REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Odontología

Escuela Profesional de Odontología

Estudio de la diferencia en la expresión proteómica del *Enterococcus faecalis* expuesto a la medicación con hidróxido de calcio, Arequipa 2024

Tesis presentada por el Bachiller:

Loayza Chuquicaña, Nicole Karyme

ORCID: 0009-0001-0048-2631

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor (a):

Dr. Figueroa Banda, Rufo Alberto

ORCID: 0000-0001-7249-0270

Arequipa – Perú

2025

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Julio del 2025

Dictamen: 014158-C-EPO-2025

Visto el borrador del expediente 014158, presentado por:

2016700492 - LOAYZA CHUQUICAÑA NICOLE KARYME

Titulado:

ESTUDIO DE LA DIFERENCIA EN LA EXPRESIÓN PROTEÓMICA DEL ENTEROCOCCUS FAECALIS EXPUESTO A LA MEDICACIÓN CON HIDRÓXIDO DE CALCIO, AREQUIPA 2024

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

29242362 - GALLEGOS VARGAS HERBERT MARIO
DICTAMINADOR

29238358 - SALAS ROJAS MONICA HILDA CLEOFE
DICTAMINADOR

29649041 - ZEVALLOS CHAVEZ MARCO ANTONIO
DICTAMINADOR

Estudio de la diferencia en la expresión proteómica del Enterococcus faecalis expuesto a la medicación con hidróxido de calcio, Arequipa 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	15%	1%	19%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	12%
2	aprenderly.com Fuente de Internet	5%
3	Submitted to Universidad Catolica San Antonio de Murcia Trabajo del estudiante	1%
4	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	ebin.pub Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Universidad Del Magdalena Trabajo del estudiante	1%

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DEDICATORIA

A **Dios,** por enseñarme a confiar en los procesos y a ver propósito en cada paso. Y por mostrarme que el valor no está en lo que se recibe, sino en lo que decido hacer con ello.

A mi madre **Egna,** Por su fuerza incansable, su constancia diaria y su ejemplo de lucha. Por enseñarme que el verdadero progreso no siempre viene de una carrera, sino en la capacidad de levantarse y comenzar de nuevo. Por mostrarme que el amor también se expresa en los sacrificios silenciosos y que rendirse nunca fue una opción. Gracias por tanto amor hecho acción.

A mi padre **Edgar,** por su incansable esfuerzo, su disciplina, y su admirable capacidad de reinventarse una y otra vez. Por enseñarme que no hay límites cuando se tiene voluntad de aprender, ayudar y mejorar. Por su cariño constante, su ejemplo de superación y su optimismo incluso en los días más difíciles. Todo lo bueno en mí lleva algo tuyo.

A mi hermano **Derek,** que sin saberlo me enseñó el amor incondicional. Que esta dedicatoria sea también una promesa de intentar ser siempre un ejemplo para ti.

A mi amigo **Julian**, por su compañía incondicional a lo largo de esta etapa. Por su apoyo constante, su optimismo y su constancia al estar presente incluso en mis días más difíciles. Gracias por ayudarme a descubrir partes valiosas de mí. Este camino no habría sido igual sin ti.

A mi abuela **Isabel**, por su fe inquebrantable en mí, su alegría constante y su amor incondicional que me ha acompañado en cada etapa de mi vida.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Católica de Santa María** y en especial a la Facultad de Odontología, por brindarme la oportunidad de formarme en un entorno de excelencia, y por enseñarme el valor de la perseverancia, la responsabilidad y el compromiso con el bienestar de nuestros pacientes.

Agradezco a mis **Dictaminadores,** por brindarme generosamente su tiempo y conocimientos, contribuyendo al enriquecimiento y mejora de este trabajo.

Y, finalmente, a mi **familia,** en especial a mis padres, **Egna y Edgar**; a mi hermano **Derek y** a mis **Abuelos.**

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

EPÍGRAFE

"Quien tiene un porqué para vivir, puede soportar casi cualquier cómo."

Friedrich Nietzsche

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

RESUMEN

Las lesiones pulpares, son la consecuencia directa de la progresión de una lesión cariosa que dejo de estar confinada al tejido duro y se proyectó al tejido blando, es así como los agentes causales de la lesión pulpar son varios, pero el más destacado es el *Enterococcus faecalis*.

La persistencia en el tiempo de esta noxa biológica genera una afectación del periodonto constituyendo las lesiones periapicales, entendiendo que estas son irritaciones del periodonto a consecuencia de las lesiones pulpares que se dan en dos fases, una infección primaria a consecuencia de una necrosis y los productos de la descomposición que se generan como resultado de la misma, su progresión da lugar a la segunda fase, una infección secundaria, la gangrena pulpar, la invasión de microorganismos del tejido necrótico como resultado de la caída de la defensa orgánica que facilita la extravasación de estos y sus toxinas para que pueda diseminarse por el peri ápice.

El tratamiento de elección para las lesiones pulpares es el tratamiento de conductos que consta de varios pasos clínicos dentro de los cuales se destaca la medicación, un complemento a la instrumentación que tiene por objeto contribuir a lograr la "esterilidad" del conducto. El medicamento más utilizado en la práctica clínica diaria para tal efecto es el hidróxido de calcio.

Sin embargo, en base a estudios precedentes, se conoce que los microorganismos, en atención a las directivas biológicas de perpetuación de la especie, tienen mecanismos de adaptación al medio ambiente en el que habitan, por lo que desarrollan mecanismos de resistencia hacia noxas físicas y químicas que se manifiestan a partir de directrices genéticas que parten del ADN hacia el ARN y de este punto, una directriz para la síntesis de proteínas, con lo que dichas directrices genéticas se vuelven funcionales.

Bajo las limitaciones de este estudio, se estableció la variación en la expresión proteómica por medio de la técnica de electroforesis bidimensional, estudio de homología secuencial de proteínas por espectrometría de masas y el alineamiento secuencial de péptidos trípticos; de esta forma llegándose a determinar los Spots E*f*_106, E*f*_107, E*f*_108 y E*f*_109 los cuales después del procesamiento bioinformático evidenciaron que el contraste en la muestra de *Enterococcus faecalis* sometido a hidróxido de calcio con un muestra de control, expresa las siguientes proteínas diferenciales: 50S ribosomal protein L9, Thiamine biosynthesis protein ThiI, Foldase protein PrsA, Probable tRNA sulfurtransferase; las mismas que son responsables de dotar a la bacteria de Resistencia al medio alcalino del hidróxido de calcio.

Palabras Clave: *Enterococcus faecalis*, hidróxido de calcio, variación proteómica.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ABSTRACT

Pulp lesions are the direct consequence of the progression of a carious lesion that has ceased to be confined to the hard tissue and has projected into the soft tissue. Thus, the causative agents of pulp lesions are numerous, but the most prominent is *Enterococcus faecalis.*

The persistence of this biological noxa over time generates an affectation of the periodontium constituting periapical lesions, understanding that these are irritations of the periodontium as a consequence of pulp lesions that occur in two phases, a primary infection as a consequence of necrosis and the products of decomposition that are generated as a result of the same, its progression gives rise to the second phase, a secondary infection, pulp gangrene, the invasion of microorganisms of the necrotic tissue as a result of the fall of the organic defense that facilitates the extravasation of these and their toxins so that it can spread through the periapex.

The treatment of choice for pulp lesions is root canal treatment, which consists of several clinical steps, among which medication stands out, a complement to instrumentation intended to contribute to achieving root canal sterility. The most used medication for this purpose is calcium hydroxide.

However, based on previous studies, it is known that microorganisms, in response to the biological directives for the perpetuation of the species, have adaptation mechanisms to the environment in which they live, and therefore develop resistance mechanisms against physical and chemical harmful agents that manifest themselves through genetic directives that start from DNA to RNA and, from this point, a directive for protein synthesis, with which these genetic directives become functional.

Within the limitations of this study, variations in proteomic expression were determined using two-dimensional electrophoresis, protein sequence homology studies by mass spectrometry, and tryptic peptide sequence alignment. In this way, Spots E*f*_106, E*f*_107, E*f*_108, and E*f*_109 were determined. After bioinformatic processing, they showed that the contrast in the *Enterococcus faecalis* sample subjected to calcium hydroxide with a control sample expressed the following differential proteins: 50S ribosomal protein L9, Thiamine biosynthesis protein ThiI, Foldase protein PrsA, Probable tRNA sulfurtransferase; these are responsible for providing the bacteria with resistance to the alkaline medium of calcium hydroxide.

Keywords*: Enterococcus faecalis***,** calcium hydroxide, proteomic variation.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN……..... 1

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO..... 2

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... 3

1.1. Determinación del problema..... 3

1.2. Enunciado 3

1.3. Descripción..... 3

1.4. Justificación 5

2. OBJETIVOS: 6

2.1. Objetivo general: 6

2.2. Objetivo específico: 6

3. MARCO CONCEPTUAL:..... 6

3.1. Dientes:..... 6

3.2. Disciplinas competentes: 7

3.3. Histología dental: el órgano dentinopulpar: 7

3.4. Naturaleza de la Lesión Pulpar:..... 9

3.5. Mecanismos de la lesión pulpar..... 10

3.6. Clasificación de las lesiones pulpares: 11

3.6.1. Estados Inflamatorios: 11

3.6.1.1. Reversibles:..... 11

3.6.1.1.1. Hiperemia pulpar: 11

3.6.1.1.2. Herida pulpar: 12

3.6.1.1.3. Irreversibles: 12

3.6.1.1.4. Agudos:..... 12

3.6.1.1.5. Crónicos:..... 13

3.6.2. Estados degenerativos de la pulpa: 14

3.6.2.1. Degeneración cálcica:..... 14

3.6.2.2. Degeneración Hialina: 14

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.6.2.3. Degeneración atrófica: 14
3.6.2.4. Degeneración Fibrosa: 14
3.6.2.5. Degeneración Grasa: 14
3.6.2.6. Reabsorción interna de dentina: 15
3.6.3. Muerte pulpar: 15
3.6.3.1. Necrosis pulpar: 15
3.6.3.2. Gangrena pulpar: 15
3.7. Actualización del diagnóstico endodóntico: 16
3.8. Lesiones Periapicales: 18
3.8.1. Clasificación: 18
3.8.2. Lesiones periapicales agudas: 18
3.8.3. Lesiones periapicales crónicas: 20
3.9. Tratamiento endodóntico: 22
3.10. Medicación endodóntica: 23
3.10.1. Antisépticos: 23
3.10.2. Eugenol: 23
3.10.3. Formaldehido: 24
3.10.4. Paramonoclorofenol: 24
3.10.5. Formocresol 24
3.10.6. Alcoholes 24
3.10.7. Los compuestos halogenados: 25
3.10.8. Asociaciones: 25
3.11. Hidróxido de calcio: 25
3.12. Microbiología de la lesión pulpar: 27
3.12.1. Principal etiología de la lesión pulpar: 27
3.12.2. Microecología endodóntica: 29
3.12.3. Condiciones para considerar en un patógeno endodóntico: 29
3.12.3.1. Fisicoquímicos: 30
3.12.3.2. Factores de Adhesión, Agregación y Congregación 31
3.12.4. Modelos de relación microbiana 32
3.12.5. Actividad Enzimática Bacteriana. 33
3.12.6. Principales microorganismos relacionados a enfermedades pulpares 34
3.13. Enterococcus faecalis: 38
3.13.1. Definición: 38

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.13.2. Características: 39
3.13.3. Patogenicidad 39
3.13.4. Factores de virulencia: 39
3.14. Antecedentes Investigativos 39
3.14.1. Antecedentes Internacionales: 39
3.14.2. Antecedentes nacionales: 42
3.14.3. Antecedentes locales: 42
4. HIPÓTESIS 42
4.1. Hipótesis Nula: 42
4.2. Hipótesis alterna: 43
CAPÍTULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL 44
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN 45
1.1. Técnicas 45
1.1.1. Recolección de muestras 45
1.1.2. Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE) 46
1.1.3. Estudios de homología secuencia “de novo” por Espectrometría de masas en tándem. 46
1.1.4. Secuenciación “de novo” de péptidos trípticos. 47
1.2. Instrumentos: 47
1.2.1. Instrumentos documentales: 47
1.2.2. Instrumentos mecánicos: 47
1.3. Materiales de Verificación 48
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN 48
2.1. Ubicación Espacial 48
2.1.1. Ámbito General 48
2.1.2. Ámbito Específico 48
2.2. Ubicación Temporal 48
2.3. Población/muestra 48
3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS 49
3.1. Organización de la información 49
3.2. Recursos 49
3.3. Prueba Piloto/Validación del Instrumento 49
4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS 49
4.1. Tipo de procesamiento: 49

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4.2. Plan de Procesamiento 49
4.2.1. Criterios de inclusión: 50
4.2.2. Criterio de exclusión: 50
4.3. Plan de Análisis 50
CAPÍTULO III RESULTADOS 51
1. Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) del cultivo microbiológico de Enterococcus faecalis en ausencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$). Mapa de Referencia. 52
2. Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) del cultivo microbiológico de Enterococcus faecalis en presencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$). Tratamiento. 54
3. Caracterización estructural de los spots correspondiente al control (Mapa de Referencia). 56
4. Caracterización estructural de los spots correspondiente a los tratados con hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) 57
5. Estudio de homología secuencial por espectrometría de masas ESI-Q-TOF-MS/MS de los péptidos *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 procedentes de cultivo celular de Enterococcus faecalis en presencia de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ 59
6. Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para los péptidos estudiados en presencia de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ 61
7. Deducción de las proteínas expresas de los spots *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 en condiciones de tratamiento con hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ por Enterococcus faecalis 62
DISCUSIÓN 64
CONCLUSIONES 69
SUGERENCIAS 70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
ANEXOS 84

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Terminología diagnóstica sobre Condiciones Pulpares 16

Tabla 2 Terminología diagnóstica sobre Afecciones Periapicales / Perirradiculares 17

Tabla 3 Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0. 56

Tabla 4 Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0. 58

Tabla 5 Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para la determinación de estructura de proteína en formato FASTA para los péptidos *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 61

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* 52

Figura 2 Vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* 53

Figura 3 Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a Hidróxido de Calcio 54

Figura 4 Vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a hidróxido de calcio 55

Figura 5 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot E*f*_106 (Query_10001) 59

Figura 6 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot E*f*_107 (Query_10001) 59

Figura 7 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot E*f*_108 (Query_10001) 60

Figura 8 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot E*f*_109 (Query_10001) 60

Figura 9 (E*f*_106) 50S ribosomal protein L9 – Proteína ribosomal 50S L9 62

Figura 10 (E*f*_107) Thiamine biosynthesis protein ThiI – Proteína de biosíntesis de tiamina ThiI 62

Figura 11 (E*f*_108) Foldase protein PrsA - Proteína foldasa PrsA 63

Figura 12 (E*f*_109) Probable tRNA sulfurtransferase - Probable ARNt sulfurtransferasa . 63

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Fotografías del procesamiento en el laboratorio..... 85

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN

El tratamiento endodóntico, está indicado para aquellos casos donde la lesión ya ha pasado por la afectación de los tejidos duros del diente y ha progresado tanto en profundidad que ha llegado el tejido blando, la pulpa dental, es a este nivel, en donde el proceso inflamatorio de naturaleza séptica, que si bien no deja que las bacterias puedan ingresar, impedidas la alta defensa orgánica del tejido, si se da un proceso de inflamación aguda, debido a las exotoxinas que sintetizan, posteriormente se dará una progresión hacia una inflamación crónica y finalmente llegar a la muerte del órgano, con lo que vamos a poder evidenciar el ingreso de las bacterias, convirtiéndola así en una pulpa necrótica. (1)

Es el mecanismo fisiopatológico antes descrito lo que desencadena que la lesión pulpar progrese a una lesión periapical, las bacterias que colonizaron la pulpa necrótica, por la desaparición de la defensa orgánica a cargo de la cadena linfoplasmocitaria, convierten este proceso necrótico, una infección primaria, en una gangrena pulpar, una infección secundaria que genera la extravasación del contenido séptico al peri-ápice generando una injuria en este, una lesión periapical. (1)

Es en el transcurso de toda la sucesión microbiana que se va a dar en este proceso infeccioso que va a aparecer el *Enterococcus faecalis*, una de las principales bacterias implicadas en el desarrollo de la lesión pulpar. El medicamento más usado para lograr la "esterilidad" del conducto es el hidróxido de calcio, sin embargo dicho medicamento desencadena una variación proteómica en el *Enterococcus faecalis* (2).

Las proteínas diferenciales halladas por medio de la técnica de observación y medición por el uso de técnicas de Electroforesis bidimensional, homología secuencial de proteínas por espectrometría de masas en tándem y alineamiento secuencial de péptidos trípticos son 50S ribosomal protein L9, Thiamine biosynthesis protein ThiI, Foldase protein PrsA, Probable tRNA sulfurtransferase las mismas que se expresaron en el control de 7, 14, 21 días y son responsables de dotar de resistencia a la bacteria de resistencia en el medio alcalino del hidróxido de calcio.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del problema.

El hidróxido de calcio es un bactericida ampliamente investigado, además de ser actualmente el agente preferido para la medicación intraconducto (1), estudios precedentes han demostrado un efecto bacteriano deficiente contra patógenos específicos entre ellos el *Enterococcus faecalis.* (2)

El *E. faecalis* se asocia con diferentes formas de enfermedades periradiculares, incluidas las infecciones endodónticas primarias presente en un 4 a 40% (3) y en las infecciones persistentes se ha encontrado que este porcentaje es mayor. En algunos casos, se ha encontrado como el único organismo presente en dientes obturados con lesiones perirradiculares preexistentes. (4) Incluso el *E. faecalis* ha demostrado ser la causa bacteriana primitiva en los casos de periodontitis apical. (5)

Siendo que el éxito de los tratamientos endodónticos depende en gran medida de la erradicación de los microorganismos presentes en el conducto radicular, se hace de necesidad investigar qué factores podrían ser aquellos que hacen resistente al *E. faecalis* frente a la efectividad que posee el $Ca(OH)_2$ hacia otros microorganismos.

1.2. Enunciado

“Diferencia en la expresión proteómica del *Enterococcus faecalis* expuesto a la medicación con hidróxido de calcio, Arequipa 2024”

1.3. Descripción

a) Área de Conocimiento

- **Área General** : Ciencias de la Salud.
- **Área Específica** : Odontología.
- **Especialidad** : Endodoncia.
- **Línea o Tópico** : Microbiología, Proteómica.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

b) Operacionalización de Variables

VARIABLES	INDICADORES	SUBINDICADORES
Variable independiente: Hidróxido de Calcio.	30-35% 20 µg	1 día 7 días 14 días 21 días
Variable dependiente: Expresión proteómica del *Enterococcus faecalis*	Expresión del proteoma postraduccional en análisis de secuencia PatternLab en relación con la compatibilidad de su punto isoeléctrico	

c) Interrogantes Básicas

- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica diferencial de la muestra del sobrenadante del *E. faecalis* expuesto al Hidróxido de calcio en comparación con el no expuesto?
- ¿Cuál es la expresión proteómica sobrenadante de *E. faecalis* sin exposición al Hidróxido de calcio?
- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica sobrenadante de *E. faecalis* con exposición al Hidróxido de calcio al 1, 7, 14 y 21 días?

d) Taxonomía de la Investigación (Diseño de la Investigación)

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	1. Por la técnica de recolección	2. Por el tipo de dato que se planifica recoger	3. Por el Nª de mediciones de la variable	4. Por el Nª de muestras o población	5. Por el ámbito de recolección		
Cuantitativo	**Experimental**	**Prospectivo**	**Transversal**	**Comparativo**	**De laboratorio**	**Experimental**	**Explicativo**

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.4. Justificación

a) Originalidad:

La investigación es original. El estudio de variabilidad proteínica del *E. faecalis* al ser expuesto al hidróxido de calcio no ha sido investigado. A nivel mundial seria uno de los primeros estudios en identificar dicha variabilidad.

b) Relevancia:

La presente investigación tendrá relevancia científica. Aportará información al campo de la medicación endodóntica, ya que mostrará la variabilidad proteínica de *E. faecalis* frente al hidróxido de calcio.

c) Actualidad:

Es una información actual por que emplea metodología y tecnología moderna, que explicar la dinámica entre *E. faecalis* y el hidróxido de calcio.

d) Viabilidad:

El proyecto es considerado viable porque la recolección del sobrenadante se llevará a cabo en el laboratorio de química y proteínas F401 de la Universidad Católica de Santa María y será supervisado por el Dr. Gustavo Obando Perea en colaboración con el Dr. Luis Alberto Ponce.

e) Interés Personal:

Es de mi interés conocer la variabilidad proteínica de *E. faecalis* frente al hidróxido de calcio y aportar conocimiento al campo de medicación endodóntica; de la misma forma, pretendo optar por el título profesional de Cirujano Dentista.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo general:

Evidenciar el nivel de expresión proteómica diferencial de la muestra del sobrenadante del *E. faecalis* expuesto al Hidróxido de calcio en comparación con el no expuesto.

