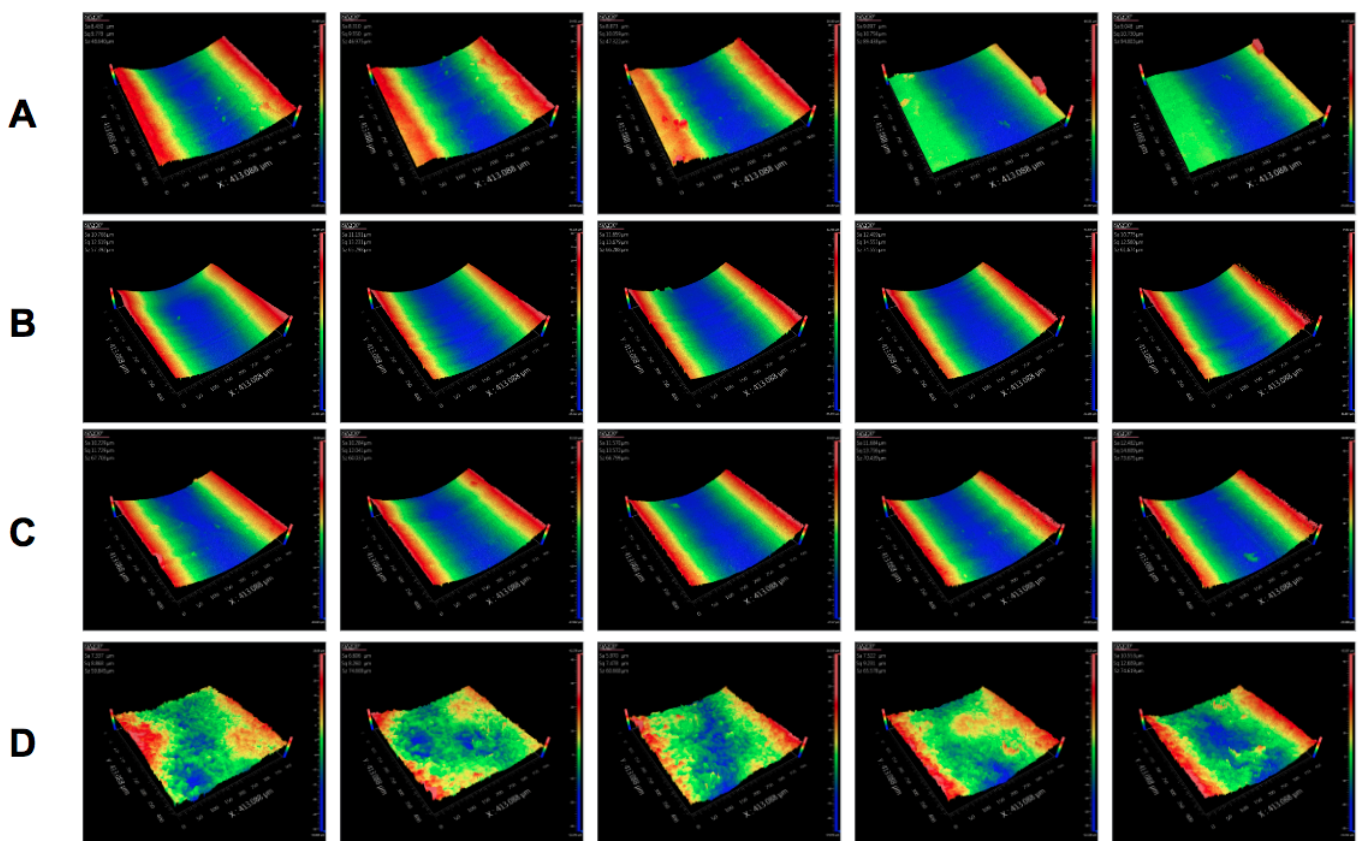


Figura 3. Paneles de algunas muestras, en paneles por grupos, obtenidos del estudio de perfilometría de las superficies, posterior al tiempo de incubación en saliva artificial. A) G1, B) G2, C) G3, D) G4.

Evaluación de la formación de mineral en las superficies radiculares acondicionadas de las superficies control (G1) y con cada uno de los grupos experimentales (G2, G3, G4), mediante microscopía electrónica de barrido a través de electrones secundarios.

Las muestras seleccionadas, tratadas e incubadas en la solución fisiológica simulada durante 10 días a 37°C, se analizaron mediante un microscopio electrónico de barrido (MEB) EVO-10. En el grupo G1 (sin tratamiento) se observa una superficie químicamente homogénea; en mayores aumentos se aprecia la orientación preferencial de los cristales de HA que corresponde al tejido dentinario del conducto radicular. Además, se observa la presencia de los túbulos dentinarios en toda la superficie del conducto; además, se aprecian algunas estructuras de morfología irregular dispersos en la superficie dentinaria (**Figura A.1**). Por su morfología y presencia de conductos podrían tratarse de porciones de dentina que se mantuvieron adheridos aún después del tratamiento de conductos (**Figura A.2**).

En las muestras G2 (tratadas con hidrogel de quitosano) (**Figura 4B**) se observa una superficie aparentemente homogénea, donde es posible identificar una menor cantidad de túbulos dentinarios a lo largo de la muestra en comparación con G1 (**Figura 4A**). El tejido dentinario del conducto muestra una superficie menos “rugosa” donde ya no es tan visible la orientación cristalina de los túbulos dentinarios, y esto es más evidente en una magnificación de 2000X (**Figura 4B.1 y B.2**). La diferencia topográfica observada entre las imágenes **4B.2 y A.2** de la muestra G1, pudiéramos asociarla a la presencia del hidrogel, ya que forma una capa regular que nos ayuda a sellar gran parte de los túbulos dentinarios.