2.2. Objetivo específico:

- Identificar la expresión proteómica del sobrenadante del *E. faecalis* sin exposición al Hidróxido de calcio.
- Determinar el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de *E. faecalis* con exposición al Hidróxido de calcio al día 1, 7,14 y 21.

3. MARCO CONCEPTUAL:

Lesiones pupares:

3.1. Dientes:

Los dientes son órganos duros que forman parte del sistema estomatognático, cuya función es muy variada, desde servir como elemento indispensable para iniciar el procesamiento de los alimentos y formar el bolo alimenticio, hasta generar funciones de soporte estético para los músculos faciales. (1)

Existen dos tipos de dentición en el ser humano, en base a su estadio evolutivo, la dentición temporaria y la dentición permanente, la primera se caracteriza por que son a simple vista dientes pequeños, en proporción a el tamaño de la boca de la persona de este estadio evolutivo, sin embargo, también existen variaciones a nivel histológico, dado que algunos estímulos del desarrollo maxilar se expresan en edades tempranas con la finalidad antes mencionada, al igual la de generar el desarrollo del maxilar y la mandíbula; como también el caso del bruxismo fisiológico que desgasta los dientes temporarios con el objetivo de estimular los centros de desarrollo de la mandíbula y el maxilar. (2)

Por otra parte, está la dentición adulta o llamada permanente, que aumenta en su número las piezas dentarias, agregando un grupo de premolares, lo que también implica un incremento de tamaño de las piezas dentarias, pero la diferencia

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

histológica también es notable, puesto que existe un mayor nivel de concentración de contenido mineral en estos últimos. (3)

Los dientes cuentan con una estructura anatómica, que depende del grupo al que pertenecen, sin embargo, la parte activa a grandes rasgos cuenta con surcos, fosas y fisuras que, a diferencia de las partes lisas; constituyen zonas retentivas, donde se produce el acumulo de biofilm sin que este pueda ser eliminado por barrido mecánico, es decir, la autoclisis. (4)

3.2. Disciplinas competentes:

El diente es un órgano duro, para poder cumplir con sus funciones, sin embargo, la parte dura, es decir la parte mineral del mismo tiene que ser sometida a un proceso de mantenimiento, y esto se hace a través de una parte orgánica; (5) en pocas palabras, hay dos tipos de tejidos en el diente, el tejido duro que comprende el esmalte y la dentina en la corona, en la raíz la dentina y el cemento, y por último la pulpa dental, que vendría a ser el tejido blando, la cual se aloja en la cámara pulpar, en la corona y en los conductos radiculares. (6)

De manera muy general podemos decir que es la cariología la que se ocupa de la parte dura del diente, del tejido con contenido mineral, por medio de la utilización de restauraciones y sean estas directas o indirectas, con el objetivo de poder mantener el diente lo más posible en un estado poco invasivo, sin embargo, cuando el proceso infeccioso avanza en profundidad y ya se afecta el tejido blando, es decir la pulpa dental, la lesión deja de ser competencia de la cariología y esta pasa a ser competencia de la endodoncia. (7)

3.3. Histología dental: el órgano dentinopulpar:

La endodoncia se ocupa del estudio, mantenimiento y tratamiento del órgano dentinopulpar, que como su nombre bien lo indica, se trata de un conjunto de estructuras que abarca la dentina y la pulpa dental, la misma que se divide en relación con la anatomía del diente en: la pulpa cameral, en la corona y la pulpa radicular, esta última ubicada en los conductos radiculares. (8)

La pulpa dental es una clase de tejido conectivo laxo especializado, la cual constituye el corazón de diente, ya que esta contiene el paquete vasculonervioso que le da las funciones nutricias y nerviosas del diente. (9)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La pulpa está constituida por 4 zonas que se unen dentro de una matriz; estas cuatro zonas están constituidas por la zona odontoblástica, la zona subodontoblástica u oligocelular de Weil, la zona rica en células y finalmente la zona central; estas cuatro zonas se encuentran dentro de una sustancia amorfa la cual se le va a dar el nombre de matriz o sustancia fundamental. (10)

De manera rápida podremos describir la zona odontoblástica, que viene a ser la zona más externa la cuál va a contener los cuerpos de los odontoblastos y va a tener la función de producir dentina a partir la predentina; este proceso se va a dar por medio de la síntesis de secreción y mineralización. en pocas palabras el cuerpo del odontoblastos va a recoger los insumos del centro de la pulpa para proceder a sintetizar una matriz constituida por glucoproteínas colágeno y sustancia fundamental, a esta sustancia se le va a denominar predentina la cual tiene la particularidad de tener una consistencia blanda y esta se va a mineralizar generando una dentina madura. (11)

La zona oligocelular de Weil va a contar con pocas células y muchas fibras, a esta zona la vamos a ubicar justo por debajo de la zona odontoblástica; la disposición de sus componentes va a determinar que está tenga en una vista al microscopio una forma de abanico. (12)

La zona rica en células es aquella que va a contar con una gran cantidad de fibroblastos, tomando en consideración que los fibroblastos son células multipotenciales que van a tener la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares lo que le confiere a la pulpa la característica de su alto nivel de cicatrización; teniendo en cuenta que mientras mayor es la edad de la persona se irá reduciendo la cantidad de fibroblastos, considerando así de igual forma una reducción en el nivel de cicatrización. (13)

La zona central va a contener tejido conectivo laxo, el paquete vasculonervioso, las células de defensa de primera línea que son los polimorfo nucleares neutrófilos, células responsables de llevar a cabo la respuesta inmune frente a una inflamación aguda; pero también vamos a encontrar a las células de defensa de segunda línea la cadena linfoplasmocitaria constituida por los linfocitos y los plasmocitos que son células de la inflamación crónica (14)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Como se mencionó líneas arriba capas descritas pulpares van a encontrarse dentro de una matriz o sustancia fundamental, una sustancia coloidal en forma de un gel que constituye la mayor parte de la pulpa; el origen de esta sustancia es a partir de la síntesis de componentes por parte del fibroblasto los fibrocitos y los odontoblastos siendo parte de estos el ácido hialurónico, el sulfato de condroitina, proteínas, carbohidratos y agua. (15)

Esta sustancia fundamental es la responsable de llevar a cabo la función de la oxigenación y nutrición, por medio de las arterias; quién tiene la función de la eliminación de sustancias de desecho a través de los vasos linfáticos y las venas. (16)

Mientras tanto, el segundo componente del órgano dentinopulpar es la dentina, la parte dura o tejido duro. (17)

La dentina se caracteriza porque tiene dos partes, la primera es una sustancia orgánica constituida principalmente por colágeno, pero también va a estar constituida por mucopolisacáridos, lípidos y ácido cítrico; el segundo componente va a hacer la sustancia inorgánica que va a estar compuesta por sustancias como son la hidroxiapatita, el carbonato de calcio y los fosfatos. (18)

La estructura básica de la dentina se da por la disposición de estructuras como son las prolongaciones odontoblásticas, los túbulos destinarios, el espacio periodontoblástico, la dentina peritubular e intertubular y finalmente la predentina. (19)

La dentina tiene una reacción de defensa natural estar constituida por un proceso de remineralización, ya que este tejido tiene la capacidad de poder modificar su contenido cálcico frente a determinados irritantes, este proceso de defensa se puede dar de manera natural o de manera inducida al aplicar sustancias por ejemplo el hidróxido de calcio, el óxido de zinc-eugenol y el fluoruro de estaño. (20)

3.4. Naturaleza de la Lesión Pulpar:

Los agentes causantes de la lesión pulpar corresponden a agentes de distintas naturalezas, como son los agentes físicos, los agentes químicos y finalmente los agentes biológicos. (21)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Dentro de los agentes físicos vamos a poder encontrar aquellos de naturaleza que generan una injuria de carácter mecánico, como por ejemplo iatrogenias al momento de realizar preparaciones, como tallados de pilares o conformación de cavidades para aplicación de resina; otro tipo de agentes físicos son los térmicos como por ejemplo el sometimiento del tejido pulpar a una temperatura mayor de 45°C lo que puede generar una hiperemia pulpar, que si no se corrige bien podría convertir esta lesión aguda reversible en una irreversible, también estímulos en relación a cambios bruscos de gravedad como por ejemplo es el caso de la Aerodontalgia. (22)

Dentro de los agentes químicos, vamos a encontrar a sustancias químicas que tienen un potencial tóxico que irrite el tejido, dentro de los cuales encontramos por ejemplo el ácido orto fosfórico que se utiliza para llevar a cabo el grabado acido en la aplicación de resinas. (23)

Finalmente, los principales agentes causantes de las lesiones pulpares son los agentes biológicos, es decir las bacterias, que pueden llegar a infectar la pulpa denaria de manera directa, es decir a través de una lesión cariosa directa o en su defecto, puede darse de forma indirecta, que implica una diseminación que puede darse por vía hematógena (a través de los vasos sanguíneos) o por el contrario a través de la vía linfática (vasos linfáticos). (24)

3.5. Mecanismos de la lesión pulpar

Cuando la etiología de la lesión pulpar es de carácter biológico, es decir, es producida por las bacterias, se producen una serie de sucesos hasta que se produce el daño irreversible en el tejido pulpar, los principales acontecimientos que se producen serán descritos de manera general en las líneas subsecuentes. (25)

Primeramente nos posicionamos en unas situación en la que el diente fue afectado por una lesión cariosa que llego a alcanzar una profundidad considerable, una vez atraviesa el límite amelodentinario comienza a darse una reacción inflamatoria en la pulpa, pero esto no debido a una invasión bacteriana, todavía no en este punto, sino que, esto se produce por las exotoxinas que segregan las bacterias hacia la pulpa; las bacterias como tal no pueden atravesar,

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

debido a la elevada defensa orgánica, ya que en este estado la pulpa aún se encuentra en un estado de vitalidad. (26)

Con la penetración de las toxinas bacterianas se produce una inflamación, más en concreto una inflamación aguda, la cual genera que se recluten a la zona inflamada a las células de la inflamación aguda, es decir los neutrófilos, además de las proteínas de fase aguda, si esto no basta para combatir el foco infeccioso, y transcurre el tiempo, esta inflamación aguda se convierte en una inflamación crónica, donde se da un cambio en el tipo celular encargado de la respuesta inmune, puesto que se activa la cadena lifoplasmocitaria, es decir se reclutan a linfocitos y plasmocitos.(27)

En este punto hay dos posibilidades, si se elimina la noxa, el tejido inicia un proceso de limpieza y regeneración bajo la acción de los macrófagos y fibroblastos; sin embargo, si la injuria persiste comienzan a aparecer puntos de necrosis por todo el órgano, los mismos que se extenderán más por el tejido y determinarán la muerte total de la pulpa, una vez que esto sucede, la defensa orgánica desaparece y por consiguiente se abre camino a las bacterias para que puedan iniciar la invasión de tejido necrótico, como resultado se produce una gangrena pulpar.(28)

3.6. Clasificación de las lesiones pulpares:

3.6.1. Estados Inflamatorios:

3.6.1.1. Reversibles:

Como el nombre lo indica, reversible, hace referencia a el hecho que, si se logra eliminar el estímulo injurioso, se podrá dar el restablecimiento al estado normal de la pulpa, dentro de este grupo de lesiones tenemos a la hiperemia y la herida pulpar. (29)

3.6.1.1.1. Hiperemia pulpar:

Esta es una lesión que se produce por agentes de carácter fisco, como una exposición prolongada a una temperatura mayor a la que fisiológicamente puede soportar la pulpa, se puede dar por varias causas, sobre instrumentación, falta de refrigeración, entre otras; esto genera que en la pulpa se produzca un incremento

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

en el volumen de sangre, la que genera una estasis sanguínea indicando de esta manera que la pulpa llego al límite de resistencia fisiológica. (30)

3.6.1.1.2. Herida pulpar:

Ese tipo de lesiones se produce por la falta del debido cuidado al momento de llevar a cabo una preparación, o en su defecto por una falta de pericia debido al nivel de experiencia del operador, se caracteriza por que se podrá evidenciar un hilo de sangre por haber causado un trauma en la superficie de la pulpa. (31).

3.6.1.1.3. Irreversibles:

Este grupo de lesiones se caracterizan por que, a diferencia del grupo anterior, retirar el estímulo injurioso no va a determinar que el órgano regrese a su estatus quo, es decir a su estado natural, esta se divide a su vez en función del tiempo transcurrido en lesiones agudas y en lesiones crónicas. (32)

3.6.1.1.4. Agudos:

Estas se caracterizan por su aparición espontánea, rápida. Corresponde a la pulpitis aguda serosa y la supurativa**.** (33)

a) Pulpitis aguda serosa:

Aguda serosa es una inflamación que se produce por falta de tratamiento, en cuanto a lo que corresponde a su etiología está puede ser causada por agentes físicos químicos o biológicos, lo que va a generar como sintomatología que exista un dolor inicial caracterizado por que puede ser provocado, agudo, localizado y pulsátil además de intermitente; Por otra parte encontramos un dolor final que es espontáneo y reflejo, es decir que puede extenderse a otras zonas del cuerpo como podrían ser los párpados en el caso de afectar el nervio dentario anterosuperior, la sien cuando se trata de una afectación del nervio dentario posterosuperior, el mentón cuando hablamos de una afectación del nervio dentario anteroinferior y finalmente el oído cuando se afecta el nervio dentario posteroinferior. Una característica del dolor es que se va a exacerbar con el frío el dulce la succión y la actividad física.(34)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

b) Pulpitis aguda supurativa:

En esta clase de lesiones, es decir en la pulpitis aguda supurativa vamos a encontrar una inflamación de la pulpa que se va a producir por la formación de abscesos superficiales y profundos en toda la extensión del tejido pulpar, la etiología de este tipo de lesiones va a ser eminentemente bacteriana, es decir se produce por las bacterias de la caries que van a migrar dentro de una cavidad, en cuanto a la sintomatología vamos a poder encontrar un dolor que es espontáneo, localizado, potente y bursátil además de continuo y persistente. el dolor será necesario retira la dentina reblandecida y generar un drenaje para que por este pueda escapar el pus y la sangre. El dolor se produce por un aumento de volumen que va a generar la compresión del plexo de Raschkow. (35)

3.6.1.1.5. Crónicos:

Estas se caracterizan por su aparición a largo plazo, abarca la pulpitis crónica ulcerosa y la hiperplásica**.** (36)

a) Pulpitis crónica ulcerosa:

La pulpa crónica ulcerosa va a ser una inflamación de la pulpa que se va a dar por una lesión expuesta lo que va a generar una úlcera, la teología de esta lesión va a ser causa de la acción de un agente físico químico o biológico, lo que va a generar una lesión que va a exponer la pulpa y esto a su vez va a generar la invasión de las bacterias como consecuencia se producirá la úlcera que se separará del resto de la pulpa por tejido de granulación. Dolor que se va a generar como sintomatología se caracteriza porque es un dolor a la compresión y a la succión. (37)

b) Pulpitis crónica hiperplásica:

La pulpitis crónica hiperplásica va a hacer una proliferación del tejido de granulación que va a salir expuesto por una cavidad abierta, este tipo de lesión se va a producir por una exposición lenta y progresiva en pacientes jóvenes que tengan una cavidad abierta y grande, Además de que exista una injuria crónica y suave. (38)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.6.2. Estados degenerativos de la pulpa:

Son una serie de cambios metamórficos que se producen en los elementos constituyentes de la pulpa son:

3.6.2.1. Degeneración cálcica:

Tratar la degeneración cálcica, es hablar de reemplazo de parte del tejido pulpar por tejido calcificado, a ese tejido calcificado se le va a dar el nombre de cálculo, nódulo o pulpolito, el que se va a caracterizar por tener la forma de una cebolla; es común que se forme en la pulpa de la cámara o también en la pulpa de los conductos. (39).

Asimismo, pueden encontrarse en dos estados que son libres o adheridos**.**

3.6.2.2. Degeneración Hialina:

La degeneración es también conocida como la degeneración vacuolar, y esta se produce por la preparación de cavidades o una incorrecta colocación de bases obturadoras, está se caracteriza por que existe una degeneración y posterior desaparición de los odontoblastos lo que va a dejar un espacio vacío que va a ser ocupado por linfa intersticial. (40)

3.6.2.3. Degeneración atrófica:

La degeneración atrófica va a ser la disminución de las células de la pulpa lo que por consecuencia va a producir un incremento de las fibras de colágeno lo que le va a dar a la pulpa un aspecto reticulado, como consecuencia la pulpa comenzará a perder sensibilidad. (41)

3.6.2.4. Degeneración Fibrosa:

La degeneración fibrosa es el reemplazo de las células de la pulpa por tejido fibroso lo que le va a dar el aspecto de una semilla con su raíz.(42)

3.6.2.5. Degeneración Grasa:

Degeneración grasa, tiene como principal característica el acumuló de grasa o de colesterol en las células de la pulpa.(43)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.6.2.6. Reabsorción interna de dentina:

La reabsorción interna de dentina va a ser producida por una intensa actividad osteoclástica linterna por un antígeno escondido, este antígeno es el neutrófilo.

Está se produce a partir de una degeneración vacuolar que se produce o genera a partir la succión del odontoblasto, el neutrófilo reconoce al odontoblasto como su límite natural y al no poder encontrarlo se encontrará directamente con la dentina a la cual no reconoce y comienza a fagocitarla.(44).

3.6.3. Muerte pulpar:

La muerte pulpar abarca dos estadios, la muerte propiamente dicha y la subsecuente invasión bacteriana en el tejido muerto, es decir la gangrena pulpar. (45)

3.6.3.1. Necrosis pulpar:

Hablar de necrosis, implica hablar de la muerte de la pulpa, la cual se va a producir gradualmente pasando por todos los estadios de la inflamación, esta se ve favorecida por la formación de trombos y toxinas de las bacterias lo que va a generar una hipoxia y finalmente va a generar alteraciones irreversibles; en un inicio se van a generar la formación de puntos de necrosis para posteriormente estos puntos de necrosis se extienden hasta producir la muerte total de la pulpa por la acción de agentes quimiotácticos. (46)

3.6.3.2. Gangrena pulpar:

La gangrena pulpar a diferencia de la necrosis pulpar implica hablar de un fenómeno que va a caracterizarse por la colonización bacteriana en la pulpa muerta. La pulpa necrótica que ya no tiene defensa orgánica, por consiguiente, las bacterias de la caries tienen la posibilidad de poder colonizar la pulpa muerta, lo que va a iniciar un proceso de descomposición y desintegración de albuminas la acción de los agentes intermediarios de la descomposición como son los compuestos amoniacos, las bases nitrogenadas. (47)

Aquí es donde ocurrirá una sucesión alogénica bacteriana, dónde se va a llevar a cabo una alteración en las bacterias que van a estar presentes en la estructura, ya que las bacterias que están presentes en un inicio son aerobias Gram positivas,

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

es decir bacterias que necesitan oxígeno para poder vivir; estás sustituidas por bacterias anaerobias Gram negativas, que no necesitan oxígeno para poder vivir, en las cuales van a tener un mayor nivel de virulencia en razón de que van a comenzar a secretar una serie de subproductos como consecuencia de su metabolismo. (48).

3.7. Actualización del diagnóstico endodóntico:

Se elaboraron las siguientes tablas a partir del artículo de la Conferencia de Consenso de la AAE sobre Terminología Diagnóstica: Antecedentes y Perspectivas. J Endod. 2009. (124).

Tabla 1

Terminología diagnóstica sobre Condiciones Pulpares

CONDICIONES PULPARES	
PULPA NORMAL	Una categoría de diagnóstico clínico en la que la pulpa está asintomática **(sin síntomas clínicos, caries ni fracturas)** y normalmente responde a las pruebas pulpares.
PULPITIS REVERSIBLE	Un diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos **(sensibilidad térmica) y/o** objetivos **(por ejemplo, caries o fractura, superficie expuesta del diente/raíz, restauraciones profundas, diente agrietado)** que indican que la inflamación debería resolverse **una vez que se elimine la agresión** y la pulpa vuelva a la normalidad.
PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA	Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos **(dolor persistente a los cambios térmicos durante un período prolongado)** y objetivos **(p. ej., caries o fractura, restauraciones profundas y dientes fracturados)** que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de cicatrizar. Descripciones adicionales: dolor térmico persistente, dolor espontáneo y dolor referido.
PULPITIS IRREVERSIBLE ASINTOMÁTICA	Un diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos **(sin síntomas clínicos y las respuestas a las pruebas térmicas están dentro de los límites normales)** y objetivos **(caries/fractura extensa que invade el espacio del canal pulpar)** que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de sanar.
TERAPIA INICIADA PREVIAMENTE	Una categoría de diagnóstico clínico que indica que el diente ha sido tratado previamente con terapia endodóntica parcial y **se requiere tratamiento adicional** (por ejemplo, **preparación del acceso** , pulpotomía, pulpectomía)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TRATADO PREVIAMENTE	Una categoría de diagnóstico clínico que indica que el diente ha sido tratado endodónticamente y los canales están obturados con diversos materiales de relleno distintos de los medicamentos intraconductos.
TRATAMIENTO PREVIO	Categoría de diagnóstico clínico que indica que el diente ha sido tratado previamente por terapia endodóntica parcial (por ejemplo, pulpotomía, pulpectomía)

Tabla 2

Terminología diagnóstica sobre Afecciones Periapicales / Perirradiculares

AFECCIONES PERIAPICALES / PERIRRADICULARES	
PERIODONTITIS APICAL SINTOMÁTICA	Inflamación, generalmente del periodonto apical o **perirradicular**, **de origen pulpar**, que produce síntomas clínicos que incluyen dolor al morder, percusión o palpación. Puede estar asociada o no a una zona radiolúcida apical.
PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA	La inflamación y destrucción del periodonto apical o **perirradicular**, **es decir de origen pulpar**, se presenta como una zona radiolúcida apical y no produce síntomas clínicos.
ABSCESO APICAL AGUDO	Una reacción inflamatoria **en el periodonto apical o perirradicular** a la infección y necrosis pulpar caracterizada por aparición rápida, dolor espontáneo, sensibilidad del diente a la presión, formación de pus e hinchazón de los tejidos asociados.
ABSCESO APICAL CRÓNICO	Una reacción inflamatoria **en la zona apical o perirradicular** a la infección y necrosis pulpar que se caracteriza por un inicio gradual, poca o ninguna molestia y la descarga intermitente de pus a través de un trayecto sinusal asociado.
OSTEÍTIS CONDENSANTE	Lesión radiopaca difusa que representa una reacción ósea localizada a un estímulo inflamatorio de bajo grado, generalmente observada en **el ápice o alrededor de las raíces** del diente.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.8. Lesiones Periapicales:

La progresión de lesión pulpar, generalas lesiones periapicales debido a una extravasación del contenido séptico al peri-ápice del diente como consecuencia de una sucesión de infección primaria (necrosis pulpar) e infección secundaria (gangrena pulpar).

Las alteraciones periapicales son una irritación del periodonto debido a una lesión pulpar. Esta se produce por los productos de la descomposición de la necrosis, lo que genera una infección primaria del periodonto. Posteriormente, se producirá una gangrena pulpar, que generará una infección secundaria por acción de las toxinas. (125).

3.8.1. Clasificación:

Las alteraciones periapicales pueden ser agudas, crónicas o de otro origen. Son agudas aquellas en las que se presentan cuadros como la periodontitis apical aguda y el absceso dentoalveolar agudo. Las formas crónicas incluyen el absceso dentoalveolar crónico, el granuloma y el quiste apical. También existen alteraciones periapicales de origen distinto, como las neoplasias de carácter hiperplásico o metaplásico.

La diferencia entre los procesos agudos y crónicos radica en que en los primeros existe dolor e inflamación, mientras que en los crónicos generalmente no hay dolor, pero sí destrucción ósea, observándose procesos osteolíticos importantes. (126).

3.8.2. Lesiones periapicales agudas:

a) Periodontitis apical aguda

Es una irritación del periodonto apical a través del conducto radicular, causada por un agente químico o biológico. Histopatológicamente, se encuentra un infiltrado inflamatorio agudo caracterizado por una gran cantidad de neutrófilos en el ápice, que genera edema por acumulación de líquido intersticial, lo que produce aumento de volumen.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

El diagnóstico se basa en la anamnesis del dolor, que suele ser localizado, pulsátil y de poca intensidad. Existe gran sensibilidad al masticar y al hablar. En el examen clínico, puede observarse extrusión dentaria. En las pruebas de vitalidad, hay respuesta a estímulos térmicos, pero no eléctricos. Radiográficamente, se observa aumento del espacio del ligamento periodontal. Se debe hacer diagnóstico diferencial con el absceso dentoalveolar agudo en fase inicial.

El tratamiento local consiste en la neutralización y apertura del conducto. Debe combinarse con tratamiento sistémico con antiinflamatorios durante 24 a 48 horas, seguido del tratamiento de conductos. (127).

b) Abscesso dento alveolar agudo

Es una alteración periapical caracterizada por la acumulación de pus en el tejido periapical, generada por agentes físicos, químicos o biológicos. Generalmente se debe a bacterias de baja virulencia, pero en gran cantidad, que transforman la inflamación en un proceso supurativo. También puede ser consecuencia de una intervención incorrecta, como la falta de neutralización o el uso de instrumentos contaminados.

Este proceso progresa del tejido blando al duro (hueso) y presenta varias fases evolutivas. El tratamiento es local y sistémico.

Histológicamente, se observa una reacción de agresión y defensa, con exudado que separa los tejidos blandos del hueso. (128).

- **Fase aguda**

  Se presenta compresión de las fibras del periodonto y destrucción ósea. Los signos y síntomas incluyen dolor espontáneo, pulsátil y localizado, extrusión y movilidad dentaria, congestión de mucosa, sensibilidad a la palpación y ausencia de vitalidad pulpar.

  El diagnóstico incluye examen clínico (caries, encía agrandada, dolor a la presión), pruebas de vitalidad (hipersensibilidad), y radiografía (engrosamiento periodontal).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tratamiento: apertura, neutralización, antibióticos (penicilina o amoxicilina). (128).

- **Fase de evolución**

Se observa tumefacción intra y extraoral, conocida como "cara de boxeador", por la inflamación difusa. Histológicamente, hay inflamación generalizada con mayor cúmulo de exudado.

Síntomas: dolor más intenso, edema duro y fijo, ausencia de vitalidad, mayor extrusión.

Diagnóstico: dolor que impide hablar o dormir, sensibilidad intensa. Radiografía muestra ligamento periodontal ensanchado.

Tratamiento: remoción adecuada, drenaje, antibióticos. (128).

- **Fase final**

Se caracteriza por la salida de pus tras perforación ósea y su difusión a tejidos blandos. Histológicamente, se halla una colección purulenta delimitada por tejido de granulación.

Síntomas: dolor moderado, extrusión, edema fluctuante, fiebre, halitosis, malestar general.

Diagnóstico: edema localizado, diente sin respuesta a estímulos térmicos ni eléctricos. Radiografía: engrosamiento del ligamento periodontal.

Tratamiento: drenaje quirúrgico, apertura, neutralización, antibióticos. (128).

3.8.3. Lesiones periapicales crónicas:

a) Absceso dento alveolar crónico

Es un proceso inflamatorio infeccioso de baja intensidad y larga duración, con pequeña colección purulenta. Causas: invasión lenta de bacterias, tratamientos incorrectos, o abscesos agudos no tratados.

Histológicamente: colección purulenta limitada por fibroblastos, capilares, infiltrado linfoplasmocitario y reabsorción ósea. Suele ser asintomático, aunque hay reabsorción ósea.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Diagnóstico: anamnesis, diente oscurecido, fístula dolorosa al drenar (signo patognomónico). Radiografía: rarefacción radiolúcida difusa.

Pronóstico: bueno para el diente, malo para la pulpa.

Tratamiento: necropulpectomía, retratamiento. (129).

b) Granuloma

Es la transformación del tejido periapical y el hueso alveolar en tejido de granulación. Se produce por equilibrio entre ataque (bacterias y toxinas de baja virulencia) y defensa (respuesta inmune elevada). Causa principal: mortificación pulpar.

Tipos:

- **Granuloma simple**: parte del proceso inflamatorio.
- **Granuloma epitelizado**: con proliferación de restos epiteliales de Malassez.

Histología: desintegración del tejido periapical, reemplazado por tejido de granulación; en granuloma epitelizado, cápsula formada por restos epiteliales.

Tres vías de evolución:

1. Desaparición al eliminar la causa.
2. Formación de absceso si disminuye la defensa.
3. Formación de quiste en granulomas epitelizados.

Diagnóstico: asintomático. diente oscurecido, sin sensibilidad ni movilidad. Radiografía: reabsorción ósea con imagen radiolúcida irregular, borde radiopaco.

Tratamiento: extracción de la pulpa.
Pronóstico: bueno para el diente, malo para la pulpa. (130).

c) Quiste apical

Lesión cavitaria con revestimiento epitelial interno y tejido conectivo externo. Se asocia a necrosis pulpar por toxinas o tratamientos incorrectos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Histología: cavidad con cristales de colesterina, infiltrado crónico, revestimiento epitelial. Puede generar osteítis condensante.

Origen:

- A partir de un granuloma epitelizado.
- Activación de restos epiteliales de Malassez.

Diagnóstico: ausencia de dolor, crecimiento lento, corona oscurecida. En casos avanzados, puede destruir la tabla vestibular y dislocar el ápice. No hay vitalidad. Radiografía: imagen esférica, radiolúcida, uniforme, bien delimitada, con cortical densa.

Tratamiento: necropulpectomía + apicectomía + curetaje apical. (131)

3.9. Tratamiento endodóntico:

El tratamiento endodóntico puede realizarse en una cantidad de citas variable y casi siempre se debe cumplir con el siguiente procedimiento clínico:

El operador examina el diente y procede a llevar a cabo el examen clínico y radiográfico, posteriormente se procede a la aplicación del anestésico. Una vez hecho esto, el operador debe instalar el aislamiento absoluto sobre el área para aislar al diente, valga la redundancia, y de esta forma mantenerlo limpio y sin riesgo de contaminación por la humedad relativa de boca. (49)

El operador realizara una apertura en la corona del diente. Se usan unos instrumentos muy específicos para limpiar la pulpa de la cámara y los conductos, y para preparar el espacio para la obturación. (50)

Después de realizar la preparación se tapará los conductos con un material biocompatible, generalmente gutapercha la que se inserta con un cemento para asegurar un sellado completo de los conductos. (51)

En algunos casos, se aplica una obturación temporal para tapar la apertura, puesto que, dependiendo del diagnóstico se colocó dentro del conducto un medicamento tópico como los compuestos halogenados o compuestos fenólicos. (52)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La obturación temporal se convertirá en definitiva antes de restaurar el diente, previo al retiro de la medicación. (53).

3.10. Medicación endodóntica:

Como su nombre lo indica la medicación intraconducto implica la aplicación del medicamento dentro del conducto radicular para que esta manera ejerza un efecto tópico, a nivel local, para de esta manera complementar la preparación mecánica y posteriormente puedes realizar la obturación definitiva.(54)

Se tiene que llevar a cabo con la aplicación de sustancias que puede ser antisépticas o asociaciones de medicamentos. (55)

3.10.1. Antisépticos:

Cuando hacemos referencia a los antisépticos, estamos haciendo hincapié en sustancias de naturaleza alogénica en pocas palabras va a generar un daño tisular, su acción y efecto son de carácter inespecífico. Cuando mencionamos a los antibióticos estamos hablando que van a tener un efecto y una acción selectiva sobre determinados microorganismos atacando distintas partes de la estructura conformacional de los mismos; en otras situaciones en las que tengan que llevar acabó asociaciones de sustancias por ejemplo juntar un antibiótico con otra sustancia que no lo es para llevar a cabo el tratamiento. (56)

Los antisépticos los vamos a agrupar en dos grandes categoría, en primer lugar estaríamos hablando de los derivados fenólicos dentro de los cuales van a ser el paramonoclorofenol, el timol, el cresol, el formocresol, etc.; los cuales van a compartir características comunes el nivel de concentración del fenol que va a ir alrededor del 30%, lo que explica su potente efecto tóxico, su duración limitada y su poca efectividad debido a que no tiene la capacidad de llevar a cabo la formación de vapores que puedan difundirse dentro del tejido. (57)

3.10.2. Eugenol:

Eugenol es una sustancia que tiene la característica de poseer un efecto sedante, al igual que poder inhibir los impulsos nerviosos; mismo va a tener la particularidad de ser irritante por lo que se va a tener que considerar que su uso está contraindicado en casos de biopulpectomia en este caso puede generar una

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

necrosis y también una inflamación apical, Asimismo se contraindica su uso en las necrosis dado que su poder bactericida no llega a ser lo suficientemente potente como para poder llegar a eliminar la totalidad de las bacterias en la estructura infectada. (58)

3.10.3. Formaldehido:

Esta sustancia va a tener una concentración que va a variar entre el 19% y el 37%, razón por la cual es volátil, esta particularidad es lo que le permite generar la formación de vapores que se difundan los tejidos, es citotóxico, es mutagénico, carcinogénico y tiene la capacidad de generar una muy intensa necrosis periapical. (59)

3.10.4. Paramonoclorofenol:

Este es un compuesto que tiene propiedades antisépticas, bactericidas, antifúngicas, anestésicas y desinfectantes que afectan la síntesis de proteínas lo que va a generar una baja reacción textural, en cuanto a su obtención este compuesto deriva del fenol los cuales son átomos de cloro a los cuales se les agregó un hidrógeno y van a utilizarse para el tratamiento de los conductos radiculares infectados, sea el origen del proceso infeccioso, una infección pulpar o en su defecto una infección de carácter periodontal. (60)

3.10.5. Formocresol

Es un medicamento que está indicado para poder tratar los conductos dentales infectados ya que va a tener la capacidad de fijar la pulpa viva y también va a tener efectos antibacterianos, en su composición va a estar constituido por un 19% de formaldehído, un 35% de Crisol, 15% de glicerina y agua. (61)

3.10.6. Alcoholes

En algunas ocasiones se utiliza alcohol etílico y alcohol isopropílico lo que va a generar como efecto una desnaturalización de proteínas; tomando en consideración que son más potentes los efectos del alcohol propílico sobre el alcohol etílico. (62).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.10.7. Los compuestos halogenados:

También conocidos como halógenos, van a ser sustancias que tiene la capacidad de generar daño tisular dentro de los cuales vamos a encontrar a él yoduro potásico yodado que es un antiséptico de baja toxicidad, que va a tener la capacidad de generar vapores los cuales le van a dar un alto efecto antimicrobiano, por otra parte también vamos a encontrar al cloro cloramina-T que va a ser un efectivo antimicrobiano va a neutralizar toxinas y va a tener la capacidad también de disolver materia orgánica por lo que su acción es rápida, desodorizante y blanqueante; el gluconato de clorhexidina va a ser un antimicrobiano de amplio espectro que va a tener poca toxicidad y va a generar una liberación del principio de manera lenta y progresiva, finalmente estaríamos hablando del hidróxido de calcio que va a ser una sustancia que si bien no es considerada un antiséptico en sentido estricto va a tener la capacidad de lisar bacterias. (63)

3.10.8. Asociaciones:

En esta clase vamos a poder encontrar sustancias que van a combinarse con otras con el objetivo de poder potenciar sus efectos estamos hablando tales como por ejemplo el Otosporin, que va a hacer la combinación de corticosteroides y antibiótico. (3)

3.11. Hidróxido de calcio:

A esta sustancia se le denomina cal apagada o cal hidratada, es un compuesto que se va a obtener de dos formas por la hidratación del dióxido de calcio, así como también es sub producto de la manipulación del Cloruro de calcio con el hidróxido de sodio; Existen tres procesos por las cuales se puede llegar obtener el hidróxido de calcio: (64)

- Apagado con poca agua, en este caso estamos hablando de una hidratación seca que genera un polvo como resultado del proceso.
- Apagado con mediana cantidad de agua, de este proceso se va a obtener la pasta.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Apagado con abundante agua, por último, en este caso se va a obtener una suspensión de naturaleza líquida.

A grosso modo se puede considerar que las aplicaciones del hidróxido de calcio van a ser variadas en actividades industriales por ejemplo la manufactura de pesticidas, en actividades de la construcción se llega a utilizar el hidróxido de calcio como un mecanismo para poder estabilizar los sueldos, en materia ambiental el hidróxido de calcio va a tener una función de tratamiento de aguas así como también poder llegar a un tratamiento para el agua potable, en la agricultura se va a utilizar esta sustancia materia prima para poder diseñar fertilizantes alimentación y finalmente campo que nos interesa explica su utilización práctica en el área de la salud, dónde se va a utilizar para llevar a cabo la medicación intraconducto para poder llegar generar la antisepsia del conducto. (65)

Hidróxido de calcio como medicación endodóntica intraconducto va a tener como componentes al ion calcio y al ion hidroxilo.

El ion de calcio se va a caracterizar porque va a tener propiedades higroscópicas, es decir va a reducir el estado de su fase liquida debido al proceso de capilaridad evitando de esta manera la formación de óxidos, también va a aumentar el umbral de los impulsos nerviosos, con lo que va a contrarrestar la sensación de dolor. También busca propiciar una regeneración tisular incrementando el número de divisiones celulares es decir va a tener una acción mitogénica. (66)

Por otra parte, el ion hidroxilo responsable de su acción antimicrobiana esto debido a el pH alcalino que tiene la sustancia, de la misma forma va a tener un efecto mineralizante que va a activar enzimas que favorecen la mineralización como son la fosfatasa alcalina, la adenosina trifosfato, entre otras. Lo anteriormente mencionado va a determinar que su aplicación clínica se ve como una sustancia antiinflamatoria, antihemorrágica, función de desnaturalización de proteínas de la bacteria, lo que va a reducir la inflamación apical, función formadora de ápices incompletos, de la misma forma también se utiliza para llevar a cabo la realización de tratamientos preventivos como los recubrimientos pulpares, directo o indirecto. (67)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Los requerimientos que usar recubrimiento pulpar directo radican en que el hidróxido de calcio se aplicará directamente sobre la pulpa donde no existe algún tipo de dentina, mientras tanto el recubrimiento pulpar indirecto, se llevará acabo sobre una cubierta de dentina que aún no llego a exponer la pulpa. (68)

La naturaleza de este compuesto no corresponde a un antiséptico convencional, pero sí frente a un bactericida que va a tener la capacidad de poder lisar bacterias, las características físicas el hidróxido de calcio nos muestra a un compuesto en forma de polvo blanco, que va a tener un PH alcalino el cual es de 12.5 y también va a ser insoluble en agua y alcohol. (69)

Dentro de las propiedades generales del hidróxido de calcio encontramos las antimicrobianas, que se consiguen transcurrido 10 minutos, los 7 días se genera la asepsia total del conducto, lo que genera que en las bacterias se produzca un daño Irreversible en la membrana y el ADN también una desnaturalización de sus proteínas; Por otra parte la propiedad de favorecer la posición de tejidos calcificados, capacidad del hidróxido de calcio para poder llevar a cabo la remineralización de la dentina reblandecida. Y por último también cuenta con la propiedad de tener una alta tensión superficial. (70)

Los efectos del hidróxido de calcio van a depender del tipo de vehículo que se ha utilizado para poder ser aplicado, en el caso de un vehículo acuoso, como por ejemplo el agua, una solución salina anestesia, genera una rápida liberación de iones; Por otra parte, si se utiliza un vehículo viscoso como podría ser la glicerina, propilenglicol o polietilenglicol, como resultado se obtiene una pasta va a retardar la liberación de iones pero que va a generar un efecto por más tiempo. Y por último un vehículo aceitoso, como podría ser el aceite de oliva, el ácido oleico o ácido linoleico va a impedir la difusión a través de los tejidos. (71).

3.12. Microbiología de la lesión pulpar:

3.12.1. Principal etiología de la lesión pulpar:

Los microorganismos juegan un papel trascendental en el desarrollo y progresión de las patologías de naturaleza pulpares y periapical. Normalmente la pulpa en

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

condiciones estériles participa en la producción de dentina y en la sensibilidad del diente. (72)

Una lesión de la pulpa puede desencadenar una respuesta inflamatoria. Hay que tomar en cuenta que, si bien los irritantes pueden ser de naturaleza física, química o biológica, los microorganismos son considerados el principal agente etiológico. Dichas patologías suelen ser un resultado directo o indirecto de la presencia de bacterias y otros microorganismos en el medio bucal. (73)

En virtud de que los microorganismos desempeñan un papel primordial en la patogénesis de las lesiones pulpares y perirradiculares es indispensable manejar los fundamentos de la microbiología endodóntica. (25)

La pulpa y la dentina forman un complejo, el órgano dentino-pulpar, el cual es protegido tanto por sustancias exógenas de la cavidad bucal como por estructuras dentarias. Cuando el complejo dentino-pulpar es infectado, los tejidos reaccionan en contra de los microorganismos invasores a fin de eliminarlos. La capacidad de este complejo de realizar esta función no ha sido subestimada, ya que los tejidos están dotados con mecanismos inmunocompetentes. Sin embargo, si la infección no es erradicada a través de esos procesos naturales o procedimientos operatorios, los microorganismos invaden el complejo dentino-pulpar venciendo las defensas y causando la enfermedad pulpar, produciendo la infección de la cámara y conductos pulpares. (74)

El sistema de conductos radiculares está en estrecha comunicación con los tejidos periapicales por el foramen apical, los conductos laterales y accesorios. Por tal motivo los metabolitos y productos tóxicos que son producidos principalmente por las bacterias se difunden a los tejidos periapicales generando una respuesta inflamatoria como la periodontitis apical, la cual se caracteriza por provocar una resorción del hueso.