Por su parte, en el grupo experimental G3, se puede ver (**Figura 4C**) una superficie químicamente homogénea con una topografía irregular (patrón “lobular”), comparada con G1, además de que se identifican muy pocos túbulos dentinarios expuestos (**Figura 4C.1**). La superficie del conducto radicular muestra la presencia de depósitos de una composición química diferente a la dentina, cuya morfología y dimensiones son irregulares (**Figura 4C.2**).

Las microfotografías de G4, (**Figura 4D**), nos dejan ver un conducto radicular químicamente homogéneo y muestra una topografía con patrón “lobular”. Es posible observar la presencia de precipitados con diversas morfologías en toda la superficie tratada con el hidrogel/CAP-p15 (**Figura 4D.1**), estos precipitados podrían asociarse a la presencia de un mineral similar a la hidroxiapatita; sin embargo, es necesario llevar a cabo su posterior caracterización química.

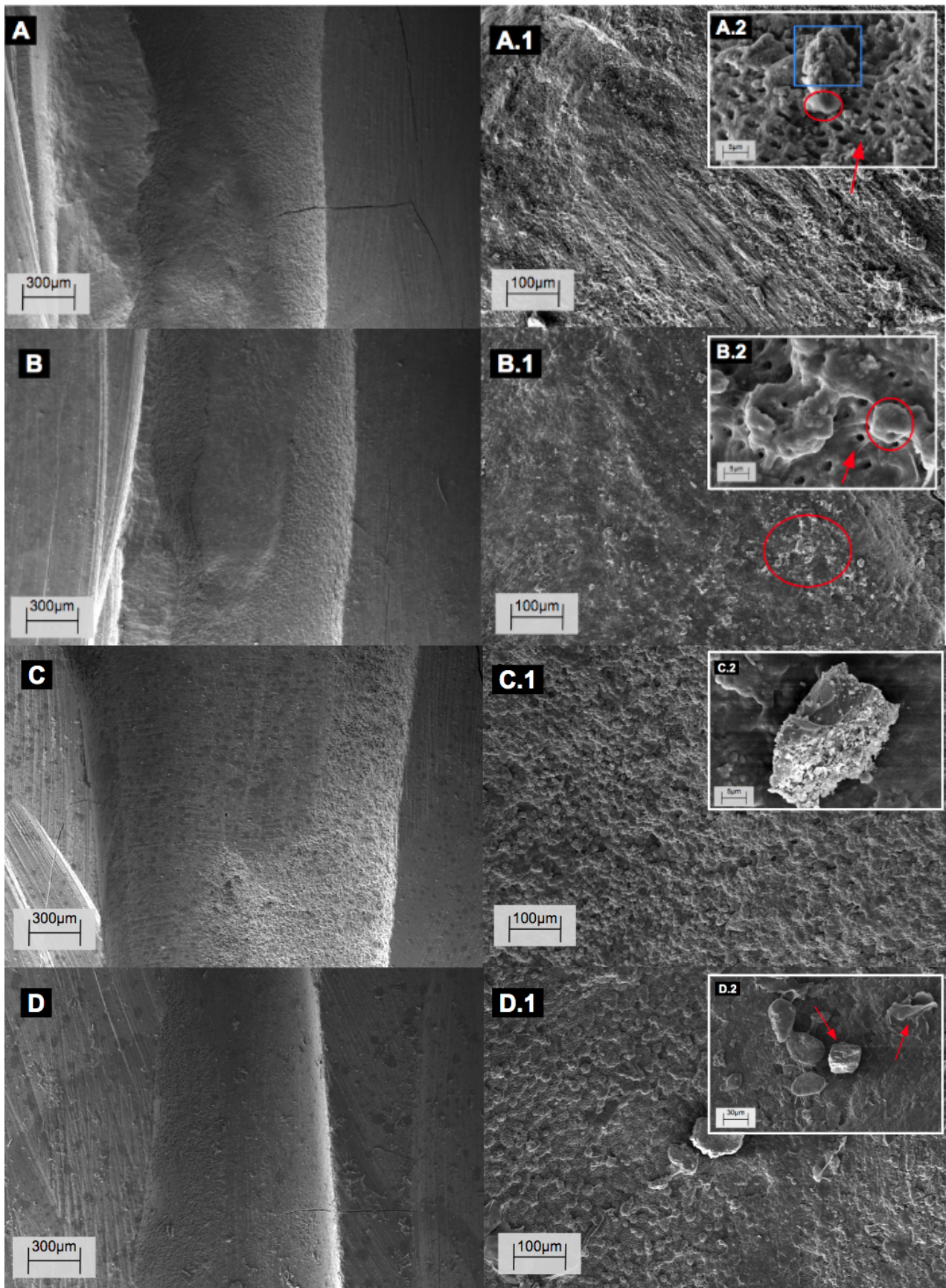


Figura 4. Microfotografías obtenidas con MEB de muestras seleccionadas en donde podemos observar A) G1, B) G2, C) G3 y D) G4; con las siguientes magnificaciones 30X, 150X y 2000X.

Evaluación de la formación de la biopelícula de Enterococcus faecalis en las superficies radiculares acondicionadas con cada uno de los grupos experimentales (G2, G3, G4), además de las superficies control (G1).

A continuación se muestran las imágenes representativas de cada uno de los grupos experimentales obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido a través de electrones secundarios. La **Figura 5** muestra las microfotografías, a diferentes magnificaciones, del grupo control (superficies radiculares que no fueron tratadas con alguno de los grupos experimentales).

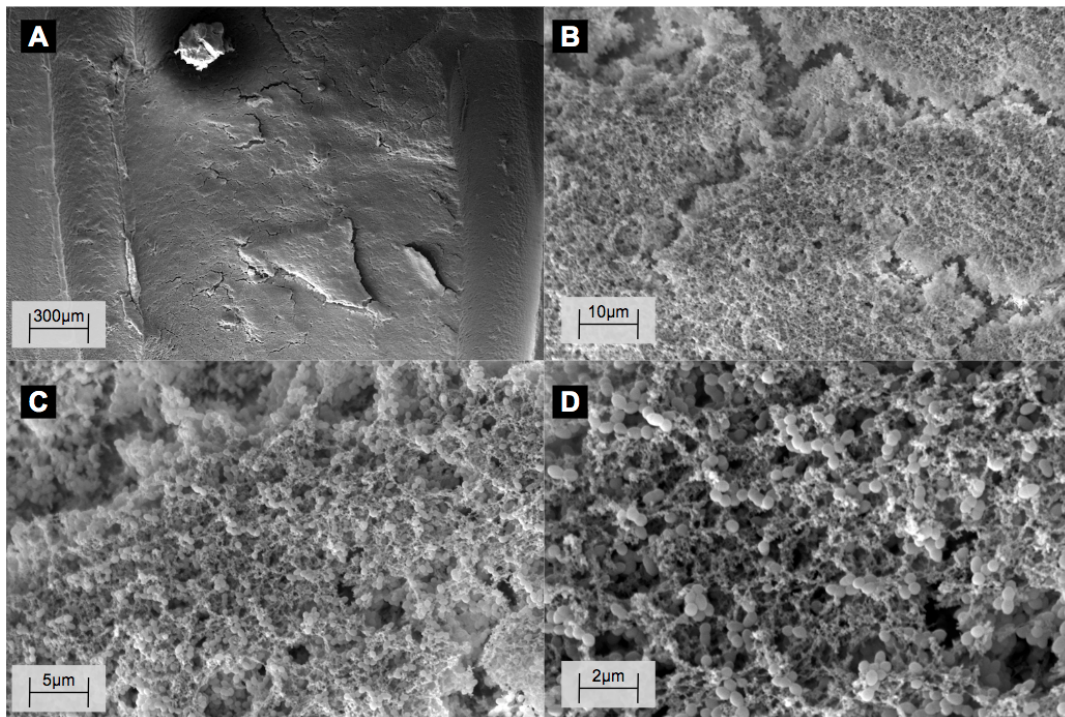


Figura 5. Imágenes representativas del grupo G1; grupo control a diferentes magnificaciones: A)30X, B) 858X, C) 2000X y D) 4000X.

Como puede observarse en la figura anterior, en la menor magnificación obtenida (**A**) no es posible observar la presencia de la biopelícula bacteriana, sin embargo, es posible observar la topografía superficial del conducto radicular. A una mayor magnificación (**B**) se comprueba la presencia de una biopelícula de *E. faecalis* colonizando las superficies radiculares que no fueron acondicionadas con alguno de los grupos experimentales (grupo control). Las microfotografías **C** y **D**, correspondientes a magnificaciones de 2 000X y 4 000X, respectivamente, dichas imágenes ofrecen detalles estructurales de la biopelícula bacteriana formada, como la presencia de una cantidad importante de matriz extracelular (exopolisacáridos) reticular recubriendo prácticamente toda la superficie de la dentina evaluada.

La **Figura 6** presenta las microfotografías a diferentes magnificaciones obtenidas del grupo 2 (G2), es decir, las superficies radiculares que fueron tratadas con hidrogel de quitosano al 0.2%.