La invasión de los túbulos dentinarios por microorganismos ocurre cuando la dentina está expuesta al medio bucal, esto puede ocasionarse por lesiones de caries, procedimientos restauradores o periodontales, fisuras de esmalte o dentina, o traumatismo dental. El avance de esta lesión generara la lesión pulpar. (75).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.12.2. Microecología endodóntica:

El medio endodóntico es un sistema complejo y dinámico.

- Complejo, púes tenemos el conducto radicular, con sus características particulares en cuanto a forma y disposición (conductos amplios, atrésicos, curvos, rectos, deltas apicales, etc.) conforman una red de "microambientes" de difícil acceso y que favorecen el crecimiento de microorganismos.

- Dinámico, pues los microorganismos implicados en una lesión inicial de la pulpa no serán los mismos que se encuentren en una necrosis pulpar, en donde se constituye un ecosistema radicalmente diferente, el cual está sujeto a la sucesión microbiana. (76)

Para poder entender que es la sucesión microbiana, es necesario considerar un proceso mediante el cual se produce un cambio de microorganismos por alteraciones en el hábitat. Por lo tanto, un cambio en cuanto a la composición de la flora bacteriana se produce por una alteración radical del medio ambiente endodóntico en pulpas recientemente infectadas, donde la mayoría de las bacterias son aerobias Gram positivas. (77)

Con la progresión de la infección, estas bacterias van consumiendo el oxígeno del medio y las condiciones del conducto se van alterando, favoreciendo el desarrollo de anaerobios estrictos, siendo la mayoría de éstas Gram negativas y proteolíticas. (78)

Las características de estas bacterias, como son, Prevotella, Porphyromonas y Fusobacterium, es su ubicación inicial en el periápice, región de la cual pueden obtener fácilmente el exudado rico en contenido proteico y en donde las condiciones de anaerobiosis son las más propicias para su desarrollo. Con la progresión hacia necrosis, el exudado pasa a todo el canal, aportando el contenido proteico y facilitando el predominio de este tipo de bacterias a lo largo del conducto. Toda infección endodóntica es de carácter polimicrobiano. (79)

3.12.3. Condiciones para considerar en un patógeno endodóntico:

- Deben estar presentes en cantidades suficientes para iniciar y mantener una lesión periapical.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Deben poseer factores de patogenicidad, que se expresen en el proceso infeccioso.
- Deben localizarse en el canal radicular para que sus factores de patogenicidad alcancen los tejidos periapicales.
- El canal radicular debe permitir la supervivencia y desarrollo de los microorganismos.
- Las relaciones antagónicas microbianas no deben darse o deben ser pocas.
- El huésped debe defenderse, reduciendo la infección, lo que puede generar el daño periapical.
- Los microorganismos de la microflora oral coexisten en ecosistemas primarios, regulados por una serie de factores conocidos como determinantes ecológicos que son de cinco tipos:
  - Fisicoquímicos
  - De adhesión, agregación y congregación
  - Nutricionales
  - Protectores del huésped
  - Antagónicos Interbacterianos. (80)

3.12.3.1. Fisicoquímicos:

a) Humedad

Las bacterias necesitan de ella para llevar a cabo el intercambio de nutrientes, para que se desarrolle las reacciones metabólicas y para la eliminación de productos de desecho. (81)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

b) pH

En la cavidad oral oscila entre 6.7 y 7.5, pero constantemente está sometido a variaciones, estas afectan el metabolismo bacteriano. (82)

d) Temperatura

La temperatura oral es de a los 37º C aproximadamente, pero puede variar transitoriamente por la ingesta de alimentos calientes o fríos por lo que se produce la eliminación de microorganismos de forma transitoria. (37)

e) Potencial de óxido-reducción

El hábitat de los microrganismos anaerobios tiene una baja tensión de oxígeno y un potencial de óxido reducción disminuido, esto es resultado su actividad metabólica en la que se consume oxígeno. (37)

3.12.3.2. Factores de Adhesión, Agregación y Congregación

a) Adhesión

Es la interrelación que se da entre los microorganismos y el huésped, dando lugar a la colonización tisular. (83)

b) Agregación y Congregación:

Se refiere a la unión entre bacterias de la misma o diferente especie respectivamente lo que permite la formación de colonias.

El mayor potencial de congregación lo tiene el Fusobacterium Nucleatum. (84)

c) Nutricionales

Los microorganismos endodónticos obtienen sus nutrientes de tres fuentes distintas:

- De los tejidos o secreciones del huésped (fuentes endógenas),
- De otros microorganismos (fuentes Interbacterianos)
- De la dieta alimenticia (fuentes exógenas). (85)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

d) Protectores del huésped

Son factores que limitan el ingreso, penetración y colonización bacteriana como es el caso de integridad de mucosas y del tejido dental, masticación, deglución, tejidos linfoides, y por último la saliva por su acción mecánica, química e inmunitaria. (86)

e) Antagónicos Intermicrobianos

A nivel microbiano se dan relaciones entre especies bacterianas que determinan la supervivencia de unas y la eliminación de otras, esto es lo que determina el tipo de microflora. (87)

3.12.4. Modelos de relación microbiana

Un ecosistema oral, es una comunidad microbiana que habita en la cavidad oral, donde existen relaciones entre las diferentes especies. Las relaciones que se dan entre las bacterias pueden ser:

- **Relaciones positivas**

  En estos dos microorganismos obtienen ventaja de la asociación. Las principales son el mutualismo o simbiosis. (88)

- **Relaciones neutras**

  En esta relación, ninguna de las especies se ve afectada. La principal es el comensalismo, en la que ninguno de los microorganismos genera un perjuicio a la otra especie. (89)

- **Relaciones negativas**

  En este tipo de relaciones, un microorganismo se ve favorecido, mientras otras especies se ven perjudicadas. La principal relación es la antibiosis o antagonismo que se presenta cuando un microorganismo impide el crecimiento de otro, obteniéndose una ventaja ecológica por que se disminuye la competencia. Esto se da por la producción de bacteriocinas que son sustancias inhibitorias del crecimiento de otras bacterias, entre las que se pueden destacar las mutacinas producidas por algunas cepas de *Estreptococos mutans* orales.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La depredación es otra relación negativa que se da cuando uno de los microorganismos mata al otro y se alimenta de él, también encontramos al parasitismo que consiste en que una de las especies vive en o sobre la otra obteniendo beneficio del hospedador en perjuicio de éste. Un ejemplo de relación negativa es la que se da cuando los estreptococos orales producen peróxido de hidrógeno, lo que genera toxicidad sobre en otras bacterias que carecen de sistemas desintoxicantes. (90)

Los lactobacilos y los estreptococos son importantes productores de bacteriocinas, que juegan un papel muy importante en la ecología de la microflora de la mucosa oral. Esta producción de bacteriocinas puede inhibir el acceso de bacterias exógenas a la cavidad oral y al tracto respiratorio.

De esta forma se ha observado que, las interacciones microbianas tanto positivas como negativas, pueden regular la presencia de diferentes especies microbianas en el mismo nicho. (91)

Se han logrado reportar asociaciones bacterianas en conductos dentarios necróticos, entre estas el *Fusobacterium nucleatum* con *Peptostreptococcus micros, Selenomonas sputigena, Campylobacter rectus* y *Porphyromonas endodontalis*. El *Prevotella intermedia* es afín a *Peptostreptococcus micros, Peptostreptococcus anaerobius* y Eubacterium spp; así mismo Porphyromonas *endodontalis* inhibe el crecimiento de *Prevotella intermedia*.

Algunas combinaciones bacterianas resultan más potentes que otras, por ejemplo, la asociación de *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* y *Peptostreptococcus*, incrementan la destrucción periapical. Desde un punto de vista experimental la inducción de infecciones radiculares en monos utilizando únicamente *Enterococcus faecalis*, indujo una modesta destrucción periapical en comparación con la combinación entre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus milleri* y a*ctinomyces bovis*, donde se demostró que la infección es más agresiva. (92)

3.12.5. Actividad Enzimática Bacteriana.

La microbiota endodóntica está representada, principalmente, por microorganismos Gram negativos, los cuales viven, se multiplican y

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

eventualmente mueren en el conducto infectado, liberando endotoxinas. La actividad endotóxica está relacionada con la presencia y el número de bacterias Gram negativas en el canal radicular, pueden superar el foramen apical e iniciar una lesión a ese nivel. (93)

Las endotoxinas son las sustancias responsables de los mecanismos inflamatorios en la pulpa. Dichas sustancias son liberadas al medio después de la desintegración de la bacteria, lo que produce fiebre o estimulación de la actividad linfocítica. (94)

Algunos microorganismos anaerobios producen enzimas extracelulares como la colagenasa y proteasas que al parecer estimulan la invasión bacteriana de los tejidos. (20)

3.12.6. Principales microorganismos relacionados a enfermedades pulpares

- Fusobacterium nucleatum:

  Son bacterias pleomorfas que aparecen con formas muy variables como en huso, globulosas, redondeadas, finas, etc. esta bacteria es medianamente sacarolítica, porque sintetizan material de reserva a partir de glucosa. Sus fuentes nutricionales y energéticas provienen del catabolismo de péptidos y aminoácidos, generando acido butírico. Puede aislarse como hábitat primario en la cavidad oral y además aislarse del intestino, vías respiratorias, aunque se encuentra por lo general en el surco gingival.

  Los factores de virulencia de *F. nucleatum* no están claramente definidos, pero se relaciona con la endotoxina, leucotoxina, que inhiben la quimiotaxis de los neutrófilos, fosfatasas, etc. Así mismo su capacidad de coagregarse con otras bacterias favoreciendo los procesos de colonización, también se sabe que los ácidos y el amoniaco obtenido a partir de aminoácidos son tóxicos tisulares, también producen los compuestos de la halitosis. (95)

- *Porphyromonas gingivalis*:

  Comprende bacterias asacarolíticas (glucólisis) porque carecen de enzimas glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa y gluconato-6-fosfato-deshidrogenasa. Por esta razón usan compuestos nitrogenados como fuentes energéticas. Este microorganismo se encuentra en el surco gingival, en lesiones

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

periodontales avanzadas; otras veces se encuentra en el dorso de la lengua, amígdalas y saliva en estado de disbiosis por lo que es un patógeno exógeno. A dicha bacteria se la relaciona con multitud de procesos patológicos como gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales.

Algunos de sus factores de virulencia:

- Capsula, son un conjunto de polisacáridos tiene una acción anti fagocitaria.
- Membrana externa, posee proteínas que se comportan como adhesinas que participan en fenómenos de adhesión y coagregacion bacteriana y por lo que ayuda en la formación de placa subgingival.
- Lipopolisacárido (LPS) son endotoxinas que atraviesan las barreras impermeables de las células.
- Fimbrias son proteínas de la membrana externa que se comportan como adhesinas e intervienen en fenómenos de coagregacion y adhesión.
- Proteasas son enzimas proteolíticas que se asocian a la membrana externa o son transportadas a distancia por vesículas. Algunas de las más importantes son agresinas e impedinas, desempeñan un papel importante en el surco gingival para producir periodontitis.
- Otros compuestos proteicos como el superóxido dismutasa, que permite resistir la acción oxidativa de los radicales generados en el interior de los leucocitos polimorfonucleares. Otras exoenzimas son hialuronidasa, fosfatasa alcalina; y epiteliotoxina.
- Metabolitos tóxicos tisulares como ácidos grasos, amoniaco, compuestos azufrados volátiles, metilmercaptano, que aumenta la permeabilidad de mucosas.
- Moléculas antibacterianas como bacteriocinas. (96)

- *Prevotella spp.*

Comprende bacterias sacarolíticas resistentes a la vancomicina. Dentro de esta se encuentran las sub especies *P. melaninogenica, P. intermedia, P.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

nigrescens, P. corporis, P. loescheii, P. pallens, se relacionan con infecciones pulpares, absceso periapical, alveolitis, etc. En la mayoría de los casos participarían en estos procesos otras bacterias de carácter sinérgico, así también se ha comprobado la capacidad para degradar inmunoglobulinas, toxicidad sobre fibroblastos y su actividad fibrinolítica.(97).

- *Peptostreptococcus spp:*

  Son cocos de cadenas cortas o emparejados y Gram positivos, carentes de esporo, son de naturaleza anarobia y su principal factor de virulencia es la colagenasa y betalactamasa. Se encuentran en procesos infecciosos supurados polimicrobiano en el cerebro y los senos, pleuropulmonares, peritoneales, etc. también se encuentran en lesiones de caries de dentina, periodontitis, abscesos dentales, conductos infectados, etc. (98)

- *Estreptococos mutans*:

  Lo encontramos en individuos con caries activa o especialmente en sujetos con predisposición. Es considerado el microorganismo cariogénico por excelencia debido a su especial capacidad de colonizar superficies duras. Igualmente, su papel es trascendente en endocarditis subagudas.

  Tiene proteínas asociadas a la mureína conocidas como antígenos I y II estas proteínas u otras similares participan en procesos adhesivos:

  a) Como adhesinas interactuando con receptores de la película adquirida, tales como proteínas de prolina.

  b) Como glucosiltransferasas y receptoras de glucano en fenómenos agregativos y coagregativos.

  Sus principales factores de virulencia son:

  - Polisacáridos intracelulares.
  - Síntesis de polisacáridos extracelulares
  - Movilización de polisacáridos intracelulares y extracelulares solubles
  - Poder aciógeno, acidófilo y acidurico,

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Adhesión a proteínas, para superficies duras.
- Producción de bacteriocinas, que determinan el tipo de microbiota. (99)

- *Enterococcus spp*:

  El patógeno más relevante en humanos es el *Enterococcus faecalis*, seguida de *Enterococcus faecium*. Se asocian en parejas y cadenas cortas; sus factores de virulencia no son muy bien conocidos. Su hábitat es el intestino. Producen una gran variedad de procesos infecciones extraorales Por su metabolismo anaerobio son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos, las cepas muestran altos niveles de resistencia por la producción de enzimas inactivantes. (100)

- *Candida albicans*:

  Las especies *Candida* crecen como células de levaduras con gemación en la mayoría de las condiciones y en casi todas las temperaturas, crecen en condiciones de anaerobiosis.

  Los microorganismos del género *Candida* son oportunistas se encuentran como comensal en la cavidad bucal, intestino, vagina, secreción bronquial y piel.

  Este hongo es causante de diferentes enfermedades en humanos, las cuales generalmente se produce por tres mecanismos: por invasión de cepas colonizantes del tracto gastrointestinal ola piel; como consecuencia de transmisión vertical en el neonato o en raras ocasiones por trasmisión horizontal además esta especie puede llegar a producir infección cuando el hospedero tiene algún factor predisponente y de esta manera ocasionar un grupo de manifestaciones clínicas que pueden presentarse en la zona cutánea.

  Los principales factores de virulencia para colonizar tienen como propósito resistir o desviar los mecanismos de defensa del organismo, lo que le permiten iniciar el proceso de formación de biopelículas.

  El *Candida albicans* es un microorganismo muy versátil, por su capacidad para sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos. (101)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- *Filifactor alocis:*

  Es un bacilo, no esporulado, anaeróbico obligado, Gram negativo, algunas cepas han demostrado algún tipo de movilidad esto sin observar flagelo alguno. Los principales productos metabólicos son pequeños a moderadas cantidades de butirato y acetato.

  Las cepas de estas especies muestran un mínimo crecimiento y no reaccionan a pruebas bioquímicas y es muy utilizado para la diferenciación de otras especies de Fusobacterium. (102)

3.13. Enterococcus faecalis:

3.13.1. Definición:

Es un coco anaerobio facultativo Gram positivo que habita el tracto gastrointestinal y genitourinario femenino, que tiene un comportamiento comensal y oportunista, esta habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. (103)

Tiene la capacidad de causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente nosocomial. Con el tiempo ha adquirido resistencia a diversos medicamentos por su alto nivel de oxido reducción. (104)

Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia indica falta de higiene en conservación, excepto en alimentos en los que interviene como agente de procesos fermentativos, en el caso del queso, etc.

Se caracteriza por tener mucha resistencia en ambientes de congelación, desecación, tratamiento térmico, etc. (105)

La mayoría de sus cepas son homofermentativas, no producen gas, no poseen enzimas citocrómicas y se obtiene ácido láctico como subproducto de la catalización de glucosa. En su pared celular tiene el antígeno del grupo D y un ácido lipoteicoico intracelular asociado a la membrana citoplasmática. (106)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.13.2. Características:

Es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. Puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal. (107).

3.13.3. Patogenicidad

Puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo y el sistema nervioso. Tiene resistencia a medicamentos como aminoglucósidos, aztreonam, cefalosporina, clindamicina, las penicilinas semisintéticas. (108)

3.13.4. Factores de virulencia:

Son elementos que contribuyen a su capacidad de adhesión, citotoxicidad y la invasividad. Los más importantes son:

- efaA (endocarditis specific antigen A)
- asa1 (aggregation substance)
- esp (enterococcal surface protein)
- cylA (cytolysin)
- hyl (hyaluronidase)
- gelE (gelatinase)

Las cepas de *E. faecalis* que causan endocarditis acumulan más factores de virulencia que las que causan bacteriemia. (109).

3.14. Antecedentes Investigativos

3.14.1. Antecedentes Internacionales:

- **Título:** Expresión de la proteína de membrana celular de *Enterococcus faecalis* V583 ante el estrés alcalino
- **Autores:** Peter Cathro, Peter McCarthy, Peter Hoffmann, Stephen Kidd, Peter Zilm
- **DOI:** 10.1093/femsle/fnac082
- **Link**: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36044998/

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Resumen:** *Enterococcus faecalis* es capaz de adaptarse a condiciones alcalinas y se recupera comúnmente de dientes en los que ha fallado el tratamiento endodóntico. El papel que las proteínas de membrana de *E. faecalis* juegan en las estrategias de supervivencia a condiciones alcalinas extremas no está claro. Cultivamos *E. faecalis* V583 en un quimiostato a pH 8 y 11 a una décima parte de la tasa máxima de crecimiento relativa del organismo. Después del afeitado de la membrana, se añadieron etiquetas de proteínas codificantes de isótopos a nivel de péptidos a las muestras y luego se combinaron. La proporción relativa de proteínas de membrana se identificó mediante espectrometría de masas LC-ESI y análisis MaxQuant. Las proporciones de proteínas de membrana se transformaron en log, y las proteínas que se desviaron en más de 1 DE de la media se consideraron reguladas al alza o a la baja. Un total de seis proteínas se regularon al alza en pH 11, incluidas: EF0669 (familia de biosíntesis de polisacáridos); EF1927 (facilitador de la recaptación de glicerol) y EF0114 (glicosil hidrolasa). Se observó una regulación negativa de cinco proteínas: EF0108 (transportador de dicarboxilato de C4); EF1838 (componente IIC del sistema PTS); EF0456 (componente IID del sistema PTS); y EF0022 (componente IID específico de la manosa de PTS). En condiciones alcalinas extremas, las proteínas de membrana de *E. faecalis* parecen estar implicadas en un cambio del metabolismo de carbohidratos del sistema PTS al glicerol, lo que favorece la formación de una cápsula protectora que protege la célula.

  Palabras clave: pH alcalino, biopelícula, cultivo continuo, *Enterococcus faecalis*, ICPL, afeitado de membrana(4)

- **Título:** Análisis proteómico de infecciones endodónticas mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

- **Autores:** R. Nandakumar, N. Madayiputhiya, AF Fouad

- **DOI:** 10.1111/j.1399-302X.2009.00520.x

- **Link**: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19572900/

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Resumen:**

Introducción: Las infecciones endodónticas son muy prevalentes y presentan una etiología polimicrobiana caracterizada por interrelaciones complejas entre los microorganismos endodónticos y las defensas del huésped. El análisis proteómico de las infecciones endodónticas puede proporcionar información global sobre la invasión, los mecanismos de patogenicidad y las interacciones multifactoriales existentes entre las bacterias del conducto radicular y el huésped en el inicio y la progresión de la periodontitis apical. El propósito de este estudio fue aplicar técnicas proteómicas como la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de proteínas de origen bacteriano presentes en las infecciones endodónticas.

Métodos: Se obtuvieron muestras endodónticas de siete pacientes con infecciones del conducto radicular de forma aséptica. Las mezclas de proteínas se sometieron a digestión tripsínica en solución y se analizaron mediante nano-LC-MS/MS de fase reversa, seguida de una búsqueda en bases de datos.

Resultados: En todas las muestras analizadas se identificaron proteínas, principalmente de origen de la pared celular o de la membrana, provenientes de bacterias endodónticas, especialmente *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola.* Las proteínas identificadas incluyeron adhesinas, autolisinas, proteasas, factores de virulencia y proteínas de resistencia a antibióticos.

Conclusiones: La LC-MS/MS ofrece una plataforma analítica sensible para estudiar los procesos patológicos en el entorno del conducto radicular. La variedad de proteínas expresadas en las infecciones endodónticas refleja la compleja presencia microbiana y destaca las especies bacterianas implicadas en el proceso inflamatorio. (5)

- **Título:** Identificación e imágenes de péptidos y proteínas en biopelículas de *Enterococcus faecalis* mediante espectrometría de masas por desorción-ionización láser asistida por matriz

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Autores:** MT. Melvin Blaze, Berdan Aydin, Ross Carlson, Luke Hanley.
- **DOI:**10.1039/c2an35922g
- **Link:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654527/
- **Resumen:** El heptapéptido ARHPHPH se identificó a partir de biopelículas y cultivos planctónicos de dos cepas diferentes de *Enterococcus faecalis*, V583 y ATCC 29212, utilizando espectrometría de masas de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS). ARHPHPH también se visualizó en el límite de biopelículas adyacentes cocultivadas de *E. faecalis* y *Escherichia coli* (ATCC 25922), apareciendo solo en el lado de *E. faecalis*. ARHPHPH fue proteolizado a partir de κ-caseína, un componente en el medio de crecimiento, por microbios de *E. faecalis*. Además, se combinaron enfoques proteómicos de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba para identificar y localizar espacialmente múltiples proteínas dentro de biopelículas intactas de *E. faecalis* V583 mediante MALDI-MS. Los datos de EM en tándem resultantes se compararon con la base de datos NCBInr de *E. faecalis* V583 para identificar trece proteínas citosólicas y de membrana asociadas funcionalmente con la superficie celular. Dos de estas proteínas, la enolasa y la GAPDH, son enzimas glucolíticas que desempeñan múltiples funciones en la virulencia bacteriana de cepas bacterianas relacionadas. Este trabajo ilustra un enfoque eficaz para el descubrimiento y la localización de múltiples péptidos y proteínas dentro de biopelículas intactas. **(**6)

3.14.2. Antecedentes nacionales:

No se han encontrado antecedentes nacionales.

3.14.3. Antecedentes locales:

No se han encontrado antecedentes locales.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis Nula:

Dado que la medicación intraconducto más utilizada es el Hidróxido de calcio y que el *Enterococcus faecalis* es la especie principal responsable de las infecciones persistentes en dientes tratados endodónticamente, ***SI*** es probable

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

que existan proteínas que permitan la supervivencia del *E. faecalis* expuesto a un medio con $Ca(OH)_2$.

4.2. Hipótesis alterna:

Dado que la medicación intraconducto más utilizada es el Hidróxido de calcio y que el *Enterococcus faecalis* es la especie principal responsable de las infecciones persistentes en dientes tratados endodónticamente, ***NO*** es probable que existan proteínas que permitan la supervivencia del *Enterococcus faecalis* expuesto a un medio con $Ca(OH)_2$.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnicas

En la presente investigación se empleará la técnica observación y medición usando la plataforma de aproximación proteómica compuesta por:

a) Electroforesis Bidimensional 2D (SDS-PAGE)

b) Espectrometría de masas ESI-Q-TOF-MS/MS

CUADRO DE TÉCNICAS E INSTRUMENTOS		
VARIABLES	**TÉCNICA**	**INSTRUMENTO**
Variable independiente: Hidróxido de calcio	Observacional	Ficha de Medición
Variable dependiente: Expresión Sobrenadante de *E. faecalis*	Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE) Cromatografía líquida de Alto rendimiento (HPLC) Análisis de secuencia por espectrometría de masas (ESI-QTOF).	Observación y Medición Identificación de proteínas 1 día 7 días 14 días 21 días

1.1.1. Recolección de muestras

Se tomará muestra de *Enterococcus faecalis* la cual se cultivará en agar sangre, se someterá a la incubadora por 24 horas para iniciar con la formación de las colonias, y a las 48 horas se tendrán ya colonias establecidas, estas se retirarán y se colocaran en un tubo de ensayo con tapa al que previamente se le vertió agua destilada en una cantidad de 2ml, que previamente fue sometida a auto clave para cumplir con las normas de esterilización. (8)

Una vez con la solución conformada, el tubo de ensayo se somete al vortex en tres series por diez segundos con intervalos de 10 segundos, con el objetivo de poder separa fases, de esta forma obtiene el sobrenadante de *Enterococcus faecalis*.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La muestra obtenida será el pilar para poder llevar a cabo el estudio de electroforesis, que es un fenómeno mediado por la interacción de cargas, en donde se agrupara las proteínas del sobrenadante con relación a su afinidad con una carga positiva o negativa; así mismo se llevara a cabo el estudio en cromatografía y espectrometría de masas para poder determinar los Spots que posteriormente serán secuenciados y sometido a inmunoinformática, de la misma forma en la que se detalla en los numerales siguientes. (9)

1.1.2. Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)

El gel de electroforesis bidimensional (2-DE o 2D-PAGE) es una técnica primaria que se utiliza en proteómica. Se logra la separación de la mezcla compleja de muestras usando 2 diferentes propiedades de la proteína. En la primera dimensión, también llamada “isoelectric focusing” (IEF), las proteínas son separadas por el valor de puntos isoeléctricos (pI) y en la segunda dimensión consiste en SDS- PAGE, donde las proteínas son separadas por el peso molecular relativo. (10)

1.1.3. Estudios de homología secuencia “de novo” por Espectrometría de masas en tándem.

La espectrometría de masas en tándem ESI-CID-MS/MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas híbrido de tiempo de vuelo de cuadrupolo (Q-TOF, Micromass Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente de nanopulverización que funciona en modo de ionización positiva(10). Las condiciones de ionización fueron: voltaje capilar de 2,3 kV, voltaje de cono y lente RF1 de 30 y 100 V, respectivamente, y una energía de colisión de 10 eV. La temperatura de la fuente fue de 70 oC y el cono de gas fue N2 a un caudal de 80 l/h; no se utilizó gas nebulizador para obtener el spray. Se utilizó gas argón para la fragmentación de iones. La calibración externa se realizó con yoduro de sodio en un rango de masas de 50 a 3000 m/z. Todos los espectros se adquirieron con el analizador TOF en modo “Vmode” (TOF kV=9,1) y voltaje MCP a 2150 V. (12)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.1.4. Secuenciación “de novo” de péptidos trípticos.

Los péptidos trípticos alquilados, se separaron mediante HPLC de fase reversa, se recogieron manual de investigaciones, se liofilizaron y se re-suspendieron en acetonitrilo al 20 % y ácido trifloroacético (TFA) al 0,1 %. (12)

Cada péptido se introdujo por separado en la fuente del espectrómetro de masas con una jeringa a un caudal de 500 nl/min-1. Antes de realizar los espectros de masas en tándem, se adquirió un espectro ESI/MS (modo TOF MS) para cada pico obtenido de la HPLC de fase inversa en el rango de 400 a 2000 m/z para seleccionar los iones de interés. (13) Estos iones se fragmentaron posteriormente en una celda de colisión (modo TOF MS/MS). Se utilizaron diferentes energías de colisión según el estado de carga y la masa de los iones. Los espectros resultantes se adquirieron en el analizador TOF y se resolvieron utilizando el software del algoritmo MassLynx-MaxEnt. (14)

Los espectros de carga única se procesaron manualmente utilizando la aplicación PepSeq incluida con MassLynnx.

En el segundo paso, al combinar los patrones de fragmentación y consultar la literatura relacionada, se estableció una base de datos MASCOT para el análisis de secuencia de proteínas. En el tercer paso, la base de datos autoconstruida se importó a MASCOT. (13)

1.2. Instrumentos:

1.2.1. Instrumentos documentales:

- Carta de presentación al decano de la facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María.
- Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM. (ANEXO 1)

1.2.2. Instrumentos mecánicos:

- Equipo de bioseguridad (guantes, lentes, mascarilla)
- Columna Cromatógrafica de interaccion hidrofobica (HiTrap)
- Lector de placa (Mhmedical USA)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3. Materiales de Verificación

- Cámara fotográfica.
- Computadora, laptop.
- Útiles de escritorio.
- Bases de datos electrónicas (PatternLab)

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación Espacial

2.1.1. Ámbito General

La investigación se realizará en Arequipa.

2.1.2. Ámbito Específico

Laboratorio de Química de proteínas – VRI de la Universidad Católica de Santa María.

2.2. Ubicación Temporal

Esta investigación se realizará entre el mes de noviembre y diciembre del año 2024, será una investigación de corte transversal, por lo tanto, las variables se estudiarán en un solo periodo de tiempo 1, 7, 14 y 21 días.

2.3. Población/muestra

La investigación se realizará en base a:

- Muestra de sobrenadante de *E. faecalis* expuesto a Hidróxido de calcio durante 1 día.
- Muestra de sobrenadante de *E. faecalis* expuesto a Hidróxido de calcio durante 7 días.
- Muestra de sobrenadante de *E. faecalis* expuesto a Hidróxido de calcio durante 14 días.
- Muestra de sobrenadante de *E. faecalis* expuesto a Hidróxido de calcio durante 21 días.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización de la información

Antes de iniciar el estudio será necesario:

- Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM (ANEXO 1).
- Coordinación con los encargados del laboratorio específico.

3.2. Recursos

Físicos: Ambiente físico del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM.

Humanos: El equipo de investigación se compone de:

- Estudiante: Loayza Chuquicaña, Nicole Karyme
- Asesor: Figueroa Band, Rufo Alberto

Económicos: Se obtendrán las unidades de estudio, a través de muestra obtenida de un consultorio local. Los recursos económicos son propios del investigador para el uso del laboratorio.

3.3. Prueba Piloto/Validación del Instrumento

Debido a la naturaleza de la investigación y muestra no se realizará prueba piloto.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

Realizado el análisis de proteómica de las muestras

- Conteo: Se utilizará matrices de recuento

4.1. Tipo de procesamiento:

Se empleará un procesamiento computarizado utilizando programas como Mascot y Pattern lab como base de datos para el análisis de secuencia.

4.2. Plan de Procesamiento

- **Clasificación:** La información obtenida de los instrumentos aplicados será ordenada en una matriz de sistematización.
- **Codificación:** Para el procesamiento computarizado será necesario asignar códigos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Tabulación:** Se elaborará tablas de doble entrada.
- **Graficación:** Se elaborará gráficos de barra doble.

4.2.1. Criterios de inclusión:

- Sobrenadante no contaminado.
- Muestras no contaminadas.

4.2.2. Criterio de exclusión:

- Infiltración multimicrobiana en la colección.

4.3. Plan de Análisis

VARIABLE INVESTIGATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA POR ESCALA DE MEDICIÓN	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA (Medidas de tendencia central y de dispersión)	ESTADÍSTICA
Nivel de expresión proteómica en sobrenadante de *E. faecalis* en presencia de $Ca(OH)_2$ de 1, 7, 14 y 21 días.	Cuantitativo	Proteínas expresadas	De razón Ninguna Ninguna	

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

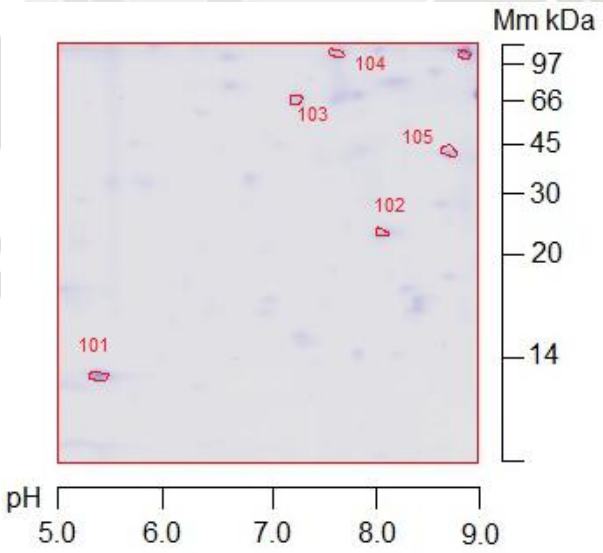
1. Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) del cultivo microbiológico de Enterococcus faecalis en ausencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$). Mapa de Referencia.

El gel bidimensional (2D) de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de la figura 1 muestra el extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de *Enterococcus faecalis* en ausencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) y analizadas bajo su punto isoeléctrico y masa molecular con ayuda de software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con comasie blue.

El software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), reporta, cuando realizado los estudios de sobre posición de los geles bidimensionales 2D entre el control y el estudio (*Enterococcus faecalis* en presencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$)), la evidencia claramente de la presencia de cinco (05) proteínas denominadas como 101 a la 133 respectivamente.

Figura 1

Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis*



La figura 1 establece el mapa de referencia del que se obtuvo 5 “spots”, los mismos que se ubican dentro de los rangos de masas en torno a los 14 a 97 kDa y pI entre 5.0 y 9.0.

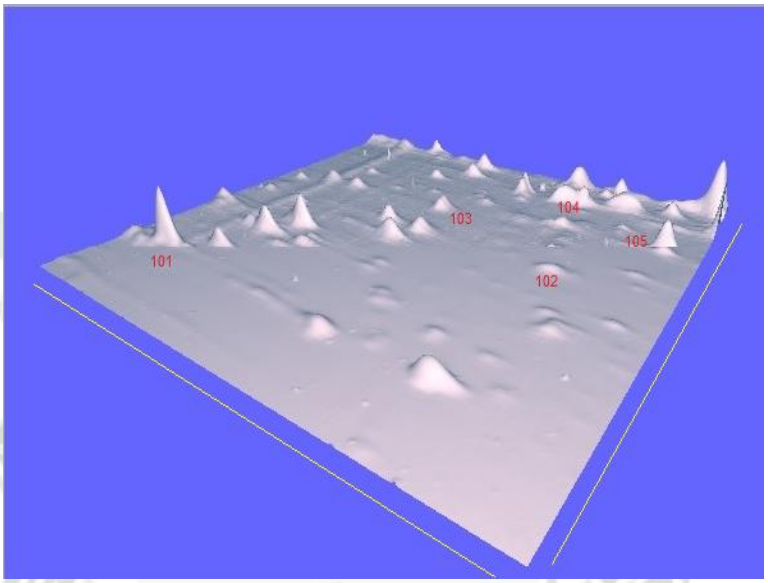
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura 2

Vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis*



La vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* muestra los 5 "spots" ubicados dentro de los rangos antes mencionados.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

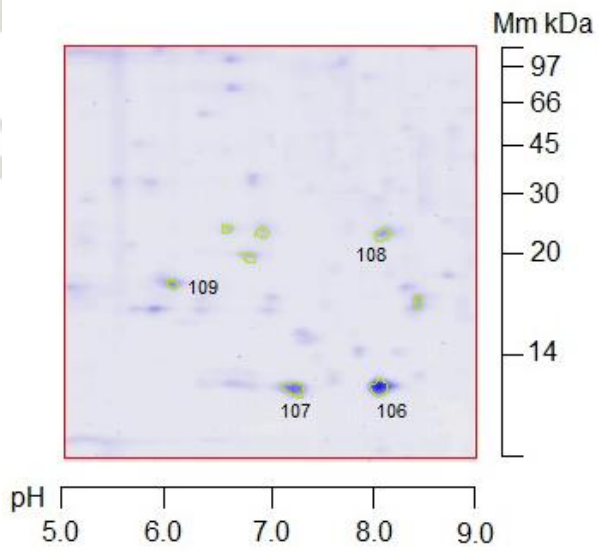
2. Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) del cultivo microbiológico de Enterococcus faecalis en presencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$). Tratamiento.

El gel bidimensional (2D) de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de la figura 2 muestra el extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de *Enterococcus faecalis* en presencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) y analizadas bajo su punto isoeléctrico y masa molecular con ayuda de software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con comasie blue.

El software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), reporta, cuando realizado los estudios de sobre posición de los geles bidimensionales 2D entre el control y el estudio (*Enterococcus faecalis* en presencia de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$)), la evidencia claramente de la presencia de cinco (04) proteínas denominadas como 106 a la 109 respectivamente.

Figura 3

Electroforesis bidimensional (2D) en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a Hidróxido de Calcio



La figura 2 establece los 4 “spots” que se obtuvieron de la muestra tratada con hidróxido de calcio, los mismos que se ubican dentro de los rangos de masas en torno a los 14 a 30 kDa y pI entre 5.0 y 9.0.

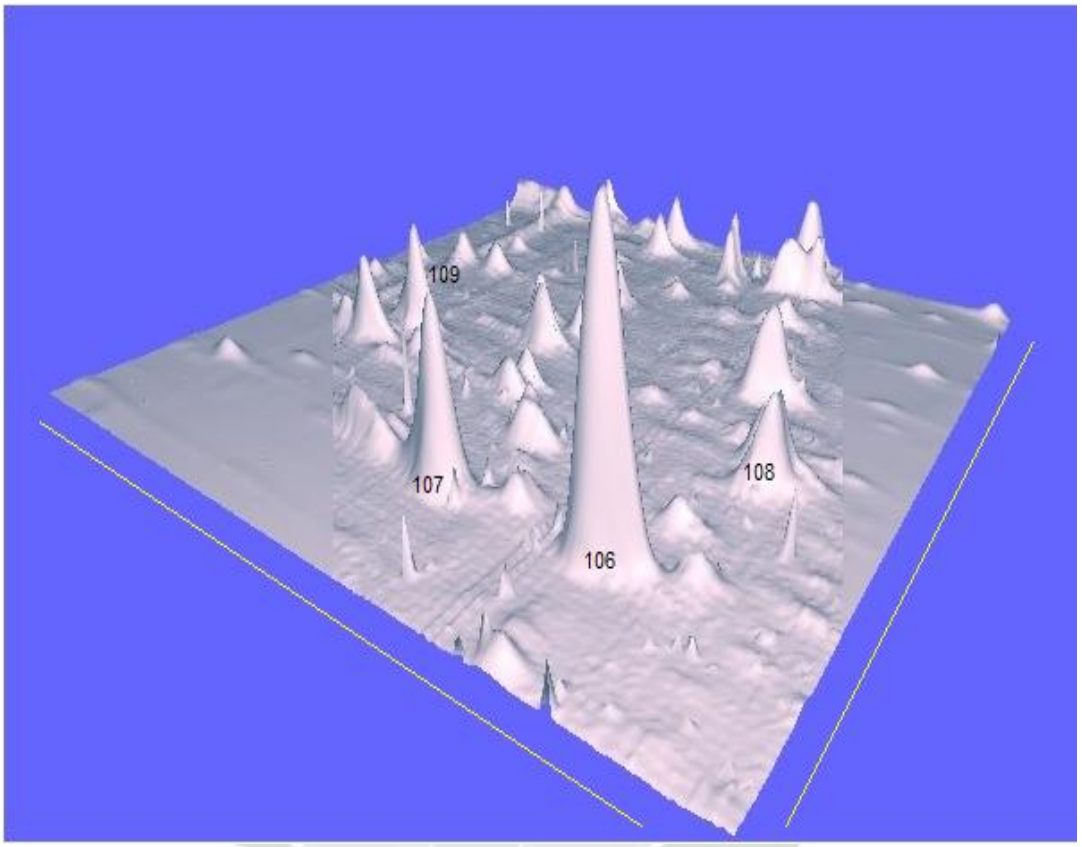
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura 4

Vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a hidróxido de calcio



La Vista tridimensional de electroforesis en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) de cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a hidróxido de calcio muestra los 4 “spots” ubicados dentro de los rangos antes mencionados.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3. Caracterización estructural de los spots correspondiente al control (Mapa de Referencia).

Los spots en estudio fueron digeridos por separado con tripsina bovina y los péptidos trípticos obtenidos, fueron separados en cromatografía líquida de interacción hidrofóbica con una columna HiTrap.

Fueron obtenidos 33 picos proteicos, (datos no mostrados), de los cuales fueron escogidos al azar y por ser los más extensos, 5 picos identificados como *Ef*_101, *Ef*_102, *Ef*_103, *Ef*_104 y *Ef*_105 respectivamente, los cuales fueron colectados manualmente y liofilizados.

Posteriormente el secuenciamiento de cada péptido fue realizado por espectrometría de masas en tándem ESI-Q-TOF/MS/MS. Los datos obtenidos fueron procesados usando el software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixcience.com). La tabla 3 muestra las masas y la secuencia deducida de cada uno de los péptidos obtenidos por clivage tríptico.

Tabla 3

Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0.

N	SPOT	ACCESSION	Secuencia del Péptido (control)	Mm	pI
1	*Ef*_101	HFU6614135	…VWIKIFPHKSYTAKAIGVRMGSGK…	2674.21	10.61
2	*Ef*_102	WP_425142113	…EVSDRLAKEDLPADVIQKVLTRLTD…	2824.20	4.35
3	*Ef*_103	WP_192189474	…ENMVQRPLNFALVDEVDSVLIDEARTPLIVSGP…	274.940	3.82
4	*Ef*_104	MBM9832209	…TLTEDDYAIDIPTKTIGLNDSGIDK…	369.285	3.65
5	*Ef*_105	EPH99643	…TDIGGFKEVIFSISGKGAYSRLK…	2472.83	9.56

Los residuos de Lisina (K) y Arginina (R) fueron deducidos del clivage por la tripsina.