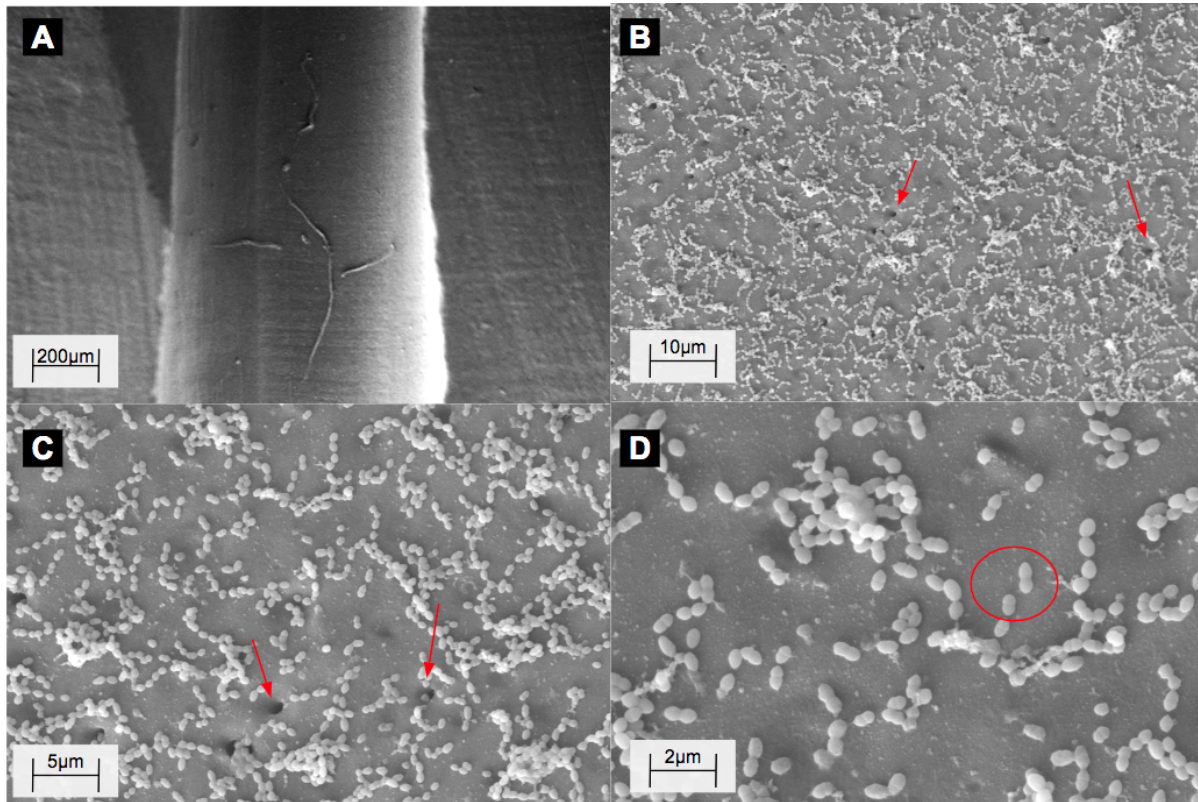


Figura 6. Imágenes del grupo G2, hidrogel de quitosano al 0.2%. Magnificaciones: A)30X, B) 858X, C) 2000X y D) 4000X.

Como se observa en **Figura 6**, en la magnificación de 30X (**A**), es posible identificar el conducto radicular muy bien delimitado, sin embargo, no es posible observar la presencia de la biopelícula bacteriana. Por otro lado, a mayor magnificación (**B**), se observa la presencia de células de *E. faecalis* distribuidas periódicamente sobre la dentina radicular. A diferencia de lo observado en el grupo control (G1), en las superficies radiculares del grupo G2 no fue posible observar la presencia de biopelículas complejas, ni la presencia del exopolisacárido característico de la matriz extracelular formada por este microorganismo. A mayor magnificación, en (**B**) y (**C**), se confirma la inhibición de la formación de una biopelícula compleja de *E. faecalis*, de forma que con la inhibición de la adhesión de *E. faecalis* sobre las superficies de dentina acondicionadas con quitosano al 0.2% (G2) fue posible observar la presencia de algunos túbulos dentinarios. En una magnificación de 4 000X, (**D**) podemos observar la presencia de microorganismos en división adheridos en la superficie de dentina.

En la **Figura 7** se observan micrografías representativas del grupo 3 (G3), es decir, superficies de dentina radicular acondicionadas con el péptido CEMP1p-3 junto con hidrogel de quitosano al 0.2%.

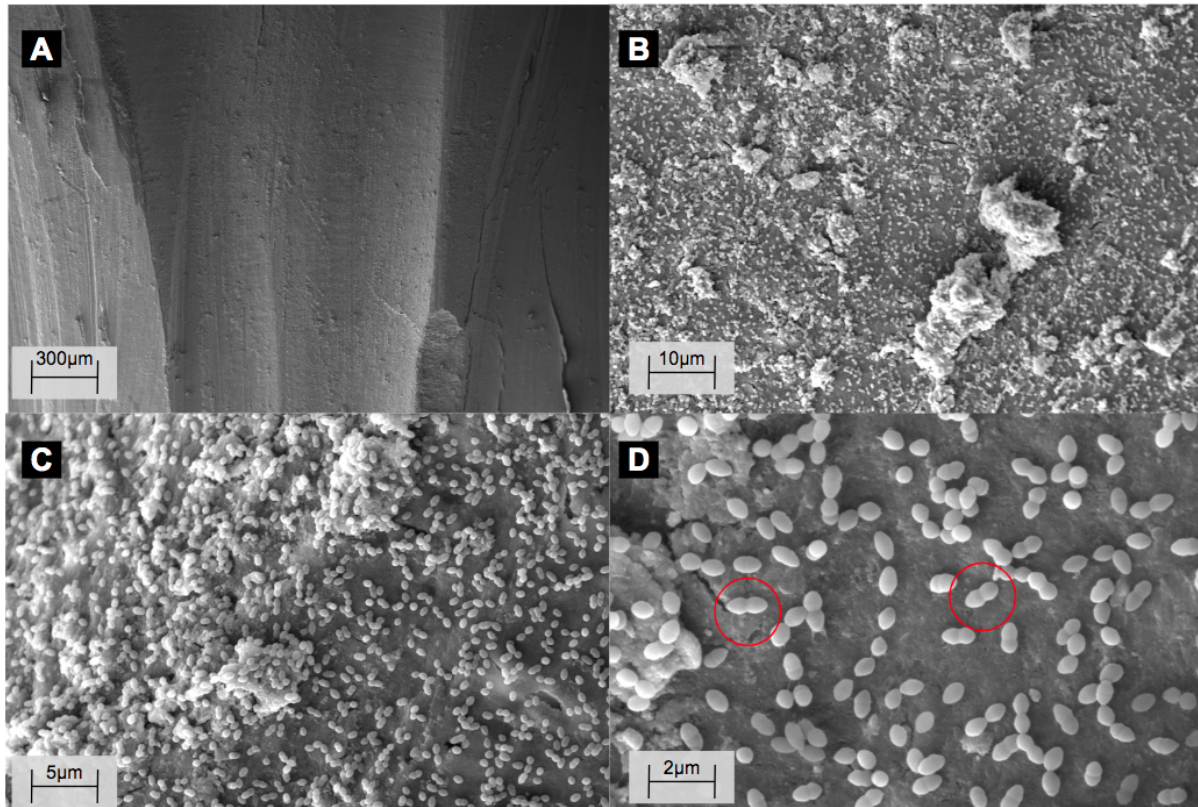


Figura 7. Imágenes del grupo G3; hidrogel de quitosano al 0.2% con CEMP1-p3 a diferentes magnificaciones: A)30X, B) 858X, C) 2000X y D) 4000X.