No fueron discriminados los residuos de Leucina (L) e Isoleucina (I) en ninguna de las secuencias reportadas, pues no son distinguibles en el espectro CID (Disociación Inducida por Colisión) de baja energía. Debido a la calibración externa aplicada a todos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

los espectros, no fue posible resolver la diferencia 0,036 Da entre los residuos de Glutamina (Q) y Lisina (K) excepto para las lisinas que fueron deducidas en base al clivage de la tripsina (Tripsina cliva en el extremo carboxiterminal de la Lisina o Arginina).

Cada péptido secuenciado, fue sometido a la base de datos del NCBI usando el programa BLAST-p protein search en la base de datos *UniProtKB/Swiss-Prot* como una búsqueda especifica de proteínas básicas a través del motor de búsqueda complementario Mascot (Tabla 4), las mismas que fueron identificadas como: Ribosomal protein L16, dTMP kinasa, DEAD/DEAH box helicase, partial, Preprotein translocase subunit SecA, partial, Peptide chain release factor.

4. Caracterización estructural de los spots correspondiente a los tratados con hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$).

Los spots en estudio fueron digeridos por separado con tripsina bovina y los péptidos trípticos obtenidos, fueron separados en cromatografía líquida de interacción hidrofóbica con una columna HiTrap.

Fueron obtenidos 31 picos proteicos, (datos no mostrados), de los cuales fueron escogidos al azar y por ser los más extensos, 4 picos identificados como E*f*_106, E*f*_107, E*f*_108 y E*f*_109 respectivamente, los cuales fueron colectados manualmente y liofilizados.

Posteriormente el secuenciamiento de cada péptido fue realizado por espectrometría de masas en tándem ESI-Q-TOF/MS/MS. Los datos obtenidos fueron procesados usando el software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixcience.com). La tabla 4 muestra las masas y la secuencia deducida de cada uno de los péptidos obtenidos por clivage tríptico.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4

Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0.

N	SPOT	ACCESSION	Secuencia del péptido	Mm	pI
1	*Ef*_106	Q04CW5	…RGQVKDVPNGYAQNYLIKQGLAK…	2559.92	9.87
2	*Ef*_107	B8D0L5	…RGIELEALYFHSFPYTSDRAKEKVIDLTK…	3426.88	7.15
3	*Ef*_108	A7GJD2	…EYLKDQIVIEKVINEVTK…	2160.50	4.78
4	*Ef*_109	Q2RM06	…LYVGYFTDIQRAIQENCPQK…	2385.70	6.20

Los residuos de Lisina (K) y Arginina (R) fueron deducidos del clivage por la tripsina.

No fueron discriminados los residuos de Leucina (L) e Isoleucina (I) en ninguna de las secuencias reportadas, pues no son distinguibles en el espectro CID (Disociación Inducida por Colisión) de baja energía. Debido a la calibración externa aplicada a todos los espectros, no fue posible resolver la diferencia 0,036 Da entre los residuos de Glutamina (Q) y Lisina (K) excepto para las lisinas que fueron deducidas en base al clivage de la tripsina (Tripsina cliva en el extremo carboxiterminal de la Lisina o Arginina).

Cada péptido secuenciado, fue sometido a la base de datos del NCBI usando el programa BLAST-p protein search en la base de datos *UniProtKB/Swiss-Prot* como una búsqueda especifica de proteínas básicas a través del motor de búsqueda complementario Mascot (Tabla 4), las mismas que fueron identificadas como: Ribosomal protein L16, dTMP kinasa, DEAD/DEAH box helicase, partial, Preprotein translocase subunit SecA, partial, Peptide chain release factor.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

5. Estudio de homología secuencial por espectrometría de masas ESI-Q-TOF-MS/MS de los péptidos *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 procedentes de cultivo celular de Enterococcus faecalis en presencia de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$

La homología secuencial de los cuatro (04) péptidos *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 determinados por espectrometría de masa en ESI-Q-TOF-MS/MS, procedentes de cultivo celular de *Enterococcus faecalis* en presencia de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$, muestran similitud con otras secuencias similares con cada uno de los mismos en forma independiente.

Las secuencias de los péptidos en sus en sus estudios de homología secuencial, indican que son parte de regiones altamente conservadas mutaciones muy puntuales, las cuales podrían o no influir en la función biológica de las proteínas estudiadas, correspondientes a los cuatro (04) péptidos tal como se muestran en la figura 2.

Para la homología secuencial se muestra una gran similitud o región conservada en rojo, con otras secuencias para cada proteína estudiada en la expresión, según el BLAST.

Figura 5

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot Ef_106 (Query_10001)

```
Q04CW5.1      1   MKVIFMQDVKGRGKRGQVKDVPNGYAQNYLIKQGLAKEANKCNLNTLKRVEANEKAEYEAQKAAAQEIKKQLEADETVVE  80
Q1GC33.1      1   MKVIFMQDVKGRGKLGQVKDVPNGYAQNYLIKQGLAKEANKGNLNTLKRVEANEKAEYEAQKAAAQEIKKQLEADETVVE  80
Q5FN05.1      1   MKVIFTQDVRGRGKRGQVKDVPDGYAQNYLIKRGLAKEATKGNMNTLKRVEANEKAAYEAEKAEAERIKAELEKDDTIVE  80
Query_10001   1   --------------RGQVKDVPNGYAQNYLIKQGLAK-----------------------------------------  23
```

Figura 6

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot Ef_107 (Query_10001)

```
B8D0L5.1      159  RKKnIYVFTRSISGPGGLPVGSSGKGLLLLSGGIDSPVAGWLAMKRGIELEALYFHSFPYTSDRAKEKVIDLTKVLSRYC  238
Q8R9F0.1      151  REK-AFLYAGVIEGAGGLPLGTNGKATVLLSGGIDSPVAAWMMMKRGVEVEAVYFHSPPYTSDRAKEKVVDLCKVLSQYG  229
A3DEB6.1      158  REF-TYIYSEIIQAVCGMPLGSNGKAVLLLSGGIDSPVAGWMIAKRGVEIEAVHFYSYPYTSERAKEKVIELTKILATYC  236
Query_10001   1    ---------------------------------------------RGIELEALYFHSFPYTSDRAKEKVIDLTK------  29
```


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Figura 7

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot Ef_108 (Query_10001)

```
A7GJD2.1      81   VIKEQKKQILENLITEKVLLQKGKELKVIPKDEELNKEADKKVNEIKAVYNNDEKKFEETLKSTGFTKETLKEYLKDQIV  160
B1IGZ5.1      81   VIKEQKKQILENLITEKVLLQKGKELKVIPKDEELNKEADKKVNEIKAVYNNDEKKFEETLKSTGFTKETLKEYLKDQIV  160
C1FNE4.1      81   VIKEQKKQILENLITEKVLLQKGKELKVIPKDEELNKEADKKVNEIKAVYNNDEKKFEETLKSTGFTKETLKEYLKDQIV  160
Query_10001   1    ------------------------------------------------------------------------EYLKDQIV  8

A7GJD2.1      161  IEKVINEVTKDVKVEDKDAQKYYNENQSMFTEKPNTMNVSHILVKTEDEAKKVKKRLDAKEDFAKVAKEVSQDTGSKEKG  240
B1IGZ5.1      161  IEKVINEVTKDVKVEDKDAQKYYNENQSMFTEKPNTMNVSHILVKTEDEAKKVKKRLDAKEDFAKVAKEVSQDTGSKDKG  240
C1FNE4.1      161  IEKVINEVTKDVKVEDKDAQKYYNENQSMFTEKPNTMNVSHILVKTEDEAKKVKKRLDAKEDFAKVAKEVSQDTGSKDKG  240
Query_10001   9    IEKVINEVTK------------------------------------------------------------------------  18
```

Figura 8

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tríptica, del spot Ef_109 (Query_10001)

```
Query_5134061  1    LYVGYFTDIQRAIQENCPQK----------------------------------------------------------  20
B8D0L5.1       243  LYVGYFTDIQRAIQENCPQKYYITIMRRMMYRMAERIARKNGDLVLITGESVGQVASQTLESMNVINEVTNMPVLRPLAT  322
Q2RM06.1       235  LVVAPFTNIQKAIRQNCPQEFYVTIMRRMMFRIARAVAAKEEAPAILTGESLGQVASQTLQSMAVINKVVDLPVLRPLVA  314
```


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

6. Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para los péptidos estudiados en presencia de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$

Tabla 5

Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para la determinación de estructura de proteína en formato FASTA para los péptidos *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109

E*f*_106 50S ribosomal protein L9 – Proteína ribosomal 50S L9 [*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*** ATCC BAA-365]**

MKVIFMQDVKGRGKRGQVKDVPNGYAQNYLIKQGLAKEANKCNLNTLKRVEANE
KAEYEAQKAAAQEIKKQLEADETVVELKAKAGSDSRLFGSISSKKIIEGLDKQFGIKL
DKHKLELREPIKVLGYTNVPVKLFKGVESKVRVHVTQEN

E*f*_107 Thiamine biosynthesis protein ThiI – Proteína de biosíntesis de tiamina ThiI [*Halothermothrix orenii*** H 168]**

MYKVILIRYGEIALKGQNRHVFINKLIENIKESLKGVGEYKLKKTLGRIYVFPNDNIN
QFIEKLKMVPGIVSLSPTAVCPLDFDSLKETSVKVLKDAINDYPATFKVETRRANKQF
PYKSPEVSREIGAHLLRSINTPDHNILTVDVHNPRYTLKIEIRKKNIYVFTRSISGPGGL
PVGSSGKGLLLLSGGIDSPVAGWLAMKRGIELEALYFHSFPYTSDRAKEKVIDLTKV
LSRYCKKIKLYVGYFTDIQRAIQENCPQKYYITIMRRMMYRMAERIARKNGDLVLIT
GESVGQVASQTLESMNVINEVTNMPVLRPLATMNKTEIMDLAREIGTYDISILPHEDC
CTIFVPRHPVTRPRLDRTLKAEEKLKAEIDGLLEDAIEKTEILEIKHG

E*f*_108 Foldase protein PrsA - Proteína foldasa PrsA [*Clostridium botulinum F str. Langeland***]**

MKSAKKLLSVLCLGIFILTFTACDMVEKTPEAKAKSTIAKVNGEKIQRKDLDESPNM
QQVLSQIKTQYGEEFEKTEQGKEVIKEQKKQILENLITEKVLLQKGKELKVIPKDEEL
NKEADKKVNEIKAVYNNDEKKFEETLKSTGFTKETLKEYLKDQIVIEKVINEVTKDV
KVEDKDAQKYYNENQSMFTEKPNTMNVSHILVKTEDEAKKVKKRLDAKEDFAKVA
KEVSQDTGSKEKGGLLGDISYSDSNYDPTFMKAAIALKSGEISNPVHTQWGYHIIKIN
SKKEYPVKKFDSVKEDIKKQLKQEKQQEAYTKKIEEWKKASKIKTYEKNLL

E*f*_109 Probable tRNA sulfurtransferase - Probable ARNt sulfurtransferasa [*Moorella thermoacetica*** ATCC 39073]**

MYTSLLVRYGEISLKGNNRPYFEDKLLANMRRALAGLPPRRMRKTFGRVFVELHD
DLEAVARRLQRVFGIVSMSPVATAPLELEAIKKAALAVLKDSPGSTFKVQAQRPNK
RFPLTSPEVNQELGAYLLTHSQGQRVDVHHPDRVIHVEIRDEGAYIYSRIIPGPGGLP
VGVTGRGLLLISGGIDSPVAGYMGMKRGLELTALHFHSFPFTSERSKEKVIDLCRVL
AGYSGPLRLVVAPFTNIQKAIRQNCPQEFYVTIMRRMMFRIARAVAAKEEAPAILT
GESLGQVASQTLQSMAVINKVVDLPVLRPLVAWDKSEIIEVARRIGTYDISIRPYED
CCTLFVPKHPATKPPLARVEAAEKNLAVVELVAECLENLEILTVEPEADVV

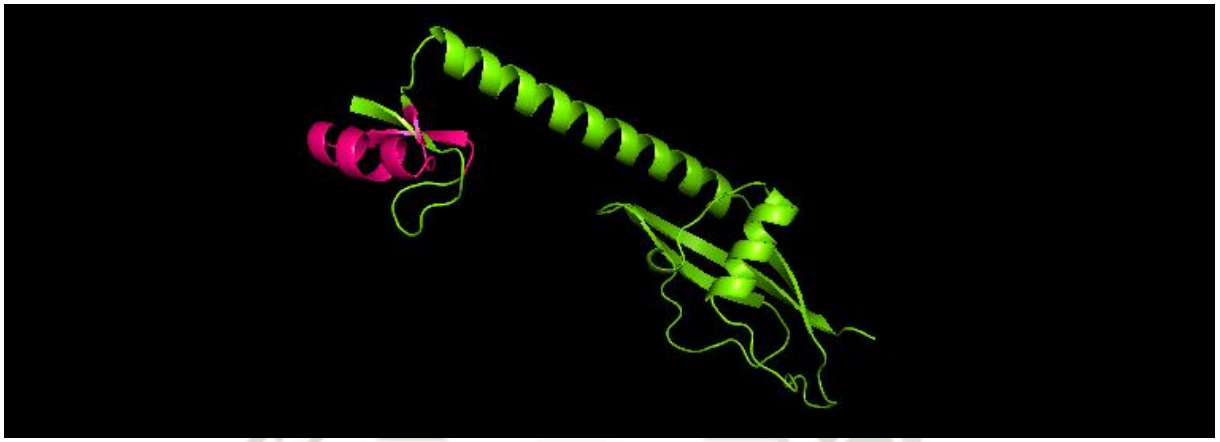
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

7. Deducción de las proteínas expresas de los spots *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108, *Ef*_109 en condiciones de tratamiento con hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ por Enterococcus faecalis

Figura 9

(E*f*_106) 50S ribosomal protein L9 – Proteína ribosomal 50S L9



Forma parte estructural de los ribosomas, requiere de la complementación de la unidad 16S para la funcionalidad, de esta manera los ribosomas adquieran una configuración que predispone a la síntesis de thiamine biosynthesis/tRNA modification protein ThiI, Foldase protein PrsA y Probable tRNA sulfurtransferase.

Figura 10

(E*f*_107) Thiamine biosynthesis protein ThiI – Proteína de biosíntesis de tiamina ThiI

Permite la síntesis de timina contribuyendo a la consolidación de la estructura del ADN.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Figura 11

(E*f*_108) Foldase protein PrsA - Proteína foldasa PrsA

Es una proteína indispensable para que se pueda dar un correcto plegado y expresión de la de superficie en las bacterias, de esta manera permite la modulación del entorno del microorganismo.

Figura 12

(E*f*_109) Probable tRNA sulfurtransferase - Probable ARNt sulfurtransferasa

Enzima que permite la transferencia de átomos de azufre hacia el ARN, de esta manera contribuyendo a que se produzca la transcripción de proteínas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

DISCUSIÓN

Las lesiones pulpares, son un tipo de lesión que se dan debido a la progresión de una lesión cariogénica, cuando esta deja de limitarse al tejido duro y se extiende al tejido blando, es decir la pulpa dental, generando un proceso inflamatorio que por las características histológicas del órgano, desencadena puntos de necrosis que se extiende y culmina con la muerte total del órgano, por lo tanto hablamos de una lesión de carácter séptico, porque la produce un agente biológico, es decir las bacterias, y una de las principales es *Enterococcus faecalis* (79).

Haciendo un análisis de mis antecedentes investigativos, según Pedro Cathro , Peter McCarthy , Peter Hoffmann , Stephen Kidd , Peter Zilm en el paper "Expresión de la proteína de membrana celular de *Enterococcus faecalis* V583 ante el estrés alcalino del 20 de septiembre del 2022 (116) se llega a establecer que el *Enterococcus faecalis* es una bacteria que va a tener una gran capacidad para poder adaptarse un medio alcalino, principalmente en aquellos dientes donde se ha llevado a cabo un fracaso de tratamiento endodóntico, y esto se traduce en una expresión de proteínas de membrana, para poder llevar a cabo una demostración sobre este fenómeno es que se llevó a cabo un cultivo de la bacteria con quimiostato a un PH 8 y pH 11, para de manera posterior llevar a cabo la agregación de marcadores de proteínas qué pudo servir de guía para poder llevar a cabo la espectrometría de masas, donde se logró determinar que existen proteínas que van a encontrarse en un alza positiva como son por ejemplo, proteínas de biosíntesis de polisacáridos, proteína facilitadoras de captación de glicerol y proteínas glicosil hidrolasa, De igual forma que se van a expresar en un alza negativa como el transportador de dicarboxilicoto, el componente IIC y IID del sistema PTS, dicha expresión proteica va a generar que la bacteria vea alterado su metabolismo con el objetivo de poder llevar a cabo la formación de una cápsula protectora para poder resistir a todos los cambios químicos a los que fue sometida dotándolo de resistencia.

Por otra parte, para R. Nandakumar , N Madayiputhiya , AF Fouad en el artículo científico "Análisis proteómico de infecciones endodóncicas mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem" del 24 de agosto del 2009 (117) se llevó a cabo un estudio por el cual se necesitaba la toma de muestras de 7 pacientes con infección pulpar, a dichas muestras se les aplico la técnica de espectrometría de masas y se logró identificar una serie de proteínas en la pared celular qué son de carácter diferencial en *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola*. Estas proteínas diferenciales constituyen factores de virulencia, tanto los de carácter

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

temprano cómo los de carácter tardío, dígase, por ejemplo, adhesinas, autolisinas, proteasas y demás.

Y finalmente, según Melvin Blaze, Montana , Berdan Aydin , Ross P. Carlson , Lucas Hanley en "Identificación e imágenes de péptidos y proteínas en biopelículas de *Enterococcus faecalis* mediante espectrometría de masas por desorción-ionización láser asistida por matriz" del 07 de noviembre del 2012 (118), se puede identificar un péptido, el ARHPHPH en la cápsula de dos cepas del *Enterococcus faecalis*, lo que sirvió para poder llevar a cabo la identificación de proteínas bacterianas cómo son la enolasa y la GAPDH, siendo que ambas constituyen factores de virulencia que dotan a la bacteria de un mayor nivel de infección y también le van a permitir permanecer más tiempo en el organismo. En pocas palabras, de mis antecedentes investigativos se puede llegar a la conclusión, que la exposición de *Enterococcus faecalis* a una noxa o injuria exógena producirá un proceso de adaptación que se traduce en la expresión de proteínas diferenciales que dotan al microorganismo de una mayor resistencia.

En cuanto a los resultados obtenidos de la realización de mi presente tesis, requieren de tener comprensión sobre el proteoma del *Enterococcus faecalis*, una de las principales bacterias implicadas en el desarrollo de las lesiones pulpares, que son un conjunto de proteínas que van a expresarse de manera natural en un determinado momento y lugar; sin embargo, la alteración en el medio externo en el que habita el organismo va a determinar que en este se vea modificado la disposición de purinas y pirimidinas que constituyen su material genético, Por consiguiente se va a llevar a cabo una traducción distinta, la cual a su vez va a desencadenar en la expresión de nuevas proteínas que son distintas a las que corresponden al proteoma normal como dice Melvin Blaze (118). En el presente caso, el agente que determina la variación en la expresión proteómica es el hidróxido de calcio, la sustancia que se usa como medicación intraconducto con más frecuencia.

Para poder llegar a este resultado se llevó a cabo la elaboración de un sobrenadante que posteriormente se sometió a técnicas proteómicas y bioinformáticas, una técnica análoga a la empleada por Pedro Cathro (116); como resultado se obtuvo un conjunto de proteínas que van a servir de esquema de referencia, estas son:

- Ribosomal protein L16.
- DTMP kinasa.
- DEAD/DEAH box helicase, partial.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Preprotein translocase subunit SecA, partial.
- Peptide chain release factor.

Las cinco proteínas de referencia *Ef*_101, *Ef*_102, *Ef*_103, *Ef*_104 y *Ef*_105, como se indica en la tabla 4 se pudieron determinar en base a un estudio de homología secuencial de los péptidos obtenidos del proceso de electroforesis y espectrometría de masas, como se muestra en las figuras 1 y figura 2, donde en base a un esquema 2D y 3D se muestran los picos o Spots que revelan la estructura de aminoácidos, que servirá de base para poder identificar las proteínas a las que estos corresponden.

Es así, que una vez teniendo la secuencia de aminoácidos se lleva a cabo la homología secuencia en el servidor BLAST, un servidor especializado en el alineamiento de estructuras proteínicas, del sometimiento de los aminoácidos, se logra determinar la proteína en su formato FASTA, el mismo que nos da a conocer su punto de acceso y posteriormente hallar la función que cumple en la bacteria.

La proteína ribosomal protein L16 se encarga de la conformación estructural de los ribosomas, por lo que, está directamente implicada en las síntesis de las proteínas que va a encargarse de cumplir con funciones de carácter metabólico y estructural dentro de la bacteria, se puede evidenciar que la cadena de péptidos respecto de E*f*_101 se encuentra dentro de la estructura FASTA de la proteína, la especie correspondiente es *Enterococcus faecalis* con una correspondencia del 100% ya que los 24 aminoácidos que constituyen el péptido coinciden en ambas estructuras.

La proteína o dTMP kinasa, DEAD/DEAH box helicase, partial, preprotein translocase subunit SecA, partial, peptide chain release factor se encargan de la función de conformación y metabolización del ADN, transporte de sustancias a través de membrana, así como la consolidación de estructuras proteínicas para que estas puedan cumplir fusiones biológicas.

La tratativa de todas las proteínas es similar, con la diferencia de que, solo la proeina dTMP kinasa a parte de ribosomal protein L16 son las únicas que tiene un 100% de correspondencia, la proteína DEAD/DEAH box helicase, preprotein translocase subunit SecA, , peptide chain release factor cuentan con un porcentaje de correspondencia de 87%, 84% y 73% respectivamente, por lo que algunos de los aminoácidos difieren al momento de hacer el alineamiento.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En pocas palabra, las antes mencionadas son proteínas qué se expresan de manera normal en un en un *Enterococcus faecalis* que se encuentra en un ambiente sin estímulos que constituyen una agresión o noxa, como dice R. Nandakumar (117); pero cuando se llevan a cabo cambios químicos en el medio dónde se habita, por el hidróxido de calcio que se utiliza en la medicación intraconducto se produce una variación en el proteoma de la bacteria que desencadena la activación una serie proteínas distintas a su estado normal, algunas de las cuales son:

- 50S ribosomal protein L9
- Thiamine biosynthesis protein ThiI
- Foldase protein PrsA
- Probable tRNA sulfurtransferase

Todas las proteínas que conforman este segundo grupo van a determinar que la bacteria puede adaptarse al medio alcalino y lograr tener una mayor resistencia a su medio.

La proteína 50S ribosomal protein L9 es un componente que normalmente no se expresa en condiciones ideales, sin embargo al ser sometido a una injuria de medio se expresa para complementar a la proteína ribosomal protein L16 para poder dar una mayor estabilidad al componente estructural y funcional del ribosoma y de esta manera contribuir a la síntesis de otras proteínas diferenciales, al expandir el espectro de síntesis, en pocas palabras es la llave que determina que se puedan sintetizar las demás proteínas diferenciales como son Thiamine biosynthesis protein ThiI , Foldase protein PrsA y Probable tRNA sulfurtransferase cuya trascendencia radica en la mayor resistencia que le dan a la bacteria frente a alteraciones de su medio ambiente.

En la figura 3 se muestra la Electroforesis bidimensional en 2D en gel Poliacrilamida (SDS_PAGE) del cultivo de *Enterococcus faecalis* expuesto a Hidróxido de Calcio, en el que se pueden ver marcados los puntos, que con mayor perspectiva se evidencia en la figura 4, una vista tridimensional de la electroforesis en gel.

Los picos o spots, al igual que el esquema de referencia, dan información sobre la secuencia de aminoácidos que conformaran parte de la proteína, se expresan cuatro secuencias de péptidos como se indica en la tabla 5 con su respectiva codificación *Ef*_106, *Ef*_107, *Ef*_108 y *Ef*_109. Seguidamente se procedió a llevar a cabo la determinación de la estructura a la que esta serie de aminoácidos corresponde, se hace el alineamiento de cada péptido como se establece en la figura 5, figura 6, figura 7 y figura 8, así se determina el punto de acceso y la estructura en

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

formato FASTA de la proteína para poder conocer la función que tiene dentro de la economía de la bacteria. En la figura 9, figura 10, figura 11 y figura 12 se hace una aproximación 3D de la estructura de las proteínas.

Ya habiendo determinado que el punto de partida para la expresión de las proteínas diferenciales es 50S ribosomal protein L9, la siguiente en expresarse es thiamine biosynthesis/tRNA modification protein ThiI, que se encarga de llevar a cabo una serie de funciones de adaptabilidad a estímulos externos por parte de la bacteria, ya que inducirá a la expedición de mecanismos de defensa físico químicos que aseguren la supervivencia de la misma; la Foldase protein PrsA, por otra parte, será la responsable de llevar a cabo el plegado de proteínas que puedan dar lugar a los cambios físico químicos antes mencionados, ya que a las estructuras antes mencionadas se les confiere el tipo de función biológica que van a tener dentro de la bacteria; finalmente Probable tRNA sulfurtransferase es una enzima que se encargara de la transferencia de átomos de azufre hacia el ARN, de esta manera contribuyendo a que se produzca la transcripción de proteínas.

En la figura 5, figura 6, figura 7 y figura 8 se puede evidenciar el nivel de correspondencia de los péptidos en comparación a estructuras del *Enterococcus faecalis*, correspondiendo al 86%, 68%, 73% y 88%.

Por tal motivo, es muy probable que someter a *Enterococcus faecalis* al hidróxido de calcio desencadene que la proteína ribosomal protein L16 se complemente con 50S ribosomal protein L9 y esto le dé una configuración más estable a la expresión de ribosomas en la bacteria, modificando el proteoma de la misma para que puedan expresarse thiamine biosynthesis/tRNA modification protein ThiI, que va a permitir que las instrucciones genéticas de variación muestren estabilidad en la expresión de proteínas funcionales, también la Foldase protein PrsA que permitirá que se expresen proteínas de superficie que va a tener un efecto quimiotáctico, es decir permitirán que la bacteria pueda adaptarse a las modificaciones de su medio y la Probable tRNA sulfurtransferase, encargada de la transferencia de átomos de azufre para una correcta transducción de proteínas en la bacteria, son todas estas en conjunto las que van a determinar una posible mayor resistencia frente al medio alcalino producido por el hidróxido de calcio.

Es de esta manera, que los resultados obtenidos en mi proceso de investigación coinciden, con los resultados obtenidos por los estudios que constituyen antecedentes investigativos de mi presente tesis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES

Primera: Se pudo evidenciar un alto nivel de variación en la expresión proteómica en la muestra de *Enterococcus faecalis* expuesto a hidróxido de calcio, en comparación a la muestra de *Enterococcus faecalis* no expuesta a dicho medicamento, ya que se expresaron cuatro proteínas diferenciales como son:, 50S ribosomal protein L9, Thiamine biosynthesis protein ThiI , Foldase protein PrsA , Probable tRNA sulfurtransferase; las mismas que dotan a la bacteria de una mayor resistencia frente al microambiente alcalino que genera la aplicación del hidróxido de calcio, de esta manera a su supervivencia por medio de un proceso de adaptación.

Segunda: Se pudo determinar que existe una expresión de variación proteomica en el Enterococcus faecalis, que se materializa en la expresión de proteínas diferenciales a las que se expresan normalmente, como son: ribosomal protein L16, dTMP kinasa, DEAD/DEAH box helicase, partial, preprotein translocase subunit SecA, partial y peptide chain release factor.

Tercera: Todas las proteínas diferenciales de *Enterococcus faecalis como son:* 50S ribosomal protein L9, Thiamine biosynthesis/tRNA modification protein Thil, Phage neck terminador protein, Replication-associated recombination protein A, partial, se expresaron en el día 14; en el día 1, 7 y el día 21 no se manifestaron variaciones proteómicas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

SUGERENCIAS

Primera: Poder conocer y entender el aspecto microbiológico de las lesiones pulpares para poder hacer un correcto diagnóstico y proponer un tratamiento más focalizado, de tal forma que no se contribuya a generar mayor resistencia en los agentes responsables de la lesión pulpar.

Segunda: Entender que el uso de medicación intraconducto debe realizarse en virtud de los agentes infecciosos presentes en el mismo y no guiarse por la habitualidad en el uso de este.

Tercera: Incrementar el tiempo de medicación intraconducto con hidróxido de calcio y hacer estudios biológicos para poder determinar posibles ausencias y reducciones en las concentraciones de *Enterococcus faecalis.*

Cuarta: Complementar el paso clínico de medicación con pruebas bacteriológicas para poder identificar a los microorganismos presentes y de esta manera poder llevar a cabo la elección de un medicamento específico para la neutralización de los agentes sépticos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Witter DJ, van Palenstein Helderman WH, Creugers NH, Kayser AF. The shortened dental arch concept and its implications for oral health care. Community Dent Oral Epidemiol. 1999;27(4):249-58.

2. Ron Larsen K, Johansen JD, Arenholt-Bindslev D, Reibel J, Pedersen AM. [Dental materials can cause oral allergic reactions]. Ugeskr Laeger. 2013;175(25):1785-9.

3. Liinavuori A, Tolvanen M, Pohjola V, Lahti S. Longitudinal interrelationships between dental fear and dental attendance among adult Finns in 2000-2011. Community Dent Oral Epidemiol. 2019;47(4):309-15.

4. de La Dure-Molla M, Fournier BP, Manzanares MC, Acevedo AC, Hennekam RC, Friedlander L, et al. Elements of morphology: Standard terminology for the teeth and classifying genetic dental disorders. Am J Med Genet A. 2019;179(10):1913-81.

5. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Caries Res. 2020;54(1):7-14.

6. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. Caries Res. 2020;54(1):2-6.

7. Fransson H, Dawson V. Tooth survival after endodontic treatment. Int Endod J. 2023;56 Suppl 2:140-53.

8. Torabinejad M, White SN. Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment: Alternatives to single-tooth implants. J Am Dent Assoc. 2016;147(3):214-20.

9. Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. Microsc Res Tech. 2003;60(5):503-15.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

10. Andreasen FM, Kahler B. Pulpal response after acute dental injury in the permanent dentition: clinical implications-a review. J Endod. 2015;41(3):299-308.

11. Kantrong N, Jit-Armart P, Arayatrakoollikit U. Melatonin antagonizes lipopolysaccharide-induced pulpal fibroblast responses. BMC Oral Health. 2020;20(1):91.

12. Harichane Y, Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Granja I, Goldberg A, Kellermann O, et al. Pulpal progenitors and dentin repair. Adv Dent Res. 2011;23(3):307-12.

13. Dominguez A, Ballesteros RE, Viafara JH, Tamayo OM. Effect of low level laser therapy on dental pulp during orthodontic movement. World J Methodol. 2013;3(2):19-26.

14. Shetty A, Anand KV, Rai N, Shetty A, Pradeep K, Kumar AA. In vitro comparative study of antimicrobial efficacy of endodontic sealers against common pathogens in the dental pulp. J Conserv Dent. 2023;26(2):216-20.

15. Bjorndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF. Management of deep caries and the exposed pulp. Int Endod J. 2019;52(7):949-73.

16. Dingming H, Qian L, Qian L, Ling Y, Xuedong Z. [Confusion and solution for vital pulp therapy]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2017;35(3):227-31.

17. Fu X, Kim HS. Dentin Mechanobiology: Bridging the Gap between Architecture and Function. Int J Mol Sci. 2024;25(11).

18. Sequeira DB, Diogo P, Gomes B, Peca J, Santos JMM. Scaffolds for Dentin-Pulp Complex Regeneration. Medicina (Kaunas). 2023;60(1).

19. Pashley DH. Dentin permeability and dentin sensitivity. Proc Finn Dent Soc. 1992;88 Suppl 1:31-7.

20. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. J Tissue Eng Regen Med. 2019;13(1):58-75.

21. [Pulpal and periapical diagnosis]. Rev Fed Odontol Colomb. 1987;37(162):29-34.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

22. Garcia Aranda R. [Correlation between clinical diagnosis and histopathological diagnosis in pulp pathology]. Pract Odontol. 1990;11(3):43-6.

23. Menegale C. [Diagnostic methods for pulp and periapical diseases]. Rev Bras Odontol. 1967;25(147):321-5.

24. Navarrete P, Martinez B. [Comparative study of clinico-radiographic diagnosis and histopathological examination of pulp necrosis]. Odontol Chil. 1988;36(1):3-8.

25. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. Int J Mol Sci. 2021;22(3).

26. Schwendicke F, Frencken JE, Bjorndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. Adv Dent Res. 2016;28(2):58-67.

27. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. Monogr Oral Sci. 2018;27:1-10.

28. Qian Y, Gong J, Lu K, Hong Y, Zhu Z, Zhang J, et al. DLP printed hDPSC-loaded GelMA microsphere regenerates dental pulp and repairs spinal cord. Biomaterials. 2023;299:122137.

29. Iaculli F, Rodriguez-Lozano FJ, Briseno-Marroquin B, Wolf TG, Spagnuolo G, Rengo S. Vital Pulp Therapy of Permanent Teeth with Reversible or Irreversible Pulpitis: An Overview of the Literature. J Clin Med. 2022;11(14).

30. Wassel M, Hamdy D, Elghazawy R. Evaluation of four vital pulp therapies for primary molars using a dual-cured tricalcium silicate (TheraCal PT): one-year results of a non-randomized clinical trial. J Clin Pediatr Dent. 2023;47(2):10-22.

31. Zero DT, Zandona AF, Vail MM, Spolnik KJ. Dental caries and pulpal disease. Dent Clin North Am. 2011;55(1):29-46.

32. Kahler B, Taha NA, Lu J, Saoud TM. Vital pulp therapy for permanent teeth with diagnosis of irreversible pulpitis: biological basis and outcome. Aust Dent J. 2023;68 Suppl 1:S110-S22.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

33. Tampi MP, Pilcher L, Urquhart O, Kennedy E, O'Brien KK, Lockhart PB, et al. Antibiotics for the urgent management of symptomatic irreversible pulpitis, symptomatic apical periodontitis, and localized acute apical abscess: Systematic review and meta-analysis-a report of the American Dental Association. J Am Dent Assoc. 2019;150(12):e179-e216.

34. Khijmatgar S, Bellucci G, Creminelli L, Tartaglia GM, Jr., Tumedei M. Systemic Antibiotic Use in Acute Irreversible Pulpitis: Evaluating Clinical Practices and Molecular Insights. Int J Mol Sci. 2024;25(2).

35. Chen Y, Hu J, Qi F, Kang Y, Zhang T, Wang L. Acute pulpitis promotes purinergic signaling to induce pain in rats via P38MAPK/NF-kappaB signaling pathway. Mol Pain. 2024;20:17448069241234451.

36. Madurantakam P. Is pulpotomy an effective therapeutic option for the management of acute irreversible pulpitis in mature permanent teeth? Evid Based Dent. 2022;23(4):136.

37. Segura-Egea JJ, Gould K, Sen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Antibiotics in Endodontics: a review. Int Endod J. 2017;50(12):1169-84.

38. Gemmell A, Stone S, Edwards D. Investigating acute management of irreversible pulpitis: a survey of general dental practitioners in North East England. Br Dent J. 2020;228(7):521-6.

39. Lockhart PB, Tampi MP, Abt E, Aminoshariae A, Durkin MJ, Fouad AF, et al. Evidence-based clinical practice guideline on antibiotic use for the urgent management of pulpal- and periapical-related dental pain and intraoral swelling: A report from the American Dental Association. J Am Dent Assoc. 2019;150(11):906-21 e12.

40. Kermeoglu F, Sayiner S, Sehirli AO, Savtekin G, Aksoy U. Does alpha-lipoic acid therapeutically effective against experimentally induced-acute pulpitis in rats? Aust Endod J. 2023;49(1):87-91.

41. Agnihotry A, Fedorowicz Z, van Zuuren EJ, Farman AG, Al-Langawi JH. Antibiotic use for irreversible pulpitis. Cochrane Database Syst Rev. 2016;2:CD004969.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

42. Lopez-Marcos JF. Aetiology, classification and pathogenesis of pulp and periapical disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2004;9 Suppl:58-62; 52-7.

43. Talbot ES. Pulp Degeneration. Int Dent J (Phila). 1904;25(10):745-58.

44. Bhardwaj SS, Gupta KD, Yeluri R. Traditional Versus Advanced Pulp Capping Materials in Primary Teeth. Ann Afr Med. 2024;23(3):243-7.

45. Pirani C, Camilleri J. Effectiveness of root canal filling materials and techniques for treatment of apical periodontitis: A systematic review. Int Endod J. 2023;56 Suppl 3:436-54.

46. Moradi S, Poursadegh M, Bakhshaee M, Bonyadimanesh R, Poursadegh V. Pulp necrosis during septorhinoplasty. Laryngoscope. 2010;120(4):673-5.

47. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340-9.

48. Martino C, Dilmore AH, Burcham ZM, Metcalf JL, Jeste D, Knight R. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. Nat Rev Microbiol. 2022;20(12):707-20.

49. Bergenholtz G. Assessment of treatment failure in endodontic therapy. J Oral Rehabil. 2016;43(10):753-8.

50. Stueland H, Orstavik D, Handal T. Treatment outcome of surgical and non-surgical endodontic retreatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 2023;56(6):686-96.

51. Murray PE. Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. Int Endod J. 2023;56 Suppl 2:188-99.

52. Iqbal A, Sharari TA, Khattak O, Chaudhry FA, Bader AK, Saleem MM, et al. Guided Endodontic Surgery: A Narrative Review. Medicina (Kaunas). 2023;59(4).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

53. Chen YT, Hsu TY, Liu H, Chogle S. Factors Related to the Outcomes of Cracked Teeth after Endodontic Treatment. J Endod. 2021;47(2):215-20.

54. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. J Endod. 2006;32(7):601-23.

55. Abbott PV. Present status and future directions: Managing endodontic emergencies. Int Endod J. 2022;55 Suppl 3:778-803.

56. Ather A, Zhong S, Rosenbaum AJ, Quinonez RB, Khan AA. Pharmacotherapy during Pregnancy: An Endodontic Perspective. J Endod. 2020;46(9):1185-94.

57. Glynis A, Foschi F, Kefalou I, Koletsi D, Tzanetakis GN. Regenerative Endodontic Procedures for the Treatment of Necrotic Mature Teeth with Apical Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. J Endod. 2021;47(6):873-82.

58. Ulanowska M, Olas B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. Int J Mol Sci. 2021;22(7).

59. Farooqui MY. Formaldehyde. J Appl Toxicol. 1983;3(5):264-5.

60. Jara M, Salcedo-Moncada D, Ayala G, Watanabe R, Alvitez-Temoche D, Mayta-Tovalino F. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide with Iodoform versus Calcium Hydroxide with Camphorated Paramonochlorophenol as Intrachannel Pastes on an *Enterococcus faecalis* Biofilm: A Comparative In Vitro Study. J Int Soc Prev Community Dent. 2020;10(5):555-60.

61. El Meligy O, Alamoudi NM, Allazzam SM, El-Housseiny AAM. Biodentine(TM) versus formocresol pulpotomy technique in primary molars: a 12-month randomized controlled clinical trial. BMC Oral Health. 2019;19(1):3.

62. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32(2):93-8.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

63. Peluso P, Mamane V, Cossu S. Liquid chromatography enantioseparations of halogenated compounds on polysaccharide-based chiral stationary phases: role of halogen substituents in molecular recognition. Chirality. 2015;27(10):667-84.

64. Reyhani MF, Ghasemi N, Milani AS, Abbasi Asl M. Antimicrobial Effect of Nano-Calcium Hydroxide on the Four- and Six-Week-Old Intra-Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm. J Dent (Shiraz). 2023;24(2):194-9.

65. Momenijavid M, Salimizand H, Korani A, Dianat O, Nouri B, Ramazanzadeh R, et al. Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. Sci Rep. 2022;12(1):7595.

66. Teja KV, Janani K, Srivastava KC, Shrivastava D, Natoli V, Di Blasio M, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of different combinations of calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. BMC Oral Health. 2023;23(1):849.

67. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. J Appl Oral Sci. 2014;22(5):356-65.

68. Zinman EJ. Calcium Hydroxide. J Am Dent Assoc. 2020;151(8):553.

69. Najjar RS, Alamoudi NM, El-Housseiny AA, Al Tuwirqi AA, Sabbagh HJ. A comparison of calcium hydroxide/iodoform paste and zinc oxide eugenol as root filling materials for pulpectomy in primary teeth: A systematic review and meta-analysis. Clin Exp Dent Res. 2019;5(3):294-310.

70. Ricucci D, Rocas IN, Alves FRF, Cabello PH, Siqueira JF, Jr. Outcome of Direct Pulp Capping Using Calcium Hydroxide: A Long-term Retrospective Study. J Endod. 2023;49(1):45-54.