En la primera microfotografía **(A)**, se observa el conducto radicular de apariencia homogénea y bien delimitado. En la magnificación de 858X **(B)**, no fue posible observar la presencia de una biopelícula bacteriana compleja, sin embargo, sí es posible observar la presencia de acumulaciones de células de *E. faecalis* distribuidas periódicamente sobre la superficie radicular acondicionada con CEMP1-p3 con quitosano al 0.20%. Por otro lado, a una mayor magnificación **(C)**, se observa mayor la presencia de una mayor cantidad de bacterias en comparación con las superficies radiculares tratadas sólo con quitosano al 0.20%, es decir, grupo G2 **(Figura 6C)**. También fue posible observar la presencia de algunos túbulos dentinarios no sellados. Finalmente, en la mayor magnificación obtenida **(D)**, se observa que células de *E. faecalis* adheridas a las superficies radiculares del grupo G3 se encuentran en división celular.

A continuación se presentan microfotografías representativas del grupo 4 (G4), superficies radiculares tratadas con el péptido CAPp-15 e hidrogel de quitosano al 0.2% (Figura 8).

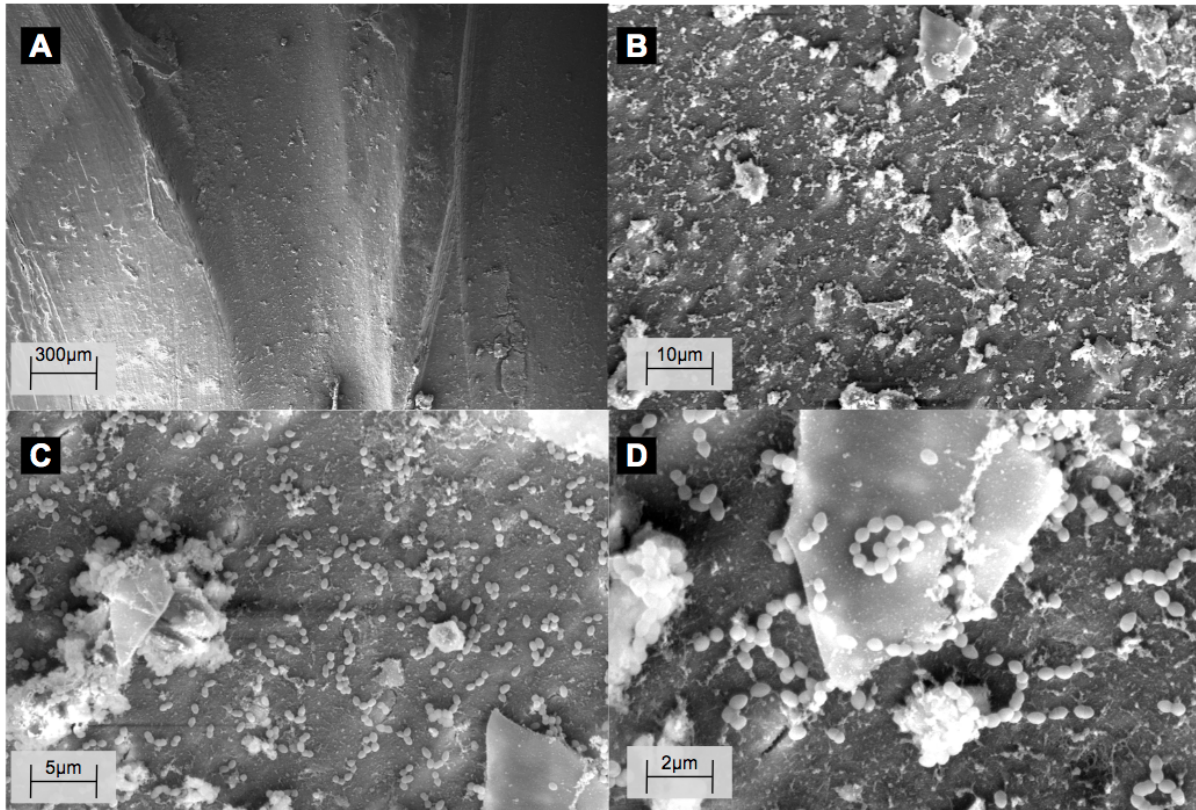


Figura 8. Imágenes de grupo G4; hidrogel de quitosano al 0.2% con CAP-p15.

Magnificaciones: A)30X, B) 858X, C) 2000X y D) 4000X.

En la menor magnificación (**A**), es posible observar el conducto radicular bien delimitado. A una magnificación de 858X (**B**), se observa la presencia de células de *E. faecalis* adheridas a la superficie radicular, distribuidas periódicamente. Es importante resaltar, que no se observa la presencia de una biopelícula compleja, así como la ausencia de la matriz extracelular reticular. También fue posible observar la presencia de precipitados irregulares recubriendo toda la superficie de la dentina. A una magnificación de 2000 X (**C**), se confirma la presencia de una menor cantidad de células de *E. faecalis* adheridas a la superficie de la dentina en comparación con el grupo **G2 (Figura 6C)** y **G3 (Figura 7C)**. En la microfotografía (**D**), es posible confirmar la presencia de una mayor cantidad precipitados irregulares los cuales pueden ser atribuidos a la formación de complejos entre hidrogel de quitosano al 0.2% con el péptido CAP-p15.

DISCUSIÓN

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es realizar una correcta preparación biomecánica para poder eliminar la contaminación de los conductos radiculares y así lograr una adecuada obturación intraconductos. La combinación de un buen manejo de instrumentos e irrigantes disminuyen la presencia de microorganismos como *E. faecalis* y así mismo evitan el fracaso del tratamiento. Anteriormente estos tratamientos eran realizados con instrumentos manuales, los cuales aumentaban el tiempo de trabajo y generaban una serie de eventos perjudiciales para el paciente.³⁰ Es por ello que para el desarrollo de este proyecto elegimos usar instrumentos rotatorios de NiTi; debido a sus características y ventajas como la reducción del tiempo de trabajo, una mejor limpieza de los conductos radiculares, la maleabilidad, ductilidad, resistencia a la deformación, entre otras; con el objetivo de realizar tratamiento exitosos.^{4,5} Recientemente se ha puesto a prueba en diferentes ensayos la combinación de dos irrigantes para tener un mejor resultado en el tratamiento de conductos radiculares, tales como EDTA y solución de hipoclorito de sodio; la asociación de estas soluciones ha demostrado ser muy eficaz, debido al éxito que tiene en la eliminación de barrillo dentinario y de tejido orgánico, así como el efecto antimicrobiano de la solución de hipoclorito de sodio.^{31,32} En este protocolo para la preparación biomecánica, utilizamos el sistema de instrumentos rotatorios, más la combinación de irrigantes (EDTA y la solución de hipoclorito de sodio), el cuál demostró ser eficiente, ya que obtuvimos imágenes en el microscopio estereoscópico en donde se puede apreciar en las muestras, los conductos bien delimitados, superficies homogéneas, limpias y sin fracturas de instrumentos; por ende pudimos realizar un correcto análisis de las muestras en los siguientes ensayos.

Debido al bajo costo, biocompatibilidad, mucoadhesión, y propiedades antimicrobianas, en la actualidad se han creado hidrogeles para uso en tratamientos endodónticos usando como base el quitosano, con la finalidad de regenerar el tejido conectivo pulpar, la dentina, vascularización e inervación. Es sumamente importante que estos hidrogeles cuenten con una viscosidad adecuada que permita su infiltración en el sistema de conductos radiculares. Estos hidrogeles además de ayudar a la regeneración pulpar, también contribuyen a la formación de dentina, debido a su capacidad para inducir la mineralización.³³ Recientemente varios artículos han reportado que estos hidrogeles a base de quitosano favorecen procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación de células troncales de la pulpa dental y células troncales mesenquimales, así como una actividad antimicrobiana. La combinación del quitosano con otros polímeros o biomateriales tanto naturales como sintéticos, en la elaboración de los andamios tendría más eficacia, ya que estos aditamentos ayudarían al quitosano aumentando y mejorando sus propiedades

así como promover la diferenciación de células mesenquimales y acelerar la regeneración de tejidos principalmente.³³ Las proteínas CEMP1 y CAP, se caracterizan por la importancia que tienen en el proceso de biomineralización, así como promover la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita.¹⁶⁻¹⁹ Si bien se ha demostrado que péptidos bio-funcionales derivados de estas proteínas, con propiedades fisicoquímicas diferentes entre sí, pueden promover la mineralización (**Tabla 3**), en este proyecto comprobamos su capacidad de mimetizar algunas funciones de las proteínas completas (a pesar de las diferencias encontradas en los resultados obtenidos, asociados a sus inherentes características fisicoquímicas).

El quitosano tiene la capacidad de interactuar con una gran diversidad de moléculas, es por ello que se utiliza como medio para la administración de fármacos, logrando un mayor efecto terapéutico y disminuyendo considerablemente los efectos adversos. Los fármacos con carga positiva pueden formar enlaces electrostáticos con el hidrogel de quitosano que tiene una carga negativa.³⁴ La naturaleza hidrofóbica de CAPp-15 en combinación con el hidrogel de quitosano genera una serie de interacciones (hidrofóbicas), que al encontrarse ambos en un sustrato como la dentina, se reporta la formación de aglomerados moleculares en la superficie; los cuales pueden observarse en el análisis de perfilometría (**Figura 3 panel D**), donde si bien no hay cambios importantes en el valor de rugosidad se observan diferencias topográficas importantes. Esto se ha observado en superficies de TiO₂ biofuncionalizados con este péptido.²⁸ Así mismo podemos observar estas acumulaciones de partículas en la superficie de los conductos en las microfotografías que se obtuvieron en el microscopio electrónico de barrido (**Figura 4 panel D**). Estas interacciones entre hidrogel y péptido, aparentemente no afectaron su capacidad para promover el depósito de mineral al observar depósitos con morfologías similares e identificadas en la bio-funcionalización de superficies de TiO₂. Por otro lado, CEMP1p-3 es una secuencia hidrofílica que podría generar interacciones electrostáticas con las moléculas de quitosano y que dieron lugar a una capa homogénea que recubre la superficie del conducto (**Figura 2 panel C**). Si bien este péptido ha demostrado ser capaz de promover la maduración de apatitas de importancia biológica (OCP-HA), en este trabajo se reporta la presencia de algunos depósitos aislados dentro del conducto radicular, esto podría deberse a que las interacciones entre hidrogel de quitosano y el péptido CEMP1p-3, podría estar limitando su efecto mineralizante.

En el ensayo microbiológico pudimos observar que en el grupo control, tenemos la presencia de la bacteria y una biopelícula compleja, además de la presencia de exopolisacáridos reticulares. Los exopolisacáridos (EPS) son biopolímeros extracelulares que diferentes microorganismos en este caso *E. faecalis*, secretan con la finalidad de protegerse de las condiciones del medio en el que se encuentran, así como de los antibióticos.³⁵ En el presente trabajo de investigación, fue posible evaluar (por primera vez) el efecto antimicrobiano del quitosano al 2% en combinación con los péptidos bioactivos CEMP-p3 y CAP-p15. De forma que, en las superficies radiculares tratadas con los diferentes grupos experimentales (G2, G3 y G4) se observa que, aunque sí existe adhesión de *E. faecalis*, no hay presencia de una biopelícula compleja, ni la formación de exopolisacáridos reticulares asociados a la biopelícula bacteriana; observándose, además, que es el hidrogel de quitosano al 2% el que modifica la superficie radicular física y químicamente para evitar que el microorganismo secrete matriz extracelular y no se forme una biopelícula compleja. Es importante mencionar que aunque entre los grupos experimentales no hay una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de células de *E. faecalis* adheridas a las superficies radiculares (**Figura 6C**, **Figura 7C** y **Figura 8C**, fue posible observar que la combinación del quitosano al 2% con el péptido bioactivo CAP-15 (grupo experimental G4) favorece la formación de precipitados irregulares que recubren la superficie del conducto radicular (**Figura 8D**).

Debido a el cambio topográfico que observamos en el estudio de perfilometría, y los depósitos irregulares presentes en el conducto, en las muestras de G4 en comparación con los demás grupos, se creía que sería aquí en dónde obtendríamos mayor cantidad de bacterias adheridas; sin embargo esto no se cumplió y lo podemos corroborar en las microfotografías con MEB (**Figura 8**); en estas mismas imágenes observamos aglomeraciones de distinta composición química e incluso cuando hay menor cantidad de microorganismos adheridos y no está formando la biopelícula cubierta por exopolisacáridos. Con esto entendemos que bajo las condiciones mínimas como un pH de 7 y el uso de los péptidos bioactivos (CEMPp-3 y CAPp-15, principalmente), favorece a la precipitación de cristales (posiblemente de apatita); además los péptidos generan una capa que ayuda a obliterar gran parte de los túbulos dentinarios; lo que evita que haya menor adhesión de microorganismos, dando como resultado un menor riesgo de la contaminación del conducto radicular.

CONCLUSIONES

El hidrogel de quitosano mostró de manera individual que produce una capa homogénea en la superficie del conducto radicular que hace un sellado de la mayoría de túbulos dentinarios; además tiene un efecto inhibitorio en la formación de biopelícula bacteriana de *E. faecalis*; así como también lo tuvo en conjunto con los péptidos con los que trabajamos (CAPp-15 y CEMP1p-3), en donde tuvimos una disminución en la cantidad de microorganismos. Así mismo se obtuvieron precipitados irregulares en las muestras tratadas con el hidrogel y CAPp-15, asociados a esta combinación. En las muestras tratadas con hidrogel de quitosano y CEMP1p-3, observamos que no hubo un cambio significativo en la cantidad de microorganismos adheridos a la superficie, ni precipitados, por lo que creemos que el péptido genera una inhibición de las propiedades antibacterianas del hidrogel, así como el quitosano estaría inhibiendo las propiedades remineralizantes del péptido bioactivo.

Consideramos que en los siguientes estudios lo ideal sería adecuar las concentraciones de los péptidos bioactivos, en especial CEMP1p-3 y el hidrogel de quitosano para obtener diferentes resultados.

REFERENCIAS

1. Mankeliya, S., Jaiswal, N., Singhal, R. K., Gupta, A., Pathak, V. K., & Kushwah, A. (2021). A Comparative Evaluation of Smear Layer Removal by Using Four Different Irrigation Solutions like Root Canal Irrigants: An In Vitro SEM Study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 22(5), 527–531.
2. Greco Machado, Y., García Molina, J. A., Lozano de Luaces, V., & Manzanares Céspedes, M. C. (2009). Morfología de los conductos radiculares de premolares superiores e inferiores. *Endodoncia*, 2009, 27(1), p. 13-18.
3. Tabassum, S., & Khan, F. R. (2016). Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *European journal of dentistry*, 10(1), 144–147. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.175682>
4. Ruiz, X., & Karanam, K. D. (2021). Rotary Endodontics: A Brief Review. *MAR Dental Sciences*, 2(1).
5. Mehlawat, R., Kapoor, R., Gandhi, K., Kumar, D., Malhotra, R., & Ahuja, S. (2019). Comparative evaluation of instrumentation timing and cleaning efficacy in extracted primary molars using manual and NiTi rotary technique—Invitro study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 9(2), 151-155.
6. Hashmi, A., Sodhi, R. N. S., & Kishen, A. (2019). Interfacial Characterization of Dentin Conditioned with Chitosan Hydroxyapatite Precursor Nanocomplexes Using Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Journal of Endodontics*, 45(12), 1513–1521. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.08.011>
7. Mittal, A., Shifali Dadu, Bidya Yendrembam, Abraham, A., Neetu Sharma Singh, & Garg, P. (2018). Comparison of new irrigating solutions on smear layer removal and calcium ions chelation from the root channel: An in vitro study. *Endodontology*, 30(1), 55. https://doi.org/10.4103/endo.endo_71_17
8. Muana, H. L., Nassar, M., Dargham, A., Hiraishi, N., & Tagami, J. (2021). Effect of smear layer removal agents on the microhardness and roughness of radicular dentin. *The Saudi Dental Journal*, 33(7), 661–665. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.05.001>
9. Mohammadi, Z., Yaripour, S., Shalavi, S., Palazzi, F., & Asgary, S. (2017). Root Canal Irrigants and Dentin Bonding: An Update. *Iranian Endodontic Journal*, 12(2), 131–136. <https://doi.org/10.22037/iej.2017.27>
10. Roshdy, N. N., Kataia, E. M., & Helmy, N. A. (2019). Assessment of antibacterial activity of 2.5% NaOCl, chitosan nano-particles against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals with and without diode laser irradiation: an in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77(1), 39-43

11. Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics*, 32(2), 93-98
12. Roshdy, N. N., Kataia, E. M., & Helmy, N. A. (2019). Assessment of antibacterial activity of 2.5% NaOCl, chitosan nano-particles against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals with and without diode laser irradiation: an in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77(1), 39-43.
13. Hashmi, A., Sodhi, R. N. S., & Kishen, A. (2019). Interfacial Characterization of Dentin Conditioned with Chitosan Hydroxyapatite Precursor Nanocomplexes Using Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Journal of Endodontics*, 45(12), 1513–1521. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.08.011>
14. Herrera-Guardiola, S., & Valencia, M. E. (2021). Andamios de quitosano con L-Arginina para su aplicación en salud dental. *Revista Nacional de Odontología*, 17(2), 1-21
15. Martínez, Leo M. (2019). Estudio de las propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad oral. (Tesis de Pregrado). <http://bdigital2.ula.ve:8080/xmlui/bitstream/handle/654321/6487/leomarisen.pdf?sequence1&isAllowed=y>
16. Flores Quintana, C. I. (2021). Efectividad en cuestión bactericida del quitosán a diferentes concentraciones como irrigante en la endodoncia (Master 's thesis).
17. Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Álvarez, M., Narayanan, A. S., Velázquez, U., Mercado, G., & Arzate, H. (2014). Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*, 69, 154–164.
18. Hernández, S. (2016). Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. Universidad Nacional Autónoma de México.
19. Mimila Cortés, A., Montoya, G., & Tehuacanero Cuapa, S. (2020). Efecto de péptido derivado de la proteína del cemento 1 en la formación y crecimiento de hidroxiapatita. <http://132.248.9.195/ptd2020/enero/0799668/Index.html>
20. Aguilar Sánchez, Viridiana (2021). Regeneración del defecto periodontal in vivo, inducido a través de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (CaPp-15). Facultad de Odontología, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3583343>
21. Santana, M., Montoya, G., Herrera, R., Hoz, L., Romo, E., Zamora, C., Wintergerst, A., & Arzate, H. (2020). Cemp1-p3 peptide promotes the transformation of octacalcium phosphate into hydroxyapatite crystals. *Crystals*, 10(12), 1131.

22. Dirección de Desarrollo Académico, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). "Papel del péptido VSFPSCCFSIIVIFM y su sinergia con la proteína del cemento1 (CEMP1) durante el proceso de mineralización in vitro e in vivo", Proyectos Universitarios PAPIIT (PAPIIT). En "Portal de datos abiertos UNAM" (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México.
23. Almohefer, S., Moazzez, R., & Bartlett, D. (2021). Comparison of metrology created by profilometry and digital microscopy on polished dentine in an erosion/abrasion model. *Journal of dentistry*, 114, 103831. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103831>
24. Montoya G. (2011). La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. Universidad Nacional Autónoma de México.
25. Pérez Soria, Adriana. (2015). "Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (cemp1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/72374>
26. López Barrios, Kevin. (2018). "Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la formación y crecimiento de oxalato de calcio e hidroxiapatita". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/446778>
27. Correa Prado, Rodrigo. (2019). "Caracterización físico química de un péptido derivado de la proteína del cemento 1 y su aplicación terapéutica in vivo". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3477400>
28. Ureiro Cueto, Guadalupe del Carmen Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio [Tesis que para optar por el grado de Maestra en Ciencias Odontológicas Básicas], Universidad Nacional Autónoma de México.
29. Del Carpio-Perochena, A., Kishen, A., Shrestha, A., & Bramante, C. M. (2015). Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.020>

30. Sankar, P., & Jeevanandan, G. (2021). Microbiological evaluation of root canals after biomechanical preparation with manual and rotary file system—randomized clinical trial. *Int J Dent Oral Sci*, *8*, 2841-2844.
31. Erik, C. E., & Özyürek, T. (2019). Effects of etidronate, NaOCl, EDTA irrigation solutions and their combinations on cyclic fatigue resistance of nickel–titanium single-file rotary and reciprocating instruments at body temperature. *Odontology*, *107*(2), 190-195.
32. Rath, P. P., Yiu, C. K., Matinlinna, J. P., Kishen, A., & Neelakantan, P. (2020). The effects of sequential and continuous chelation on dentin. *Dental Materials*, *36*(12), 1655-1665.
33. Aguilar, A., Zein, N., Harmouch, E., Hafdi, B., Bornert, F., Offner, D., Clauss, F., Fioretti, F., Huck, O., Benkirane-Jessel, N., & Hua, G. (2019). Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules* (Basel, Switzerland), *24*(16), 3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
34. Chu, S., Wang, J., & Gao, F. (2021). The Application of Chitosan Nanostructures in Stomatology. *Molecules*, *26*(20), 6315. <https://doi.org/10.3390/molecules26206315>
35. Kavitate, D., Devi, P. B., Delattre, C., Reddy, G. B., & Shetty, P. H. (2023). Exopolysaccharides produced by Enterococcus genus - An overview. *International journal of biological macromolecules*, *226*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.042>