71. Ahmad MZ, Sadaf D, Merdad KA, Almohaimeed A, Onakpoya IJ. Calcium hydroxide as an intracanal medication for postoperative pain during primary root canal therapy: A systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis of randomised controlled trials. J Evid Based Dent Pract. 2022;22(1):101680.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

72. Kakka A, Gavriil D, Whitworth J. Treatment of cracked teeth: A comprehensive narrative review. Clin Exp Dent Res. 2022;8(5):1218-48.

73. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. J Endod. 2017;43(7):1033-51.

74. Yamauchi Y, Cooper PR, Shimizu E, Kobayashi Y, Smith AJ, Duncan HF. Histone Acetylation as a Regenerative Target in the Dentine-Pulp Complex. Front Genet. 2020;11:1.

75. Noohi P, Abdekhodaie MJ, Nekoofar MH, Galler KM, Dummer PMH. Advances in scaffolds used for pulp-dentine complex tissue engineering: A narrative review. Int Endod J. 2022;55(12):1277-316.

76. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Int Endod J. 2022;55 Suppl 3:512-30.

77. Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019;24(3):e364-e72.

78. Fouad AF, Diogenes AR, Torabinejad M, Hargreaves KM. Microbiome Changes during Regenerative Endodontic Treatment Using Different Methods of Disinfection. J Endod. 2022;48(10):1273-84.

79. Rodrigues MX, Nemec A, Fiani N, Bicalho RC, Peralta S. Endodontic Microbiome of Fractured Non-vital Teeth in Dogs Determined by 16S rRNA Gene Sequencing. Front Vet Sci. 2019;6:348.

80. Pinheiro ET, Karygianni L, Candeiro GTM, Vilela BG, Dantas LO, Pereira ACC, et al. Metatranscriptome and Resistome of the Endodontic Microbiome. J Endod. 2024;50(8):1059-72 e4.

81. Aliabadi T, Saberi EA, Motameni Tabatabaei A, Tahmasebi E. Antibiotic use in endodontic treatment during pregnancy: A narrative review. Eur J Transl Myol. 2022;32(4).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

82. Peng X, Cheng L, You Y, Tang C, Ren B, Li Y, et al. Oral microbiota in human systematic diseases. Int J Oral Sci. 2022;14(1):14.

83. Pedersen AML, Sorensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekstrom J. Salivary secretion in health and disease. J Oral Rehabil. 2018;45(9):730-46.

84. Sabharwal A, Stellrecht E, Scannapieco FA. Associations between dental caries and systemic diseases: a scoping review. BMC Oral Health. 2021;21(1):472.

85. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. Int J Mol Sci. 2017;18(8).

86. Georgiou AC, van der Waal SV, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E, Brandt BW. Host-microbiome interactions in apical periodontitis: The endodontic microbiome in relation to circulatory immunologic markers. Int Endod J. 2023;56(6):748-64.

87. Zong Y, Zhou Y, Liao B, Liao M, Shi Y, Wei Y, et al. The Interaction Between the Microbiome and Tumors. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:673724.

88. Yan C, Owen JS, Seo EY, Jung D, He S. Microbial Interaction is Among the Key Factors for Isolation of Previous Uncultured Microbes. J Microbiol. 2023;61(7):655-62.

89. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Mil Med Res. 2017;4:14.

90. Rosa CP, Belo TCA, Santos NCM, Silva EN, Gasparotto J, Corsetti PP, et al. Reactive oxygen species trigger inflammasome activation after intracellular microbial interaction. Life Sci. 2023;331:122076.

91. European Society of Endodontology developed b, Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. Int Endod J. 2019;52(7):923-34.

92. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. Mediators Inflamm. 2015;2015:230251.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

93. Sharma Y, Shobha K, Sundeep M, Pinnelli VB, Parveen S, Dhanushkodi A. Neural Basis of Dental Pulp Stem Cells and its Potential Application in Parkinson's Disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2022;21(1):62-76.

94. Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. Stem Cells Transl Med. 2020;9(4):445-64.

95. Brennan CA, Garrett WS. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol. 2019;17(3):156-66.

96. Gasmi Benahmed A, Kumar Mujawdiya P, Noor S, Gasmi A. Porphyromonas Gingivalis in the Development of Periodontitis: Impact on Dysbiosis and Inflammation. Arch Razi Inst. 2022;77(5):1539-51.

97. Tett A, Pasolli E, Masetti G, Ercolini D, Segata N. Prevotella diversity, niches and interactions with the human host. Nat Rev Microbiol. 2021;19(9):585-99.

98. Avuthu N, Guda C. Meta-Analysis of Altered Gut Microbiota Reveals Microbial and Metabolic Biomarkers for Colorectal Cancer. Microbiol Spectr. 2022;10(4):e0001322.

99. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of Streptococcus mutans. Microbiol Spectr. 2019;7(1).

100. Garcia-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2).

101. Gulati M, Nobile CJ. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016;18(5):310-21.

102. Aja E, Mangar M, Fletcher HM, Mishra A. Filifactor alocis: Recent Insights and Advances. J Dent Res. 2021;100(8):790-7.

103. Chavez de Paz LE, Davies JR, Bergenholtz G, Svensater G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. Int Endod J. 2015;48(10):916-25.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

104. Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. Int Endod J. 2005;38(6):389-96.

105. Archambaud C, Nunez N, da Silva RAG, Kline KA, Serror P. *Enterococcus faecalis*: an overlooked cell invader. Microbiol Mol Biol Rev. 2024;88(3):e0006924.

106. Fernandez-Hidalgo N, Escola-Verge L, Pericas JM. *Enterococcus faecalis* endocarditis: what's next? Future Microbiol. 2020;15:349-64.

107. Venkateswaran P, Lakshmanan PM, Muthukrishnan S, Bhagavathi H, Vasudevan S, Neelakantan P, et al. Hidden agenda of *Enterococcus faecalis* lifestyle transition: planktonic to sessile state. Future Microbiol. 2022;17:1051-69.

108. Williamson AJ, Jacobson R, van Praagh JB, Gaines S, Koo HY, Lee B, et al. *Enterococcus faecalis* promotes a migratory and invasive phenotype in colon cancer cells. Neoplasia. 2022;27:100787.

109. Flanagan D. *Enterococcus faecalis* and Dental Implants. J Oral Implantol. 2017;43(1):8-11.

110. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. Int J Mol Sci. 2021;22(3).

111. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J. 2007;52(1 Suppl):S4-16.

112. Segura-Egea JJ, Gould K, Sen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. Int Endod J. 2018;51(1):20-5.

113. Cathro P, McCarthy P, Hoffmann P, Kidd S, Zilm P. *Enterococcus faecalis* V583 cell membrane protein expression to alkaline stress. FEMS Microbiol Lett. 2022;369(1).

114. Nandakumar R, Madayiputhiya N, Fouad AF. Proteomic analysis of endodontic infections by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(4):347-52.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

115. M TM, Aydin B, Carlson RP, Hanley L. Identification and imaging of peptides and proteins on *Enterococcus faecalis* biofilms by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Analyst. 2012;137(21):5018-25.

116. Blum F. High performance liquid chromatography. Br J Hosp Med (Lond). 2014;75(2):C18-21.

117. Gok SM, Turk Dagi H, Kara F, Arslan U, Findik D. [Investigation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Clinical Samples]. Mikrobiyol Bul. 2020;54(1):26-39.

118. Gremy F. [Electrophoresis]. Concours Med. 1959;81(8):847-52 contd.

119. Weiss W, Gorg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. Methods Mol Biol. 2009;564:13-32.

120. Fleming R. ADC Analysis by Hydrophobic Interaction Chromatography. Methods Mol Biol. 2020;2078:147-61.

121. Taylor JA, Johnson RS. Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1997;11(9):1067-75.

123. Asakawa D, Takahashi H, Iwamoto S, Tanaka K. De Novo Sequencing of Tryptic Phosphopeptides Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Based Tandem Mass Spectrometry with Hydrogen Atom Attachment. Anal Chem. 2018;90(4):2701-7.

124. Glickman, GN. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: Background and Perspectives. J Endod. Volume 35, Issue 12, 1619 - 1620.

125. Katz J, Rotstein I. Prevalence of Periapical Lesions in Patients with Osteoporosis. J Endod. 2021;47(2):234-8.

126. Gao Z, Mackenzie IC, Williams DM, Cruchley AT, Leigh I, Lane EB. Patterns of keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. J Oral Pathol. 1988;17(4):178-85.

127. Sampaio JM, Tommasi AF. [The use of thiamine in acute apical periodontitis]. Rev Fac Odontol Sao Paulo. 1965;3(2):375-83.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

128. Lopes LM. [Acute apical abscess: emergency treatment]. Rev Port Estomatol Cir Maxilofac. 1989;30(1):27-30.

129. Morales-Lastre CC, Cabarique-Mojica JM, Escobar-Ospino DL, Wilches-Visbal JH. [Effectiveness of an irrigant in the chronic periapical abscess management: a case report]. Rev Cient Odontol (Lima). 2023;11(4):e180.

130. Roman-Quesada N, Gonzalez-Navarro B, Izquierdo-Gomez K, Jane-Salas E, Mari-Roig A, Estrugo-Devesa A, et al. An analysis of the prevalence of peripheral giant cell granuloma and pyogenic granuloma in relation to a dental implant. BMC Oral Health. 2021;21(1):204.

131. Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg PA. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. J Endod. 2009;35(5):607-15.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

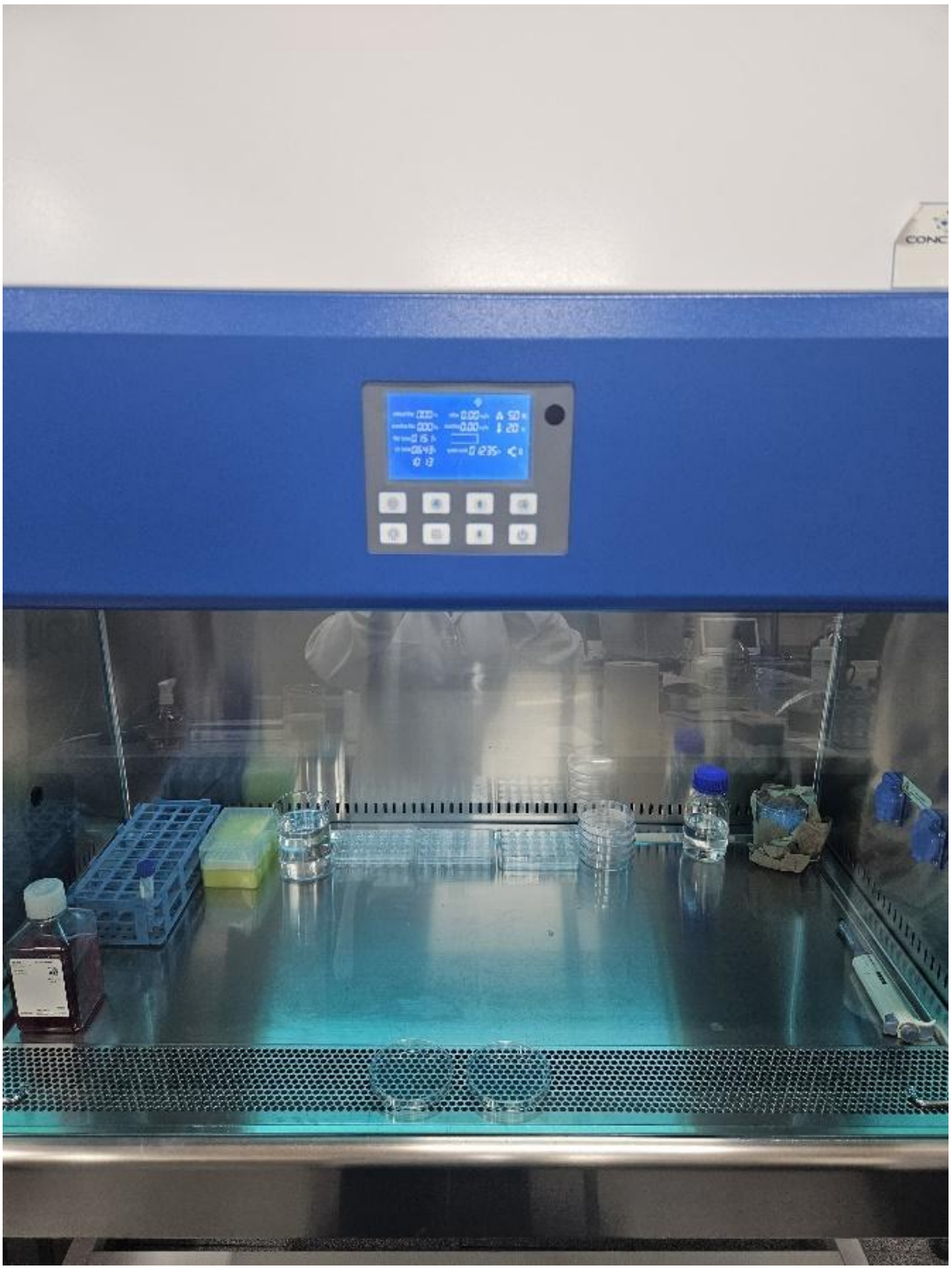
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Anexo 1

Fotografías del procesamiento en el laboratorio

Imagen 1

Desinfección de la cámara de flujo



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Imagen 2

Preparación del agar sangre

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Imagen 3

Colocación de los cultivos en la estufa

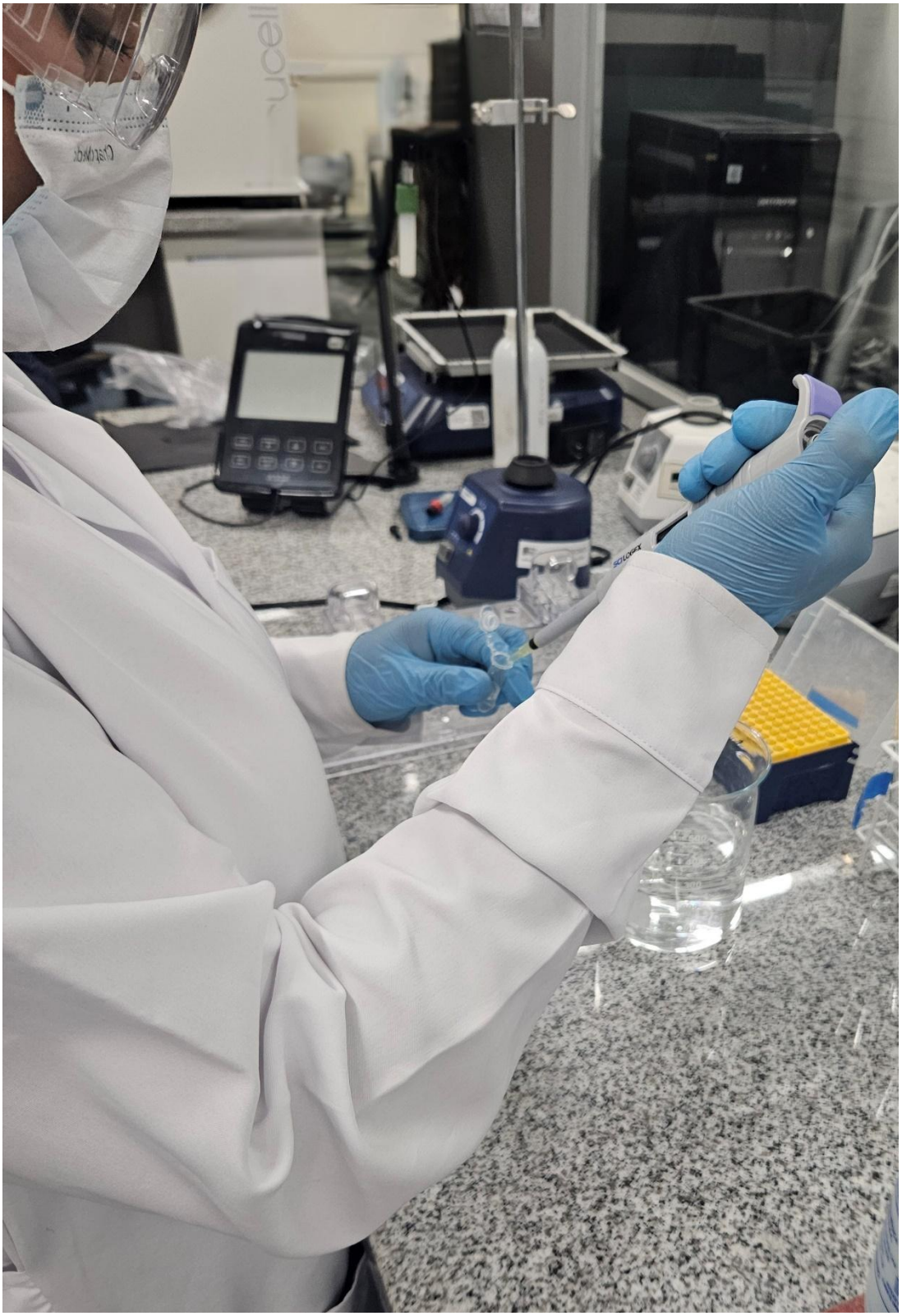
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Imagen 4

Colocación de agua destilada en los tubos de ensayo.



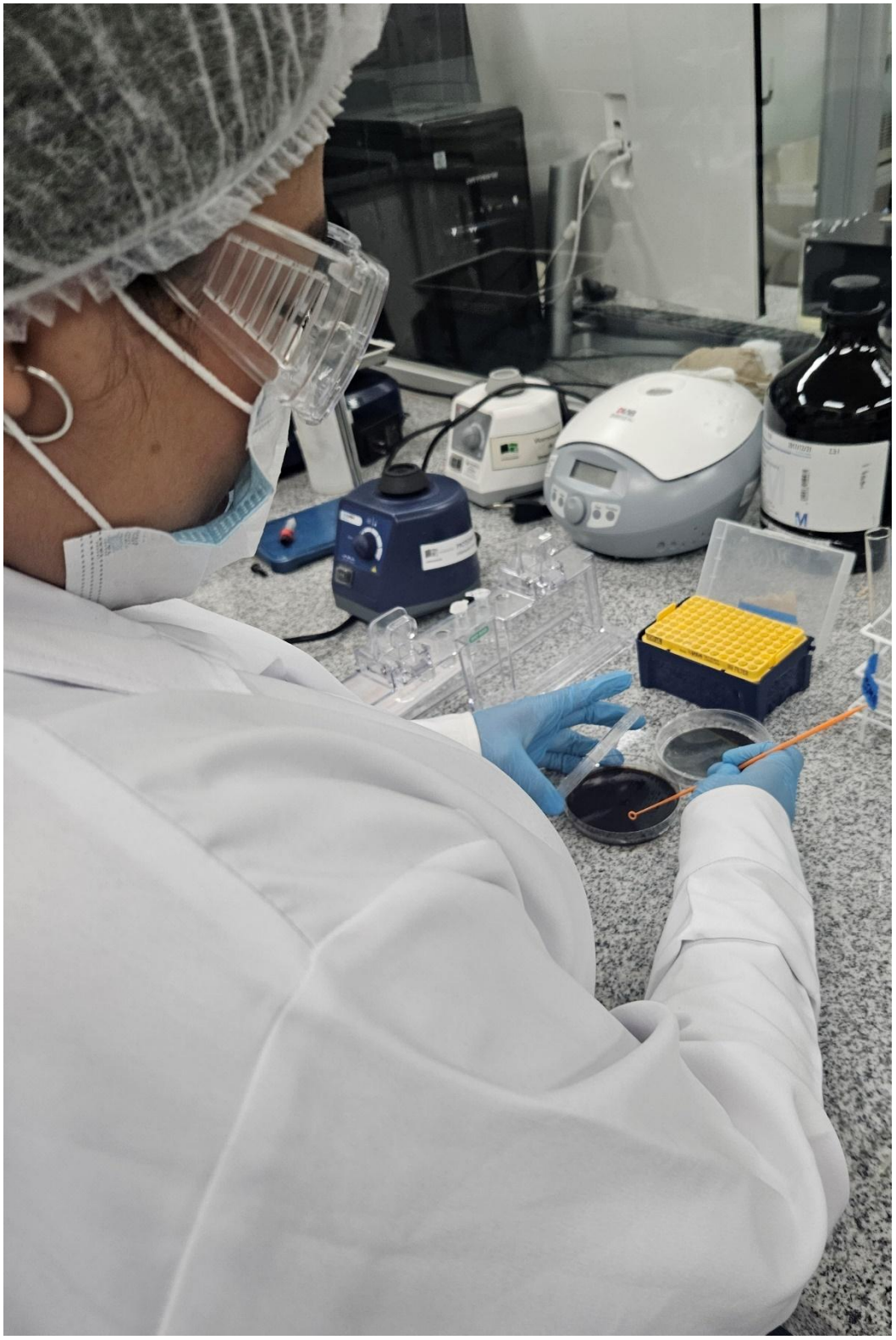
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Imagen 5

Recojo de colonias de *Enterococcus faecalis*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Imagen 6

Tubo de ensayo sometido al vortex para obtener el sobrenadante

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis