

**EFFECTO DE LA PREPARACIÓN BIOMECÁNICA CON LOS
SISTEMAS DE LIMA ÚNICA WAVEONE GOLD, RECIPROC BLUE Y
XP ENDOSHAPER EN LA EXPRESIÓN DE SUSTANCIA P Y EL
PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN
LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.**

**FABIANA VICTORIA LAGUNA RIVERO
MARGARITA YULIETH REY ROJAS**

**INSTITUCION UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA
COLEGIO ODONTOLOGICO
POSTGRADO DE ENDODONCIA
BOGOTA
2017**

**EFFECTO DE LA PREPARACIÓN BIOMECÁNICA CON LOS SISTEMAS DE
LIMA UNICA WAVEONE GOLD, RECIPROC BLUE Y XP ENDO-SHAPER EN
LA EXPRESIÓN DE SUSTANCIA P Y EL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL
GEN DE LA CALCITONINA EN LIGAMENTO PERIODONTAL DE
PREMOLARES INFERIORES HUMANOS.**

AUTORES

FABIANA VICTORIO LAGUNA RIVERO

MARGARITA YULIETH REY ROJAS

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA UNICOC

ÁREA DE EDUCACION AVANZADA Y CONTINUADA

POSTGRADO EN ENDODONCIA

NOVIEMBRE 2017, BOGOTÁ

EFFECTO DE LA PREPARACIÓN BIOMECÁNICA CON LOS SISTEMAS DE LIMA UNICA WAVEONE GOLD, RECIPROC BLUE Y XP ENDO-SHAPER EN LA EXPRESIÓN DE SUSTANCIA P Y EL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN LIGAMENTO PERIODONTAL DE PREMOLARES INFERIORES HUMANOS.

AUTORES

FABIANA VICTORIO LAGUNA RIVERO

MARGARITA YULIETH REY ROJAS

ASESOR CIENTIFICO:

DR. JAVIER CAVIEDES BUCHELLI.

Odontólogo Especialista en Endodoncia

Universidad Javeriana

ASESOR METODOLOGICO:

DR. NESTOR RIOS.

Odontólogo Especialista en Endodoncia

Universidad Javeriana

ASESOR ESTADISTICO:

HUGO MUÑOZ.

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA UNICOC

ÁREA DE EDUCACION AVANZADA Y CONTINUADA

POSTGRADO EN ENDODONCIA

NOVIEMBRE 2017, BOGOTÁ

TABLA DE CONTENIDO

1. ASPECTO TEORICO CIENTÍFICO	7
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN	13
1.4 PROPÓSITO	13
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 LIGAMENTO PERIODONTAL	13
2.2 PERIODONTITIS APICAL SINTOMÁTICA	15
2.3 INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA	17
2.3.1 Neuropéptidos	18
2.3.2 Sustancia P (SP).....	20
2.3.3 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	21
2.4 CONFORMACIÓN DE CONDUCTOS RADICULARES.....	23
2.5 LIMAS MANUALES ACERO INOXIDABLE.....	24
2.6 LIMAS ROTATORIAS DE NIQUEL TITANIO	25
2.7 SISTEMAS ROTATORIOS.....	28
2.7.1 RECIPROC BLUE (VDW MUNICH, ALEMANIA):	29
2.7.2 WAVEONE GOLD (DENTPLY MAILLEFER BALLAIGUES, SUIZA).....	29
2.7.3 XP- ENDO SHAPER (FKG / SWISS ENDO, SUIZA)	30
3. MARCO REFERENCIAL	31

4. OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5. ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	34
5.1 TIPO DE ESTUDIO	34
5.2 HIPOTESIS	34
5.3 OBJETO DE ESTUDIO	34
5.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO	34
5.5 MUESTRA Y MUESTREO	35
5.6 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD	36
5.7 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	37
6. PROCEDIMIENTO.....	38
6.1 Radioinmunoanálisis	42
7. INSTRUMENTO	44
8. ANALISIS ESTADÍSTICO	58
9. CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO.....	59
9.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN	59
9.2 MANEJO DE SUSTANCIAS O ESPECÍMENES BIOLÓGICOS	59
9.3 ARCHIVO DE DATOS Y SISTEMATIZACIÓN:	59
9.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS:.....	59

9.5 SEGURIDAD.....	60
9.6 CONFIDENCIALIDAD	61
9.7 RESULTADOS.....	61
10. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	69
10.1 Presupuesto	69
10.2 Cronograma	69
11. Referencias bibliográficas	71

1. ASPECTO TEORICO CIENTÍFICO

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inflamación del ligamento periodontal (LP) postendodoncia se denomina clínicamente periodontitis apical sintomática, es una de las problemáticas más comunes en el desarrollo del tratamiento de endodoncia convencional como causante del dolor post-tratamiento. Durante las primeras 24 y 48 horas la inflamación se presenta en un porcentaje de 40-65 %, y la tasa disminuye al 11% durante los 7 días siguientes (1). La periodontitis apical sintomática se origina debido al trauma mecánico y químico que se presenta durante la preparación, como el calor por fricción generado por el instrumento rotando dentro del conducto, al sobrepaso de irritantes como sustancias irrigadoras por presión durante la irrigación, la extrusión de detritus, como tejido pulpar vital o necrótico, microorganismos y materiales inerte (2,3).

Esta inflamación del LP es de naturaleza neurogénica, donde el sistema nervioso gobierna el sistema vascular y el sistema inmune, por medio de la liberación de neuropéptidos tales como, la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (1,2).

La SP y el CGRP son neuropéptidos somato sensoriales, que se originan en el ganglio trigeminal y son transportados a las terminales nerviosas del ligamento periodontal donde son almacenados; estos se localizan en las fibras amielínicas tipo C (4).

La SP contiene 11 aminoácidos, y tiene como función, bajo una injuria, potencializar los efectos de la inflamación; actúa por medio de receptores, denominados neuroquinina (NK1, NK2 y NK3) (5). El CGRP, es un neuropéptido de 36 aminoácidos, asociado a la familia de los péptidos denominados calcitoninas; este produce inmunosupresión, debido a que inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos; ejerce su efecto en los tejidos mediante la unión a las células diana que expresan el receptor-1 (CGRP_{r1}) o receptor-2 (CGRP_{r2}) (5,6,7).

Estos neuropéptidos son capaces de desencadenar la activación de vasodilatación, siendo la SP el componente inicial de la respuesta vasodilatadora, mientras que el aumento prolongado del flujo vascular es dependiente del CGRP. Se ha reportado que el CGRP prolonga el efecto de la SP inhibiendo la degradación enzimática de la misma, por consiguiente ocurre una extravasación del plasma, lo cual genera un enlentecimiento del flujo sanguíneo, controlando de tal manera al sistema vascular; como consecuencia de este proceso hay una activación del sistema inmunológico donde ocurre un reclutamiento y/o regulación de células inflamatorias quimiotácticas, tales como macrófagos, mastocitos y linfocitos, controlando el sistema inmune (2,8).

El enlentecimiento del flujo sanguíneo genera un acumulo de mediadores de la inflamación, tales como prostaglandina, interleuquinas, citoquinas y tromboxanos, lo cual, genera una magnificación del fenómeno inflamatorio en el ligamento periodontal, siendo la razón de las manifestaciones clínicas de dolor asociadas a la periodontitis apical sintomática, debido al trauma mecánico y químico, generado durante la preparación biomecánica (2,9).

A lo largo de los años la terapia endodóntica convencional ha sido llevada a cabo por diferentes tipos de instrumentos, utilizados bajo distintas cinemáticas de movimiento; desde las limas manuales de acero inoxidable, utilizadas con movimientos de tracción y pulsión, que por el perfil de sección cuadrada o triangular, y conicidad .02, hace que estas sean más rígidas (2), y exista mayor presión y extrusión de detritus durante la preparación biomecánica, lo cual genera la periodontitis apical sintomática, por inflamación del LP (8).

Para mejorar esta problemática, surgieron los sistemas rotatorios de níquel titanio de rotación continua, esta aleación ofrece una gran flexibilidad, súper elasticidad, y una preparación más centrada (8); Dentro de la modificación en su diseño fueron aumentadas sus conicidades, cambiaron los perfiles de sección, puntas y ángulos helicoidales, y así fue posible la reducción del número de instrumentos para la conformación del conducto radicular, aunque seguían siendo una secuencia de limas (2). Existen estudios donde han reportado que sistemas de rotación continua como ProTaper Universal (Dentsply Maillefer Ballaigues, Suiza), MTWO (VDW Munich, Alemania) y RaCe (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suiza), generan expresión de neuropéptidos a pesar de los cambios ya mencionados anteriormente, siendo el sistema rotatorio Protaper Universal, el que generó mayor liberación de SP y CGRP. Sin embargo no lograron controlar la periodontitis apical sintomática post-tratamiento, ni la disminución de expresión de neuropéptidos (1,8).

Dentro de este contexto surgieron los instrumentos de lima única, como el Reciproc (VDW Munich, Alemania) y Waveone (Dentsply Maillefer Ballaigues, Suiza), con movimiento alterno recíprocante en sentido antihorario y horario, con diferentes

perfiles de sección, ángulos helicoidales, y puntas (2). Este sistema de limas rota en 360° después de haber realizado tres ciclos de corte en el movimiento antihorario y un desenganche en el sentido horario; los objetivos de esta nueva técnica fueron disminuir la tensión ejercida, la reducción en la secuencia de limas, evitando así el trauma generado por la preparación biomecánica y por ende la liberación de neuropéptidos (2,10,11); existen estudios donde midieron la expresión de SP y CGRP, y comprobaron que el sistema rotatorio Waveone (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza) expresó un 50 % más de neuropéptidos que el sistema rotatorio Reciproc (VDW Munich, Alemania), debido a sus características de diseño, considerándolo de mayor masa que el que presenta el sistema Reciproc (1,2).

Como estos sistemas rotatorios siguieron generando inflamación del LP, por ende periodontitis apical sintomática, los avances tecnológicos ponen a disposición hoy en día, nuevas limas únicas como el Reciproc blue (VDW Munich, Alemania), que es un sistema de lima única con movimiento alterno recíprocante donde el instrumento es impulsado en una dirección de corte en sentido antihorario de 150° y luego se produce un giro en sentido inverso de 30° con una velocidad de 300rpm; presenta una aleación denominada Blue NITI, sometida a un tratamiento de calentamiento-enfriamiento que resulta en una capa de óxido de titanio visible en la superficie del instrumento, lo que le da un aspecto azul (12), este proceso cambia la estructura molecular y aumenta sus propiedades de resistencia y flexibilidad; tiene una sección transversal en forma de S, presenta 2 filos cortantes, y una punta no cortante (13).

El sistema rotatorio Waveone gold (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza), es un sistema de lima única con movimiento recíprocante, donde el instrumento es impulsado en una dirección de corte en sentido antihorario de 170° y luego se produce un giro en sentido inverso de 50° con una velocidad de 350rpm; presenta una aleación denominada Gold, con un tratamiento térmico posterior a su fabricación, en la cual se ejecuta manualmente un calentamiento-enfriamiento, lo cual mejora la elasticidad de la lima y le da un aspecto dorado; Tiene una sección transversal de paralelograma con 2 ángulos de corte, que reduce la masa del instrumento y proporciona espacio para liberar los detritus, tiene una conicidad variable entre sus instrumentos y presenta punta semiactiva (14, 15).

También surgió la lima XP- Endo shaper (FKG / Swiss endo, Suiza), es un sistema de lima única con movimiento continuo, utiliza una velocidad de 800- 1000rpm, presenta una aleación Max-wire, la cual le aporta dos propiedades fundamentales: súper elasticidad y memoria de forma, esta se adapta a los cambios según la temperatura y toma una forma predeterminada del conducto radicular; este sistema también presenta una punta activa con seis filos de corte denominada Booster tip (BT), que permite que el instrumento aumente constantemente su campo de trabajo hasta lograr un tamaño ISO 30. su forma preestablecida y su extrema flexibilidad permite que estos instrumentos se contraigan y se expandan dentro del propio conducto y lleguen a áreas donde los instrumentos convencionales no pueden acceder, presenta un perfil de sección triangular, presenta una conicidad inicial de 0,01, que se expande una vez dentro del conducto, logrando una conicidad de al menos 0,04 (16, 17).

Se han realizado estudios donde reportan la expresión de neuropéptidos en el ligamento periodontal de los dientes extraídos después de la preparación biomecánica con sistemas de rotación continua y sistemas recíprocos, donde han concluido que todos los sistemas rotatorios causan algún grado de extrusión apical, con una mayor extrusión de detritus con los sistemas de movimiento recíproco en comparación con los sistemas de rotación continua. Concluyen que los resultados podrían explicarse por la cantidad de dentina cortada por el instrumento en un corto período de tiempo con los sistemas de lima única, y que la extrusión de detritus se asocia con la periodontitis apical sintomática post endodóntica (1).

Este estudio se realizó in vivo en premolares humanos con indicación de exodoncia por fines ortodónticos, siendo un ensayo clínico controlado aleatorizado y estandarizado, donde se cuantificó objetivamente la expresión de SP y CGRP para evaluar la inflamación del LP, posterior a la preparación biomecánica por medio de los sistemas rotatorios de limas únicas, basado en los estándares de calidad de amstar y prisma (1, 18, 19).

Debido al nuevo diseño de estos instrumentos, cambios de aleación, diseño y tipo de movimiento, el propósito de este estudio es cuantificar los niveles de expresión de SP y CGRP en el ligamento periodontal humano posterior a la preparación con los sistemas de limas única, Reciproc blue (VDW Munich, Alemania), Wave one gold (Dentsply Maillefer Ballaigues, Suiza) y XP-Endo shaper (FKG/ Swiss endo, Suiza), en premolares inferiores humanos.

¿Cuál es la expresión de Sustancia P y el Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el ligamento periodontal de premolares inferiores

humanos, cuando se realizan procedimientos de preparación biomecánica, efectuados con los sistemas de limas Waveone gold, reciproc blue y KFG endo-shaper ?

1.3 JUSTIFICACIÓN

La periodontitis apical sintomática es una de las problemáticas más comúnmente asociadas al desarrollo del dolor post-tratamiento endodóntico, generado por los diversos sistemas rotatorios de limas única de rotación continua y reciprocante. Este estudio in vivo, brinda la información adecuada para que el operador seleccione los sistemas rotatorios, que genere menor inflamación del ligamento periodontal y menor dolor post-operatorio.

1.4 PROPÓSITO

Brindar información sobre la relación biológica y mecánica de las limas rotatorias Reciproc blue, Waveone gold y XP endo shaper, para que el operador pueda seleccionar adecuadamente el sistema rotatorio que genere menor inflamación del ligamento periodontal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal es un tejido conjuntivo denso, originado por el saco dentario del tejido mesenquimático, que une el cemento radicular con el hueso alveolar por medio de sus fibras. Sus principales funciones son mantener el diente en el alveolo, soportar y resistir las fuerzas durante la masticación y actuar como receptor sensorial (20).

Está constituido por una alta densidad celular, además de fibras, vasos y nervios. Entre las células presentes, se encuentran: fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, mastocitos, macrófagos, células o retos epiteliales de Malassez y células madres. Todos estos elementos celulares son muy heterogéneos e importantes, a pesar de que abundan los fibroblastos (20).

El ligamento periodontal se encuentra altamente vascularizado e innervado, formando una red de arteriolas y capilares, que se encuentra presente en el tercio apical y cervical, más que en el tercio medio. Por otro lado la innervación proviene de los nervios maxilar superior y dentario inferior (20, 21).

Por la presencia de esta vascularización e innervación, comúnmente, el ligamento periodontal puede llegar a presentar una reacción inmuno inflamatoria generada por diferentes injurias, tales como la preparación biomecánica, y/o infección bacteriana, causando periodontitis apical. Aunque la infección microbiana de la pulpa en los conductos radiculares es la causa más importante de la periodontitis apical, los cambios patológicos de los tejidos periapicales no suelen ser causados directamente por los propios microorganismos, si no por sus toxinas, productos metabólicos nocivos y el tejido desintegrado de la pulpa en el sistema de conductos radiculares (21, 22).

También están implicados en la respuesta inmunitaria inflamatoria los mastocitos, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células inmunitarias innatas y adaptativas, inmunoglobulinas, mediadores de la inflamación, citocinas proinflamatorias, quimiocinas, leucotrienos, prostaglandinas y neuropéptidos (22).

La periodontitis apical puede ser protectora o destructora, dependiendo de la interacción dinámica entre la agresión microbiana y las defensas del huésped en los tejidos periapicales (22).

No obstante, la presencia de periodontitis apical después de un tratamiento endodóntico, puede deberse a la presencia de las biopelículas microbianas o también puede ocurrir por la preparación biomecánica y extrusión de detritus, el cual genera una reacción antígeno-anticuerpo con la correspondiente inflamación del ligamento periodontal de naturaleza neurogénica (2).

2.2 PERIODONTITIS APICAL SINTOMÁTICA

La periodontitis apical sintomática se define como una inflamación aguda del ligamento periodontal, debido a microorganismos persistentes y/o post tratamiento endodónticos. Se presenta con un dolor de moderado a severo al momento de la masticación o percusión, generando una situación no deseada por parte del odontólogo y el paciente. La causa del dolor postoperatorio es debido al sobrepaso de irritantes como la extrusión de detritus, tejido pulpar vital o necrótico, microorganismos, materiales inerte, sustancias irrigadoras y/o presión (2, 23). De hecho, se ha sugerido que el daño microbiano es probablemente la causa más común de dolor postoperatorio, y algunas bacterias anaerobias Gram-negativas pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de los síntomas (23, 24).

El desarrollo de la periodontitis apical sintomática refleja en gran parte el sistema inmunitario innato y es la primera línea de defensa activa frente a los agentes irritantes procedentes del conducto radicular (22).

Cuando los tejidos periapicales se lesionan, se liberan sustancias químicas que se activan, tales como la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, y la quimiotaxis de las células inflamatorias (22).

Estos mediadores químicos de la inflamación como la histamina, metabolitos del ácido araquidónico, citocinas, neuropéptidos, enzimas lisosomales, el óxido nítrico, radicales libres derivados del oxígeno, y los factores derivados de plasma (sistemas de complemento, quininas, y la coagulación) . La mayoría de estos mediadores han sido detectados en lesiones perirradiculares. Aunque algunos mediadores pueden causar dolor por efecto directo sobre las fibras nerviosas sensoriales, el evento inflamatorio importante responsable del dolor perirradicular es el aumento de la permeabilidad vascular y edema, que conducen a la compresión de las fibras nerviosas (25).

Se ha demostrado que la respuesta inflamatoria del ligamento periodontal durante dicha reacción, el sistema nervioso gobierna al sistema vascular y el sistema inmune por medio de la liberación de neuropéptidos tales como, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (26).

2.3 INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA

Al igual que en la pulpa dental, la inflamación del ligamento periodontal tiene un origen neurogénica, que es inducido por la liberación de neuropéptidos desde las fibras nerviosas C y Ad, donde las principales son la sustancia p y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). La inflamación del ligamento periodontal es un proceso complejo que envuelve una amplia variedad de reacciones vasculares y nerviosas, las cuales son los componentes claves de un fenómeno neurogénico (27, 28).

Se ha postulado que la inflamación del ligamento periodontal se encuentra influenciada por muchos factores, tales como, procesos mecánicos, químicos y / o micro filtración bacteriana (28).

El ligamento periodontal se encuentra altamente innervada por una subpoblación de neuronas sensoriales las cuales contienen neuropéptidos tales como Sustancia P y CGRP. Estos neuropéptidos son liberados a partir de fibras aferentes y se encuentran asociados con el desarrollo de la inflamación neurogénica y los procesos de reparación a nivel perirradicular. La forma predominante de inflamación en el ligamento periodontal es aquella mediada neurogénicamente, lo cual sugiere que la liberación de mediadores químicos de la inflamación produce cambios significativos durante procesos inflamatorios y contribuyen a la producción de signos y síntomas clínicos (21, 22).

La sustancia P es un neuropéptido pro inflamatorio, el cual causa éstasis vascular, permeabilidad capilar, contracción de células endoteliales lo cual produce un incremento en la filtración de proteínas plasmáticas, y quimiotáxis de leucocitos al

tejido lesionado (29) que inducen el aumento de la presión tisular pulpar debido al acúmulo de fluido en el espacio intersticial originado por vasodilatación^{30 31}. Por otro lado el CGRP produce inmunosupresión, debido a que inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos (6, 26).

Por consiguiente, se denomina inflamación neurogénica debido al control que ejerce el sistema nervioso periférico sobre la microcirculación del ligamento periodontal, generando vasodilatación y extravasación de plasma en el área circundante.

2.3.1 Neuropéptidos

Los neuropéptidos son polipéptidos que se encuentran en el sistema nervioso central y periférico (32,33) y juegan un papel importante en la transmisión de los estímulos nerviosos, ya sea como neurotransmisores o como neuromoduladores. Los neurotransmisores son sustancias contenidas en las células nerviosas específicamente en su proceso citoplasmático; la neurotransmisión ocurre entre células adyacentes y por la liberación de estas sustancias de una terminación nerviosa hacia una estimulación neuronal. Los neuromoduladores actúan de manera similar a un neurotransmisor, con la diferencia de que no queda restringido al espacio sináptico sino que se difunde por el fluido extracelular. Un neuromodulador es un producto liberado en una sinapsis que influye directamente en las consecuencias postsinápticas de la neurotransmisión y juegan un papel asistente en la transmisión sináptica. Estudios farmacológicos y fisiológicos han revelado que algunos neuropéptidos actúan como neurotransmisores, mientras otros como neuromoduladores (32).

En el ligamento periodontal estas sustancias se encuentran casi exclusivamente dentro de las terminales de neuronas aferentes, fibras simpáticas, o incluso, en fibras parasimpáticas, neuronas que típicamente acompañan los vasos sanguíneos pulpaes, y por consiguiente juegan un papel activo durante la inflamación neurogénica del ligamento periodontal, cumpliendo un rol similar a las aminas vasoactivas y eicosanoides, iniciando y propagando la respuesta inflamatoria y el proceso de reparación (27).

Estas sustancias juegan un papel importante en la transmisión de los estímulos nerviosos (33), siendo liberados por neuronas sensoriales, en presencia de estímulos dolorosos y nociceptivos de nervios que inervan una zona inflamada, induciendo la producción y liberación de otros mediadores como histamina, óxido nítrico y quininas, controlando el flujo sanguíneo, regulando estadios tardíos de inflamación (34).

Además de sus funciones durante la inflamación del ligamento periodontal, estos neuropéptidos tienen un rol inmuno modulador, estimulando y agrupando células inmunocompetentes (31), ya que estimula la liberación de interleuquina 8 (IL8) y de proteína quimioattractante de monocitos (MCP1) las cuales juegan un papel importante en la atracción de leucocitos y neutrófilos al lugar de la injuria, y se encuentran directamente relacionados con la reparación del tejido (27). Las células inmunes también pueden expresar receptores funcionales para los neuropéptidos, lo cual sugiere que los neuropéptidos juegan un papel importante durante los procesos de reparación (31).

2.3.2 Sustancia P (SP)

La SP fue identificada en principios del siglo pasado, inicialmente aislada de un corte de cerebro e intestino de cobayo, en 1956 a 1959 G. Zetler, U. von Euler, F. Lembeck, B. Pernow, y otros, estudiaron la localización de la sustancia P en el sistema nervioso y encontraron altas concentraciones en el hipotálamo, tálamo y núcleo basal (35).

A este agente se le denominó SP, y el trabajo pionero de Lembeck, observó que era un transmisor neuronal sensorial asociado a la transmisión del dolor, debido a las altas concentraciones de este agente localizado en la raíz dorsal de la médula espinal (36). Esta sustancia está relacionada con los mecanismos dolorosos, ya que está presente en las fibras C, los cuales son unos aferentes primarios relacionados con la neurotransmisión del dolor (36).

Fue el primer miembro de esta familia en ser purificado y caracterizado (37). Esta sustancia es sintetizada en el cuerpo celular de fibras primarias amielínicas de diámetro pequeño, es transportada central y periféricamente por el axón hasta ser liberada en la terminación nerviosa cuando hay una estimulación (38).

La SP es la primera sustancia neuroactiva que se propone como neurotransmisor y al mismo tiempo se propone su liberación en relación al estímulo y su dependencia de calcio en diversos preparados *in vitro* de médula espinal.

Otras de las funciones de la SP son estimular la contracción de los músculos lisos vasculares y extravasculares, provocar un intenso refuerzo de la salivación y otras acciones centrales. Se ha demostrado su presencia en intestino, glándulas salivares

y en la mayor parte de las áreas del SNC, sobre todo en hipotálamo y sustancia negra, y en el asta dorsal de la médula espinal (35, 36).

Los efectos producidos por la SP y otras taquininas liberadas en los extremos periféricos de las neuronas primarias sensoriales sensibles a la capsaicina (fibras C), en conjunto se traduce en inflamación neurogénica. Las respuestas producidas en el nivel periférico por los neuropéptidos son en particular predominantes sobre la vasculatura donde causan vasodilatación de arteriolas, extravasación de proteínas plasmáticas y adherencia de leucocitos a las células endoteliales de las paredes de los vasos sanguíneos (36).

El entendimiento de la injuria al ligamento periodontal y su actividad de reparación, seguida de los procedimientos dentales, son importantes para tomar decisiones de tratamiento que sean congruentes con la respuesta de reparación natural del diente (39).

2.3.3 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

CGRP es un neuropéptido de 37 aminoácidos identificado en 1982, asociado a la familia de los péptidos denominados calcitoninas (40). Las células inmunorreactivas CGRP constituyen el 40% -50% de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (41), este presenta dos isoformas (CGRP-alfa ó CGRP-1 y CGRP-beta ó CGRP-2) estos se han identificado sobre la base de respuestas farmacológicas a agonistas y antagonistas selectivos y posteriormente identificados por métodos moleculares (42); El receptor similar a receptores de calcitonina (CRLR) es un componente importante del complejo receptor CGRP1. CRLR mRNA proteína ha sido

identificada en la pulpa dental humana y las neuronas del trigémino por transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (43).

El CGRP se encuentra en las neuronas aferentes primarias, procedentes del ganglio trigeminal que terminan en el núcleo trigeminal espinal (44). También las secciones inmunohistoquímicas demuestran que las neuronas inmunorreactivas de CGRP se ramifican extensamente en la pulpa coronal y penetran en la dentina (45). De igual forma se ha detectado CGRP en el líquido crevicular gingival (46).

El CGRP tiene una alta afinidad de sitios de unión como el cerebro, así como en diversos órganos periféricos como el corazón, el hígado, el bazo, el músculo esquelético, el pulmón y la pulpa dental (47, 48, 49). Estimula la adenosina monofosfato cíclico en las líneas celulares de osteoblastos e inhibe la reabsorción ósea, lo que confirma la presencia de receptor de CGRP en el tejido óseo que señala vía de síntesis cíclica de adenosina monofosfato (49).

Entre otras de sus funciones el CGRP produce inmunosupresión, debido a que inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos, y ejerce su efecto en los tejidos mediante la unión a las células diana que expresan receptor CGRP-1 (CGRP_{Pr1}) o receptor-2 (CGRP_{Pr2}) (7). Este neuropéptido interactúa con diferentes tipos de células inmunorreguladoras como los macrófagos (6).

Además de las funciones principales de los neuropéptidos como lo es el primer signo de inflamación (vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular), ahora sabemos que la función de estos neuropéptidos en el proceso de inflamación es mucho más compleja. Durante el desarrollo de las lesiones crónicas de la

periodontitis apical, los neuropéptidos también participan en la regulación inmunitaria, osteoclastica y la cicatrización de lesiones (22).

Se ha reportado en el ámbito de la endodoncia la periodontitis apical sintomática es originada debido al sobrepaso de irritantes como la extrusión de detritus durante la preparación biomecánica con los diferentes sistemas de instrumentación utilizados actualmente.

2.4 CONFORMACIÓN DE CONDUCTOS RADICULARES

Los objetivos de la instrumentación en endodoncia incluyen el desbridamiento y desinfección a fondo del sistema de conducto radicales, además, para crear una forma adecuada para conseguir una obturación tridimensional completa, se consideran pasos decisivos, puesto que determinan la eficacia de los procedimientos subsiguientes (50).

Los resultados de la preparación del conducto son afectados adversamente por la gran variabilidad de la anatomía del conducto radicular y debido a la instrumentación e irrigación, ya que, los desechos que contienen tejido necrótico, microorganismos, fragmentos de la pulpa y particular de dentina, pueden ser extruidas desde el tercio coronal hasta el periapice. La cantidad de extrusión de desechos puede ser diferente de acuerdo con las técnicas de preparación biomecánica y el diseño de las limas (51).

Se dispone de una amplia gama de instrumentos, tanto manuales como rotatorios, para la preparación del conducto radicular (52).

2.5 LIMAS MANUALES ACERO INOXIDABLE

Hasta la última década del siglo pasado, los instrumentos endodónticos se fabricaban de acero inoxidable, los cuales por su perfil de sección triangular y conicidad 0.2 presentan una rigidez, que les daba como desventaja no proporcionar una adecuada resistencia y presentar mayor extrusión de detritus, por lo cual, ocasionaban periodontitis apical sintomática post tratamiento con mayor frecuencia (53, 54).

En los años 1958, propusieron unas normas para la estandarización de los diámetros, la conicidad, y otros parámetros de los instrumentos endodónticos, en el campo de la odontología; estas propuestas fueron establecidas por la asociación dental americana (ADA) y el instituto nacional estandar americano (ANSI), así como la organización internacional de normalización (ISO) y la federación internacional dental (FDI) (55). Todos los instrumentos constan de 3 tipos básicos: ensanchadores K, limas K, Hedstrom y sus derivaciones (56).

La diferencia entre uno y otro, es el número de espiras. Las limas K tienen aproximadamente el doble que los ensanchadores, esto va a influir en el ángulo de corte, cuando el ángulo es menor a 45° (ensanchadores y limas K), estos instrumentos son más efectivos en rotación (56).

Inicialmente las limas de acero inoxidable, como las limas tipo K de sección cuadrangular se modificaron por una sección triangular, presentando mayor número

de espiras y más flexibilidad, así mismo mejora en su corte, ya que, la lima cuadrangular su ángulo era 90° y la triangular de 60° (56). Entre las limas triangulares se encuentran las flexofile (Dentply Maillefer), esta es una lima torsionada con punta en forma de maseta e inactiva, con una conicidad 0,2 y un ángulo 40° . La flex-R (Moyco unión broach), es una lima torsionada, su porción terminal es en forma cónica, con un ángulo de 35° hasta 70° (57).

Las limas K- Flex fabricadas por torsión con una sección romboidal, posee dos ángulos de corte de 80° y dos ángulos de 100° , dejando un espacio entre el instrumento y la dentina, de tal forma favorece la remoción de dentina (57).

En los últimos años la fabricación de las limas K de acero inoxidable, al presentar una sección triangular como las flexofile y una sección romboidal como la k-flex, va generar menor rigidez y más flexibilidad (56).

La mayoría de los instrumento se fabrican con aleaciones de acero inoxidable, que presenta mejor características físicas, que las de acero de carbono, como su ductibilidad y resistencia a la corrosión. Sin embargo con el tiempo se introdujo las aleaciones de níquel-titanio y titanio-aluminio, para mejorar así las desventajas del acero inoxidable (57).

2.6 LIMAS ROTATORIAS DE NIQUEL TITANIO

Las aleaciones de níquel titanio se han desarrollaron en los laboratorios de la marina estadounidense, en la década de los 60. Inicialmente recibió el nombre de nitinol y se empezó a comparar con la aleación de acero inoxidable, el cual poseía mayor flexibilidad y mayor resistencia a la fatiga cíclica por torsión (58). Esta aleación

contiene un 50-56% de níquel y un 44-50% de titanio. Su primera utilización fue para los alambres de ortodoncia (56).

Estos instrumentos endodónticos de níquel-titanio poseen buenas propiedades físicas, como su capacidad de corte y memoria de forma, es decir, la capacidad de deformarse de modo reversible por presión o temperatura y puede llegar a recuperar su forma inicial, el cual recibe el nombre de pseudoelasticidad; si la fuerza ejercida sobrepasa el límite elástico, la deformación será irreversible (56).

Esta aleación posee dos tratamientos térmicos: La transformación inicial de la fase austenita a la martensita, cuando es sometido el instrumento a estrés (presión o calor). Al iniciar esta transformación el instrumento se vuelve frágil y puede estar sometido a fractura (56).

Al principio los fabricantes se interesaron en la elaboración de las limas K y H con estas nuevas aleaciones. Los estudios han demostrado que estos instrumentos tienen un módulo de elasticidad y flexión inferiores a las de acero inoxidable. Sin embargo el uso de las limas K o limas de níquel-titanio no han representado un avance importante en la conformación del conducto radicular, por lo tanto, los fabricantes sacaron al mercado el sistema de limas rotatorias con nuevas aleaciones y tratamientos de superficie (57).

Estos sistemas de limas rotatorias de níquel titanio (NiTi), comenzaron a variar los diseños de los instrumentos en lo que respecta a la conicidad, las longitudes de las hojas de corte y el diseño de la punta, mejorando las propiedades de las limas y así buscar una menor extrusión de detritus (54).

La aleación de las limas de níquel titanio M-Wire se utilizó para mejorar las propiedades mecánicas, usando un proceso térmico que puede incrementar sustancialmente la flexibilidad y la resistencia mecánica de los instrumentos. Esta aleación contiene tres fases: austenita, martensita y fase R; brindándole características especiales como súper elasticidad y memoria de forma (58).

Se inició con el sistema de limas de rotación continua con secuencia de limas NiTi, por las deficiencias de esta secuencia de limas, aumentaron conicidad para disminuir la cantidad de limas, y modificación perfiles de sección para reducir la extrusión de detritus, sin embargo, esto no fue posible, por lo que la periodontitis apical sintomática persistía luego del tratamiento endodóntico (2).

Luego se introdujo dos sistemas de movimiento alternativo de limas únicas, tales como, Reciproc (VDW) y Waveone (Dentsply maillefer), estos presentan una aleación de M-Wire, para mejorar las propiedades mecánicas usando un proceso término diferencial que puede incrementar sustancialmente la flexibilidad y la resistencia de los instrumentos de NiTi. El objetivo de estos sistemas fue su reducción de secuencia de limas y disminuir la presión ejercida, y por ende la extrusión de detritus (59, 60).

Actualmente surgieron limas únicas de rotación continua recíprocante como lo son los sistemas Reciproc blue, Waveone Gold y XP- Endo Shaper (FKG swiss endo), los cuales presentan aleaciones de NiTi y tratamientos de superficies, que le brindan

mejores propiedades, como superelasticidad, memoria de forma y adaptabilidad a temperaturas (13, 15, 17).

2.7 SISTEMAS ROTATORIOS

Desde los primeros sistemas rotatorios en el 2009, el 98% de ellos se utilizó en la práctica diaria. Estos inician con los sistemas de rotación continua (8), modificando sus perfiles de sección, puntas y ángulos helicoidales, y así fue posible la reducción del número de instrumentos para la conformación del conducto radicular, aunque seguían siendo una secuencia de limas (2). Inicialmente surgieron dentro de los sistemas de rotación continua: ProTaper Universal (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza), MTWO (VDW Munich, Alemania) y RaCe (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suiza) (1, 8).

Cada uno de estos sistemas, con sus respectivas modificaciones con el fin de mejorar la eficiencia de los instrumentos y limitar los riesgos y consecuencias que podían llegar a causar. Dentro de este contexto surgieron los instrumentos de lima única, como el Reciproc (VDW Munich, Alemania) y Waveone (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza), con movimiento alterno recíprocante en sentido antihorario y horario, con diferentes perfiles de sección, ángulos helicoidales, y puntas (2). Este sistema de limas rota en 360° después de haber realizado tres ciclos de corte en el movimiento antihorario y un desenganche en el sentido horario; los objetivos de esta nueva técnica fueron disminuir la tensión ejercida, la reducción en la secuencia de limas, evitando así el trauma generado por la preparación biomecánica (2, 55, 13).

A partir de estas modificaciones, se inician avances tecnológicos mejorando el diseño de cada sistema e innovando con nuevas aleaciones, utilizando tratamiento de superficies, las casas comerciales ponen a disposición hoy en día, nuevas limas únicas como:

2.7.1 RECIPROC BLUE (VDW MUNICH, ALEMANIA):

Nueva generación de limas que combina el sencillo concepto de lima única, con movimiento alterno reciprocante donde el instrumento es impulsado en una dirección de corte en sentido antihorario de 150° y luego se produce un giro en sentido inverso de 30° con una velocidad de 300rpm; presenta una aleación denominada Blue NITI, sometida a un tratamiento de calentamiento-enfriamiento que resulta en una capa de óxido de titanio visible en la superficie del instrumento, lo que le da un aspecto azul (12), este proceso cambia la estructura molecular y aumenta sus propiedades de resistencia y flexibilidad; tiene una sección transversal en forma de S, presenta 2 filos cortantes, y una punta no cortante (13).

Presenta 3 limas recomendadas para los diferentes conductos radiculares como, los conductos estrechos en el cual se recomienda la lima R25 con una conicidad de 0.8; para los conductos medianos, se recomienda la R40 con una conicidad 0.6, y para los conductos amplios, se recomienda la R50 con una conicidad de 0.5 (13).

2.7.2 WAVEONE GOLD (DENTPLY MAILLEFER BALLAIGUES, SUIZA)

Es un sistema de lima única con movimiento reciprocante, donde el instrumento es impulsado en una dirección de corte en sentido antihorario de 170° y luego se produce un giro en sentido inverso de 50° con una velocidad de 350rpm; presenta una aleación denominada Gold, con un tratamiento térmico posterior a su

fabricación, en la cual se ejecuta manualmente un calentamiento-enfriamiento, lo cual mejora la elasticidad de la lima y le da un aspecto dorado; Tiene una sección transversal de paralelograma con 2 ángulos de corte, que reduce la masa del instrumento y proporciona espacio para liberar los detritus, tiene una conicidad variable entre sus instrumentos y presenta punta semiactiva (14, 15).

Incluye cuatro instrumentos: Small, primary, médium y large; diferenciados con anillos de colores en el mango, respectivamente (15).

2.7.3 XP- ENDO SHAPER (FKG / SWISS ENDO, SUIZA)

Sistema de lima única con movimiento continuo, utiliza una velocidad de 800-1000rpm, presenta una aleación Max-wire, la cual le aporta dos propiedades fundamentales: súper elasticidad y memoria de forma, esta se adapta a los cambios según la temperatura y toma una forma predeterminada del conducto radicular; este sistema también presenta una punta activa con seis filos de corte denominada Booster tip (BT), que permite que el instrumento aumente constantemente su campo de trabajo hasta lograr un tamaño ISO 30. su forma preestablecida y su extrema flexibilidad permite que estos instrumentos se contraigan y se expandan dentro del propio conducto y lleguen a áreas donde los instrumentos convencionales no pueden acceder, presenta un perfil de sección triangular, presenta una conicidad inicial de 0,01, que se expande una vez dentro del conducto, logrando una conicidad de al menos 0,04 (16, 17).

3. MARCO REFERENCIAL

En el 2016, elaboraron una revisión sistemática y meta-análisis donde comparaban la secuencia del número de limas, usadas durante la preparación biomecánica en conductos radiculares, asociado a la extrusión de detritus y su relación con la liberación de neuropéptidos generando inflamación del ligamento periodontal denominado periodontitis apical sintomática. La revisión de este estudio se llevó a cabo por medio de fuentes científicas como Pubmed, Medline, ISI Web of Science y Cochrane, de artículos relevantes; como resultado se evidenció, la liberación de neuropéptidos en el ligamento periodontal, el cual no es influenciado por el número de limas sino por el movimiento y el diseño del instrumento (1). Sin embargo la expresión de los neuropéptidos, según Siqueira en el 2002 y Caviedes y colaboradores en el 2008, hay una vasodilatación y extravasación de plasma donde una activación de numerosos tipos de células inflamatorias, derivado de factores de crecimiento y la liberación de mediadores inflamatorios, tales como histamina, citoquinas y prostaglandinas, que a su vez causa dolor e inflamación (3, 5).

Pak & White 2011, realizaron una revisión sistemática donde determinan la influencia del tratamiento de conductos radiculares sobre la prevalencia y la gravedad del dolor postratamiento endodóntico. Se evidenció durante las primeras 24-48 horas después de la preparación biomecánica, que la prevalencia fue de 40-65% y la tasa disminuye al 11% durante los 7 días restantes (61).

Capar I.D y colaboradores en el 2014, compararon la cantidad de desechos extruidos por el foramen apical hacia los tejido perirradiculares con instrumentos rotatorios de niquel titanio. Utilizaron 60 premolares, usando ProTaper universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), ProTaper Next (Dentsply Maillefer), limas Twisted (SybronEndo, Orange, CA), y HyFlex (Coltene-Whaledent, Allstetten, Suiza). La cantidad se evaluó en una balanza electrónica y como conclusión, las limas ProTaper next y lima Twisted se asociaron con menos extrusión de detritus en comparación con los sistemas ProTaper Universal y HyFlex (62).

Caviedes y colaboradores en el 2013, determinaron el efecto de dos limas únicas en la preparación del sistema radicular donde cuantificaron los niveles de expresión de la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina expresión (CGRP) en el ligamento periodontal humano sano. Se obtuvieron 40 muestras del ligamento periodontal los 3 mm del tercio apical de premolares sanos con indicación de extracción por fines ortodonticos. Eran 4 grupos de 10, Waveone, Reciproc, limas manuales y grupo control, como resultado la expresión de la sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal aumentaron cuando los dientes se prepararon con Waveone así como con la instrumentación manual. Reciproc mantuvo los niveles de SP y CGRP igual que el grupo de control negativo (2).

Tanalp J y colaboradores en el 2014, publicaron una revisión sistemática donde el propósito del estudio fue identificar las publicaciones en relación con la extrusión detritus y la extrusión de bacterias hacia los tejidos periradiculares debido al

tratamiento de conductos e irrigantes, con el fin de minimizar la extrusión a pesar que no se puede vitar (63).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los niveles de expresión de sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal humano, posterior a la preparación con los sistemas de limas única, Reciproc blue (VDW Munich, Alemania), Waveone gold (Dentsply Maillefer Ballaigues, Suiza), y XP-Endo shaper (FKG Swiss endo, Suiza) en premolares inferiores humanos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Cuantificar los niveles de expresión de sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal posterior a la preparación biomecánica, utilizando las limas rotatorias Waveone Gold (Dentsply / Maillefer).

-Cuantificar los niveles de expresión de sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal posterior a la preparación biomecánica, utilizando las limas rotatorias Reciproc blue (VDW).

-Cuantificar los niveles de expresión de sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal posterior a la preparación biomecánica, utilizando las limas rotatorias XP- Endo shaper (FKG /Swiss endo).

5. ASPECTOS METODOLÓGICOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

-Experimental in vivo.

5.2 HIPOTESIS

Hipótesis Operativa

Hipótesis alterna

- La instrumentación biomecánica en premolares inferiores en la institución universitaria colegios de Colombia (UNICOC) y consultorio particular, con limas waveone gold, reciproc blue y XP endo- shaper aumenta la liberación de Sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal.

Hipótesis Nula

- La instrumentación biomecánica en premolares inferiores en la institución universitaria colegios de Colombia (UNICOC) y consultorio particular, con limas waveone gold, reciproc blue y XP endo- shaper no genera aumento en la expresión de Sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal.

5.3 OBJETO DE ESTUDIO

Expresión de neuropéptidos en el ligamento periodontal.

5.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes de la facultad de Odontología de la Institución Universitaria Colegios de Colombia y clínicas privadas de Bogotá, a los cuales se les realizará exodoncia de

los premolares inferiores sanos por fines ortodonticos, que serán sometidos a preparación biomecánica con los sistemas rotatorios Waveone Gold, Reciproc blue y XP- Endo Shaper, para verificar la expresión de neuropéptidos, sustancia P y CGRP.

5.5 MUESTRA Y MUESTREO

Unidad observación

Picomol / miligramos.

Diseño de prueba

Consentimiento informado.

Tamaño de la muestra

50 premolares, con conducto único, con indicación de exodoncia por fines ortodonticos, curvaturas radiculares menores a 25°.

Grupo experimental:

10 premolares preparados con Waveone gold.

10 premolares preparados con Reciproc blue.

10 premolares preparados con XP- endo shaper.

Grupo control positivo:

10 premolares preparados con limas manuales.

Grupo control negativo:

10 premolares sin preparación biomecánica.

5.6 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

Criterios de inclusión

- Indicación de exodoncia por fines ortodónticos.
- Premolares sanos, sin procedimientos restaurativos.
- Conductos no calcificados.
- Ápices completamente formados.
- Sin enfermedad periodontal.
- Pacientes sistémicamente sanos.
- Pacientes adultos con rango de edad entre 18- 30 años.

Criterios de exclusión

Dependientes del paciente:

- Pacientes embarazadas.
- Pacientes con hábitos parafuncionales.
- Pacientes fumadores.

Dependientes del diente:

- Birradiculares o con más de 1 conducto.
- Anatomía complicada, doble curvatura.
- Caries coronal.
- Dientes con historia de trauma reciente.

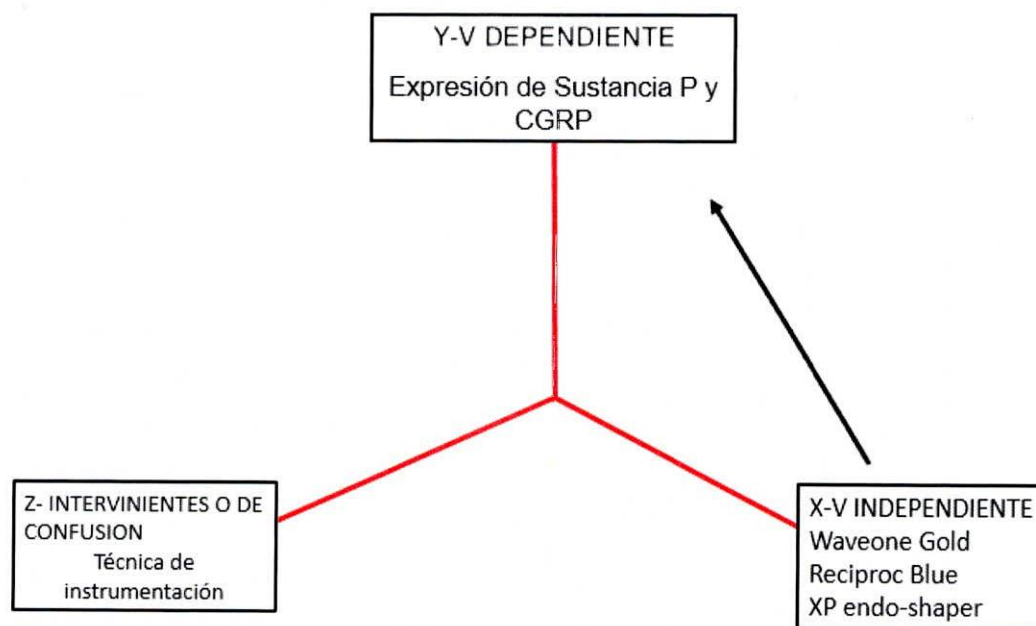
Dependientes de la muestra

- Fractura dentaria durante la luxación y exodoncia.

- Aumento de tiempos establecidos en la obtención de la muestra.
- Perforación durante preparación biomecánica.
- Fractura de instrumento durante la preparación biomecánica.
- Cantidad insuficiente de tejido para procesamiento.

5.7 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Nivel de medición	Naturaleza	Instrumento
Nivel de expresión de Reciproc blue	Sistema rotatorio de aleación blue NiTi, para la preparación de conductos radiculares	Lima única de movimiento reciprocante, que minimiza el riesgo a fractura	Cuantitativa	Pmol/mg	Dependiente	Radioinmunoanálisis
Nivel de expresión de WaveOne gold	Sistema rotatorio de aleación gold, para la preparación de conductos radiculares	Lima única de movimiento reciprocante, brinda flexibilidad y resistencia	Cuantitativa	Pmol/mg	Dependiente	Radioinmunoanálisis
Nivel de expresión de Xp endoshaper	Sistema rotatorio de aleación Max wire, para la preparación de conductos radiculares	Lima única de movimiento continuo, permite que el instrumento se expanda y contraiga dentro del conducto	Cuantitativa	Pmol/mg	Dependiente	Radioinmunoanálisis



6. PROCEDIMIENTO

Esta investigación es un estudio experimental in vivo, realizado bajo los parámetros de la resolución 8430 del 1993 del ministerio de salud de Colombia, la cual establece las normas técnicas científicas y administrativas para la investigación en salud, capítulo 1, que hace referencia a los aspectos éticos en la investigación en seres humanos; la cual se sometió a la aprobación por parte del comité de ética de la institución universitaria colegios de Colombia (UNICOC).

Se obtuvo consentimiento informado escrito de cada paciente participante en el estudio (donantes de 18-30 años, saludables, sin medicar, y no fumadores), 50 muestras de ligamento periodontal fueron obtenidas de 50 premolares inferiores, los cuales tenían indicación de exodoncia por razones ortodónticas. Todos los dientes usados estaban libres de caries y de restauraciones, con desarrollo radicular

completo determinado tanto clínica como radiográficamente, sin signos de enfermedad periodontal u oclusión traumática y sin fuerzas ortodónticas. Los dientes tenían solo un conducto recto (curvaturas del conducto mayores a 25° no fueron incluidas).

Los dientes fueron igualmente divididos y asignados al azar en los siguientes 5 grupos: (A) Grupo control de dientes intactos (C-), (B) Instrumentación manual (C+), (C) Instrumentación con el sistema Reciproc blue (RB), (D) Instrumentación con el sistema WaneOne gold (WOG) y (E) Instrumentación con el sistema XP Endo shaper (XP). Todos los dientes fueron anestesiados con bloqueo del nervio dentario inferior, con 1.8 ml de prilocaina al 4% sin vasoconstrictor (Pricanest® Ropsohn Therapeutics LTDA, Bogotá, D.C, Colombia). La adecuada anestesia pulpar fue comprobada con la respuesta negativa al test de vitalidad eléctrico.

Las limas se escogieron en igualdad de condiciones: limas manuales Flexofile (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza) desde lima la #15 a #40 con conicidad 0.2; lima #25 para el sistema rotatorio Reciproc blue (VDW Munich, Alemania) con conicidad 25/.08, lima #25 para el sistema rotatorio Waveone Gold (Dentply Maillefer Ballaigues, Suiza) con conicidad 25/.07 y lima #30 para el sistema rotatorio Xp endo shaper (FKG / Swiss endo, Suiza) con conicidad 30/.01 (13, 15, 17).

Para el grupo control de premolares sanos sin ningún tipo de preparación, las extracciones fueron realizadas de forma supraósea por métodos convencionales sin lesiones excesivas al ligamento periodontal después de la aplicación de la anestesia.

Para el resto de los grupos los dientes fueron aislados con un dique de goma, se realizó profilaxis con agua oxigenada 5-10 minutos del premolar a preparar, antes de iniciar con el procedimiento; los accesos a la cavidad se realizaron con una pieza de mano de alta velocidad usando una fresa Zekrya bur (Dentsply, Tulsa, OK), La longitud de trabajo fue establecida con la ayuda de un localizador apical (Raypex 6 VDW, Munich, Alemania) ajustado a 0.5 mm y confirmado radiográficamente, con la ayuda de un posicionador Endoray (Dentsply Maillefer Ballaigues, Suiza), y finalmente los conductos radiculares fueron preparados con las recomendaciones de cada casa comercial, antes de la exodoncia de la siguiente manera: El grupo de instrumentación manual: los conductos radiculares fueron preparados con instrumentación manual usando limas flexofile con .02 de taper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) de 10 a 40 a la longitud de trabajo con movimiento de limado (2, 8). El grupo Reciproc blue: los conductos radiculares fueron preparados usando el sistema Reciproc blue (VDW, Munich, Alemania) siguiendo la secuencia y recomendaciones estrictas según la técnica de los fabricantes, se logro un acceso en línea recta al conducto durante la apertura, se realizó patencia con una lima #10 Kfile (Dentsply Maillefer) y se determinó la longitud de trabajo con una lima manual #15 flexofile (Dentsply Maillefer) se utilizó la lima #25/.08, seleccionada anteriormente, utilizando la lima con movimientos de entrada y salida con ligera presión apical combinable con cepillado lateral en tercio cervical, medio y apical, hasta alcanzar la longitud de trabajo, con irrigación con hipoclorito de sodio al 5.25% de 3ml por tercio (13). El grupo WaveOne gold: Los conductos radiculares fueron preparados usando el sistema WaveOne gold (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) siguiendo la secuencia y recomendaciones estrictas según la técnica de los

fabricantes, se logró un acceso en línea recta durante la apertura, se realizó patencia del conducto con lima manual Kfile #10 (dentsply maillefer) y se realizó pre-ensanchamiento, luego se determinó la longitud de trabajo con una lima manual #15 flexofile (dentsply maillefer), se utilizó lima #25/.07, seleccionada anteriormente, utilizando la lima con movimientos de entrada y salida con ligera presión apical en tercio cervical, medio y apical, hasta alcanzar la longitud de trabajo, con irrigación con hipoclorito de sodio al 5.25% de 3ml por tercio (15). El grupo XP- endo shaper: los conductos radiculares fueron preparados usando el sistema XP- endo shaper (FKG / Swiss endo, Suiza) siguiendo la secuencia y recomendaciones estrictas según la técnica de los fabricantes, se logró un acceso en línea recta al conducto durante la apertura, se realizó patencia con una lima #10 Kfile (dentsply maillefer) y se determinó la longitud de trabajo con una lima #15 flexofile (dentsply maillefer) se utilizó lima #30/.01, seleccionada anteriormente, utilizando la lima con ligeros movimientos de entrada y salida de 3-5 veces en tercio cervical, medio y apical, hasta alcanzar la longitud de trabajo, con irrigación con hipoclorito de sodio al 5.25% de 3ml por tercio (17).

Las preparaciones del conducto radicular fueron realizadas por un solo operador para evitar la variación. Para la técnica de preparación manual utilizada en este estudio, consistió de 7 limas y para el sistema Reciproc blue, Wave One gold y XP Endo shaper, se usó una lima única. Las limas fueron usadas una sola vez y luego descartadas, el tiempo de preparación no excedió los 5 minutos para cada diente en la técnica manual y con los sistemas de lima única no excedió más de un minuto. La permeabilidad apical fue verificada en todos los grupos con una lima K # 10

(Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza). Los conductos fueron irrigados con 1.5 ml de hipoclorito de sodio al 5.25% entre cada lima con una jeringa Monojet con una aguja 30-G puesta 3 mm cerca de la longitud de trabajo con la instrumentación manual, y con los sistemas de lima única se irrigó 3ml de hipoclorito de sodio al 5.25% por tercios y estandarizar de esta manera el volumen del irrigante para todas las técnicas de preparación, con un total de 9ml para cada diente preparado. Se realizó exodoncia de los premolares fueron realizadas de forma supraósea por métodos convencionales sin lesiones excesivas al ligamento periodontal.

Después de la extracción, una lima k # 10 fue colocada en el conducto hasta que su punta sobresaliera del agujero para corroborar la permeabilidad apical y que todas las longitudes de trabajo fueran a 0.5 mm del foramen apical.

El tiempo de la exodoncia no excedió los 5 minutos. Las muestras de ligamento periodontal fueron obtenidas de los 3 mm apicales de la raíz con una hoja de bisturí No. 15 y puesta en un tubo de Eppendorf con 0.5ml de paraformaldehído al 4%, luego se congelaron en hielo seco y fueron almacenadas a -70°C hasta ser procesadas por la prueba de radioinmunoanálisis.

6.1 RADIOINMUNOANÁLISIS

Las muestras del ligamento periodontal fueron descongeladas gradualmente, secadas sobre un papel absorbente con el fin de retirar el exceso de paraformaldehído, para luego ser pesados en balanza analítica. Las muestras fueron colocadas dentro de tubos plásticos de 1,5 mL con 250 µL de ácido acético en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, pepstatina 1 µM, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL y ortovanadato sódico 1 mM). Estos tubos fueron

sellados con papel parafinado, y se llevaron a ebullición en un baño maría por 10 minutos, con el fin de realizar la extracción de los péptidos del tejido. El tejido luego de la extracción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante (extracto) conteniendo los péptidos fue transferido a otro tubo plástico de 1,5 mL. Posteriormente en tubos de ensayo de polipropileno, 100 µL de extracto de cada muestra fueron utilizados en las pruebas de competencia tanto para SP como para CGRP, usando los kits de radioinmunoensayo (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Belmont, CA, USA: RK-015-02 CGRP (Human) y RK-061-05 Substance P (Human, rat, Mouse)).

Se realizó una primera incubación con 100 µL de una dilución 1:100 de anti- SP (o de anti-CGRP). De la misma manera, se incubaron simultáneamente 100 µL de SP (o de CGRP) estándar a diferentes concentraciones (para la construcción de la curva de calibración) con la misma cantidad del primer anticuerpo anti-SP (o de anti-CGRP). Después de la primera incubación (16 h), se adicionaron 100 µL de ¹²⁵I-SP (o de ¹²⁵I-CGRP) (8000-10000 cpm/100 µL) a todos los tubos para una segunda incubación de 16 h. Luego de transcurrido este tiempo, se adicionaron 100 µL de segundo antisuero y 500 µL de solución amortiguadora con polietilenglicol 1%, para separar por centrifugación por 45 minutos a 3500 rpm las fracciones unidas de las fracciones libres. Los sobrenadantes se decantaron y la radioactividad de los precipitados obtenidos en cada tubo se leyó con un Contador Gamma (Gamma Assay LS 5500 Beckman). Se utilizó el análisis *scatchard* sobre la fracción unida para señalar la cantidad de SP y CGRP presente en cada muestra (64).

7. INSTRUMENTO

Instrumento #1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:

Efecto de la preparación biomecánica con los sistemas de lima única Waveone gold, Reciproc blue y XP endo-shaper en la expresión de Sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en ligamento periodontal de premolares inferiores humanos.

INVESTIGADORES

	Nombre	Correo institucional	Teléfono celular
Investigador principal	Dr. Javier Caviedes		
Estudiantes	Fabiana Laguna	flaguna@unicoc.edu.co	3103262297
	Margarita Rey	mrey@unicoc.edu.co	3143547869

Yo _____ nosotros Fabiana Laguna R. y Margarita Rey R., estudiante(s) del Postgrado de Endodoncia del Colegio Odontológico, como equipo de investigación, desarrolla el proyecto relacionado con _____.

El equipo le brindara información e invitará a participar de esta investigación, que tiene como objetivo: Cuantificar por radioinmunoanálisis los niveles de expresión de

sustancia P y CGRP en el ligamento periodontal humano posterior a la preparación con los sistemas de limas única, Waveone gold (Dentsply / Maillefer), Reciproc blue (VDW) y XP-Endo shaper (FKG/ Swiss endo), en el periodo comprendido entre Noviembre del 2016 a Junio del 2017.

Se requiere para tal investigación tomar muestras de dientes bajo el procedimiento de tratamiento endodontico con sistemas de limas, seguido de extracción dental, para medir la inflamación y dolor que generan las limas ya mencionadas durante el tratamiento endodontico, se le invita a participar en este proyecto por presentar premolares en perfecto estado que serán extraídos por fines ortodonticos.

Las muestras serán conservadas adecuadamente y serán utilizadas únicamente en esta investigación.

Al firmar el presente documento usted estará aceptando libremente participar en esta investigación científica, cuyo título y objetivo acaba de leer.

Antes de firmar este consentimiento por favor léalo cuidadosamente. Este consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Si es así, por favor pregunte a los investigadores, quienes le resolverán sus dudas al respecto. Usted puede llevar este consentimiento para discutirlo con otras personas, antes de tomar su decisión.

En este estudio participarán 25 pacientes y su participación en este estudio tendrá una duración de 6 meses, durante este tiempo el paciente debe estar comprometido con la investigación, lo cual incluye el tiempo que requiere el tratamiento que se

llevara a cabo y los controles necesarios. Así mismo, le informará las ventajas y desventajas de tales alternativas de tratamiento.

ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO

Existen otras alternativas de tratamiento para la situación que se le ha diagnosticado y estas son _____.

Las ventajas de estas alternativas son las siguientes _____ y las desventajas son _____

Si participa en este estudio, ha elegido la siguiente opción de tratamiento:

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Se debe describir con palabras no técnicas, especificando que se hará en cada sesión o en cada tiempo. Describa al participante lo que sucederá paso por paso. Puede ayudar al participante si usa dibujos o apoyos para ilustrar mejor los procedimientos. Se le debe explicar tanto los procedimientos experimentales como no experimentales.

RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO

Como en todo procedimiento clínico, existen riesgos posibles o previsibles así como riesgos imprevisibles, que suceden con muy poca frecuencia. Dentro de ellos pueden citarse los siguientes: Infección, hematoma, edema, hemorragia, trismos, complicaciones durante la anestesia.

Para minimizar los riesgos previsibles, los investigadores, quienes cuentan con la formación y experiencia suficientes para desarrollar este estudio, aplicarán todos los procedimientos de bioseguridad y le suministrarán las instrucciones preventivas correspondientes, así como le instruirán sobre las precauciones necesarias.

COMPROMISOS DE SU PARTICIPACIÓN

Su obligación personal y exclusiva implica cumplir estrictamente con las indicaciones del investigador a fin de evitar la presentación de riesgos imprevisibles e inusuales que incidan sobre la investigación y/o afecten su salud y bienestar.

Así mismo, es muy importante que usted acuda a todas las citas programadas por el investigador, dado que ese es el único mecanismo a través del cual es posible realizar un adecuado seguimiento y control del procedimiento realizado.

El tiempo estimado de cada cita es de _____ y la duración total del estudio es de 6 meses. (Aquí se le debe informar claramente los tiempos en que se requiere la colaboración del paciente).

Específicamente, al participar en esta investigación se compromete a lo siguiente:

- Suministrar información que corresponda con la realidad.
- Seguir todas las indicaciones suministradas por los investigadores. 3
- Informar oportunamente a los investigadores respecto a los eventos adversos y las reacciones que pudiera presentar relacionados con su participación en la investigación.
- No recibir ningún beneficio monetario por la participación en esta investigación, pero tampoco incurrir en gastos adicionales por la participación en este estudio.

- Informar cambios en el lugar de residencia o teléfonos de contacto. Es importante que usted informe de inmediato sobre cualquier complicación como dolor, sangrado o cualquier otra, al celular _____ preguntando por _____ (investigador principal) o comunicándose al e-mail _____, quien le orientará para que se instauren las medidas adecuadas y se resuelva de manera oportuna la situación. Igualmente podrá comunicarse con el representante del comité de ética de la institución Dra. Sandra Aguilera Rojas al teléfono 6683535 Ext. 1542.

El incumplimiento de cualquiera de los compromisos establecidos en este documento, será causa suficiente para que sea desvinculado de la investigación.

CONSIDERACIONES ESPECIALES Y COMPROMISOS DE LA INSTITUCIÓN Y DE LOS INVESTIGADORES

De acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, esta investigación se considera de RIESGO Mayor.

Las novedades médico-odontológicas que pudieren surgir como resultado de su participación en el estudio y relacionadas directamente con éste, serán atendidas por intermedio de la Institución Universitaria Colegios de Colombia – UNICOC. (Es importante especificar que tipo de riesgo: Sin riesgo, riesgo mínimo, o riesgo mayor al mínimo y copiar textualmente a que hace referencia la resolución 8430).

Por su participación en este estudio no recibirá ninguna compensación económica, pero tampoco debe incurrir en gasto alguno. El investigador tiene la obligación de informarle si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos hallazgos significativos que pudieran afectar su voluntad de seguir participando en el mismo.

Igualmente los investigadores están obligados a responder sus preguntas durante el tiempo del estudio y deben informarle, si usted así lo desea, sobre los resultados de los exámenes que se le practiquen y los resultados de la investigación cuando estos sean publicados. Igualmente están en la obligación de entregarle una copia de este consentimiento.

BENEFICIOS POTENCIALES

Su participación en el estudio beneficiará a la comunidad científica al permitir mayores conocimientos en el área de Endodoncia. En consecuencia, usted estará contribuyendo a mejorar el tratamiento de los pacientes afectados por situaciones de salud similares a la suya. (Estos pueden dividirse en beneficios para el individuo, para la comunidad o para la sociedad resultado de hallar una respuesta a la pregunta de investigación.)

CONFIDENCIALIDAD

Todos los registros fotográficos, radiográficos y en general toda la información que se recoja durante este estudio serán mantenidos bajo custodia por parte del investigador y su identificación no se divulgará a personas no relacionadas con este proyecto de investigación, sin que usted lo haya autorizado por escrito. La recopilación y presentación de información médica y odontológica respetará estrictamente los estándares profesionales de confidencialidad. Esta información podrá ser usada con fines de enseñanza e investigación respetando dicha confidencialidad.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIO

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Tiene derecho a negarse a continuar participando en la investigación en cualquier momento, es su elección y todos sus derechos serán 4 respetados. Si desea retirarse del estudio deberá notificar por escrito su decisión al investigador y asumir los riesgos que pudieran derivarse de su retiro. Una copia de este documento será entregada a usted para su consulta en cualquier momento.

CONSENTIMIENTO Y FIRMAS

El (la) Doctor(a) _____ me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se hace y para qué sirve esta investigación. También se me ha explicado y he comprendido, por qué y para qué la están realizando. Así mismo, soy consciente de que no existen garantías absolutas acerca de los resultados, dado que la investigación y demás actos conexos pueden implicar aspectos nuevos e imprevisibles. Me comprometo a atender de manera estricta los compromisos arriba mencionados, aceptando que su incumplimiento será la causa de mi desvinculación al proceso de investigación, de lo cual asumo completa responsabilidad. Manifiesto que estoy de acuerdo en no recibir ningún beneficio monetario por mi participación en este estudio.

He comprendido todo lo anterior perfectamente y por lo tanto, YO:

con documento de identidad _____ expedido en _____, doy mi consentimiento para que el (la) Dr. (Dra.) _____ y el personal auxiliar que se requiera, me realicen éste y los procedimientos complementarios que sean necesarios a juicio

de los profesionales que lo lleven a cabo. Igualmente autorizo la toma de fotografías, videos, exámenes de laboratorio o imágenes diagnósticas como radiografías y tomografías, entre otras, las cuales podrán utilizarse posteriormente para otras actividades de índole académico y científico, y en las cuales el manejo de la confidencialidad, privacidad e identidad serán acordes a las permitidas por Ley y no estarán a disposición pública.

Manifiesto que he recibido copia del presente documento, el cual consta de _____ páginas.

Lugar y fecha: _____

Firma del participante: _____

Nombre del participante: _____

C.C. # _____ de _____

Dirección: _____

Huella Teléfono: _____

Firma del Investigador: _____

Nombre: _____

Registro profesional # _____ C.C. # _____ de _____

Firma del testigo # 1: _____

Nombre del testigo # 1: _____ C.C. # _____ de _____

Teléfono: _____ Firma del testigo # 2: _____

Nombre del testigo # 2: _____ C.C. # _____ de _____

Teléfono: _____

Este consentimiento informado ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Institución Universitaria Colegios de Colombia – UNICOC.

DECLARACIÓN

Las abajo firmantes declaran que no se realizarán cambios en este protocolo a menos que se solicite la aprobación de los mismos y estos sean autorizados por el Comité de Ética de UNICOC. Los asesores metodológico y científico se responsabilizan de supervisar el desarrollo de la investigación en su totalidad, velando por el cumplimiento de lo acá estipulado. Los eventos adversos relacionados con el desarrollo de la investigación serán inmediatamente notificados a la instancia correspondiente. Los abajo firmantes certifican haber entendido y estar de acuerdo con las políticas y procedimientos del Colegio Odontológico con respecto a la investigación que incluye personas y/o tejidos humanos

FIRMAS DE LOS INVESTIGADORES

EFEECTO DE LA INSTRUMENTACION BIOMECANICA EN LA EXPRESIÓN DE SUSTANCIA P Y CGRP EN EL LIGAMENTO PERIODONTAL EN PREMOLARES INFERIORES HUMANOS

Instrumento #2

Número de muestra

Nombre: _____

Edad: _____ Teléfono: _____ Número del diente (____)



Procedimiento:Grupo control negativo: ☐Grupo control positivo: ☐Grupo experimental 1: ☐Grupo experimental 2: ☐Grupo experimental 3: ☐Número de cárpules ☐ Tiempo del procedimiento de extracción ☐Daño de la muestra durante su manipulación ☐

Observaciones

Criterios de inclusión y exclusión

CRITERIO	SI	NO
Paciente sistémicamente sano	☐	☐
Diente con diagnóstico clínico de pulpa sana	☐	☐
Desarrollo radicular completo	☐	☐
Diente sin restauraciones, caries, fracturas o desgastes cervicales	☐	☐
Presencia de enfermedad periodontal	☐	☐

Exceso de tiempo para el procedimiento de extracción: _____ (min.)		
Daño del Ligamento periodontal durante el tiempo de conservación		
Fractura dentaria durante el procedimiento de luxación y exodoncia.		
Paciente fumador (más de 10 cigarrillos al día)		
Paciente con hábitos para-funcionales clínicamente observables		

**EFFECTO DE LA INSTRUMENTACION BIOMECANICA EN LA EXPRESIÓN DE
SUSTANCIA P Y CGRP EN EL LIGAMENTO PERIODONTAL EN
PREMOLARES INFERIORES HUMANOS**

Instrumento #3. Peso del tejido del ligamento periodontal recolectado

L.P: Tejido del ligamento periodontal

Muestr a No.	Peso L.P. (mg)	Muestr ra No.	Peso L.P. (mg)
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	

7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

**EFFECTO DE LA INSTRUMENTACION BIOMECANICA EN LA EXPRESIÓN DE
SUSTANCIA P Y CGRP EN EL LIGAMENTO PERIODONTAL EN
PREMOLARES INFERIORES HUMANOS**

Instrumento #4. Resultados del radioinmunoanálisis

# Muestra	SP	Cantidad de Tejido (mg)	CGRP	Cantidad de Tejido (mg)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				

19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				

42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				

8. ANALISIS ESTADISTICO

Puesto que la prueba de Kruskal Wallis demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$) se realizaron pruebas post-hoc de comparación entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney. Tanto el grupo de ligamento sano como el grupo de instrumentación manual y el grupo XP EndoShaper, mostraron diferencias estadísticamente significativas con todos los demás grupos ($p < 0.001$). El grupo Reciproc Blue mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo WaveOne Gold ($p = 0.075$). De igual forma el grupo WaveOne Gold mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo Reciproc Blue.

9. CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO

9.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

1. Clínicas Odontológicas privadas.
2. Instituto inmunológico científico FIDIC.

9.2 MANEJO DE SUSTANCIAS O ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

Muestra del ligamento periodontal se colocó en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de paraformaldehído al 4% y se congelaron en una cava con hielo seco y fueron almacenada -70°C hasta ser procesadas por la prueba de radioinmunoanálisis.

9.3 ARCHIVO DE DATOS Y SISTEMATIZACIÓN:

Los datos obtenidos fueron organizados, archivados y almacenados para su revisión y custodiados por parte de los investigadores.

9.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El presente estudio se rigió por las normas científico-técnicas de la resolución 08430/93 del ministerio de salud y de la ley 84 de 1989. Los pacientes fueron informados sobre los objetivos del estudio y con esta información se solicitó la firma del consentimiento para su participación, el cual se anexó a este documento.

El nivel de riesgo ético de acuerdo al artículo 11 de la resolución No. 008430 de 1993 es "riesgo mayor al mínimo", ya que en este nivel se considera las investigaciones que emplee el método aleatorio de asignación de esquemas terapéuticos.

El proyecto fue ajustado a la normativa internacional (particularmente a la declaración de Helsinki y a las pautas ética para la investigación biomédica preparadas por el consejo de organizaciones internacionales de las ciencias médicas-CIOMS) y a los parámetros establecidos en el ámbito nacional por la “resolución 2378 del 2008” (expedida por el ministerio de la protección social), esta última, específica para investigaciones con medicamentos en seres humanos.

El presente estudio fue puesto a consideración del comité institucional de ética de la institución universitaria colegios de Colombia UNICOC para obtener el aval correspondiente para el desarrollo de la presenta propuesta y para la solución de conflictos éticos durante el desarrollo del mismo, de acuerdo con el diseño metodológico planteado y para realizar el debido seguimiento del mismo.

9.5 SEGURIDAD

La logística que se realizó para garantizar la seguridad de los participantes se describe a continuación.

- ✓ El instrumento fue manejado de acuerdo a las indicaciones del fabricante, teniendo en cuenta las normas para el almacenamiento y transporte del mismo.

- ✓ En todo procedimiento clínico existió riesgo previsible e imprevisible, que suceden con muy poca frecuencia dentro de estos riesgos están: Infección, hematoma, edema, hemorragia, trismo y complicaciones durante la anestesia. Para minimizar los riesgos previsible , los investigadores quienes cuentan con la formación y experiencia suficiente para desarrollar este estudio, aplicaron todos los procedimientos de bioseguridad y se les suministro las instrucciones preventivas correspondientes, así como instruirán sobre las precauciones necesarias.
- ✓ Durante la participación en el estudio si el paciente presentó cualquier enfermedad, proceso patológico o tratamiento que interfiere con los resultados del estudio, el participante fue retirado del proyecto.

9.6 CONFIDENCIALIDAD

La información que se recolecto durante el transcurso de este estudio fueron mantenidos bajo custodia por parte de los investigadores y no se divulgó a personas no relacionada con este proyecto de investigación. La recopilación y presentación médica y odontológica respetó estrictamente los estándares profesionales de comercialidad.

9.7 RESULTADOS

Se analizaron los datos provenientes de 50 muestras de ligamento periodontal clasificadas en 5 grupos de 10 muestras cada una de la siguiente manera: Grupo

A) ligamento periodontal sano (control negativo), grupo B) ligamento periodontal de dientes instrumentados con técnica manual (control positivo), grupo C) ligamento periodontal de dientes instrumentados con Reciproc Blue, grupo D) ligamento periodontal de dientes instrumentados con WaveOne Gold; y grupo E) ligamento periodontal de dientes instrumentados con XP EndoShaper. Para cada muestra se midió la expresión de SP y CGRP expresada en pmol de neuropéptido por mg de ligamento periodontal.

Con relación a la expresión de SP en ligamento periodontal, se observa que la misma fue de 0.43110 ± 0.04178 para el grupo de ligamento sano, en tanto que la mayor expresión de SP fue encontrada en el grupo de instrumentación manual la cual fue de 1.20943 ± 0.11431 , seguida por el grupo de XP EndoShaper con una expresión de 0.84053 ± 0.05175 , el grupo de WaveOne Gold con una expresión de 0.53132 ± 0.04974 , y por el grupo de Reciproc Blue que obtuvo una expresión de 0.52087 ± 0.04039 . Las medianas para cada grupo así como los valores mínimos y máximos pueden observarse también en la tabla 1.

La figura 1 muestra gráficamente el comportamiento de la expresión de SP en ligamento periodontal en los diferentes grupos analizados.

Puesto que la prueba de Kruskal Wallis demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$) se realizaron pruebas post-hoc de comparación entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney. Tanto el grupo de ligamento sano como el grupo de instrumentación manual y el grupo XP EndoShaper, mostraron diferencias estadísticamente significativas con todos los

demás grupos. El grupo Reciproc Blue mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo WaveOne Gold ($p=0.481$). De igual forma el grupo WaveOne Gold mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo Reciproc Blue. Los resultados de estas pruebas pueden observarse en la tabla 2.

Tabla 1.						
SP pmol/mg LP						
Sistema de Instrumentación	N	Media	Desv. Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo
Ligamento Sano	10	,431100	,0417811	,439000	,3690	,4901
Instrumentación Manual	10	1,209430	,1143117	1,193150	1,0331	1,3562
Reciproc Blue	10	,520870	,0403952	,515500	,4524	,6142
WaveOne Gold	10	,531320	,0497409	,535900	,4472	,5934
XP EndoShaper	10	,840530	,0517474	,844350	,7578	,9119
Total	50	,706650	,2966930	,545500	,3690	1,3562

Kruskal-Wallis $p<0.001$

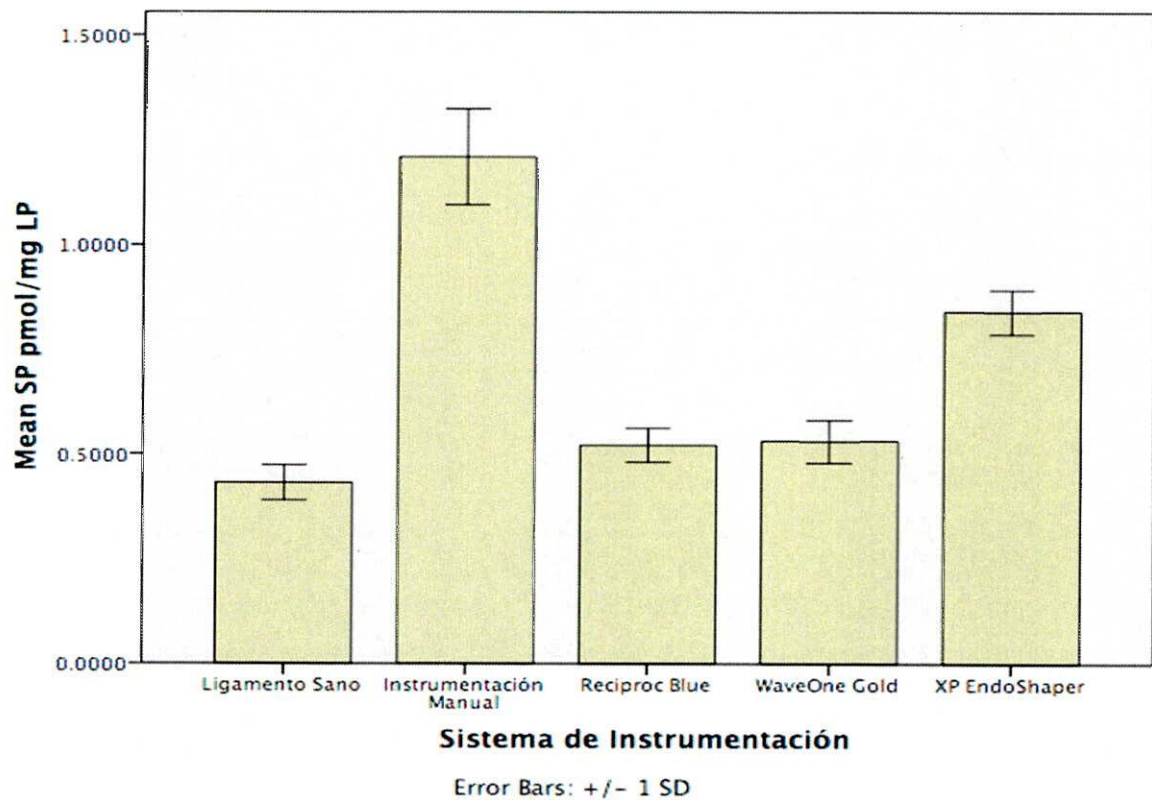


Tabla 2. Comparaciones

Post-hoc

Variable: SP pmol/mg LP

U Mann-Whitney

(I) Sistema de Instrumentación	(J) Sistema de Instrumentación	Sig.
Ligamento Sano	Instrumentación Manual	,000
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000

	XP EndoShaper	,000
Instrumentación Manual	Ligamento Sano	,000
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000
	XP EndoShaper	,000
Reciproc Blue	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación Manual	,000
	WaveOne Gold	,481
	XP EndoShaper	,000
WaveOne Gold	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación Manual	,000
	Reciproc Blue	,481
	XP EndoShaper	,000
XP EndoShaper	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación Manual	,000
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000

Con relación a la expresión de CGRP en ligamento periodontal, se observa que la misma fue de 0.01714 ± 0.0024 para el grupo de ligamento sano, en tanto que la

mayor expresión de CGRP fue encontrada en el grupo de instrumentación manual la cual fue de 0.08436 ± 0.007 , seguida por el grupo de XP EndoShaper con una expresión de 0.04266 ± 0.004948 , el grupo de WaveOne Gold con 0.03261 ± 0.00314 , y por el grupo de Reciproc Blue que obtuvo una expresión de 0.02937 ± 0.003457 . Las medianas para cada grupo así como los valores mínimos y máximos pueden observarse también en la tabla 3.

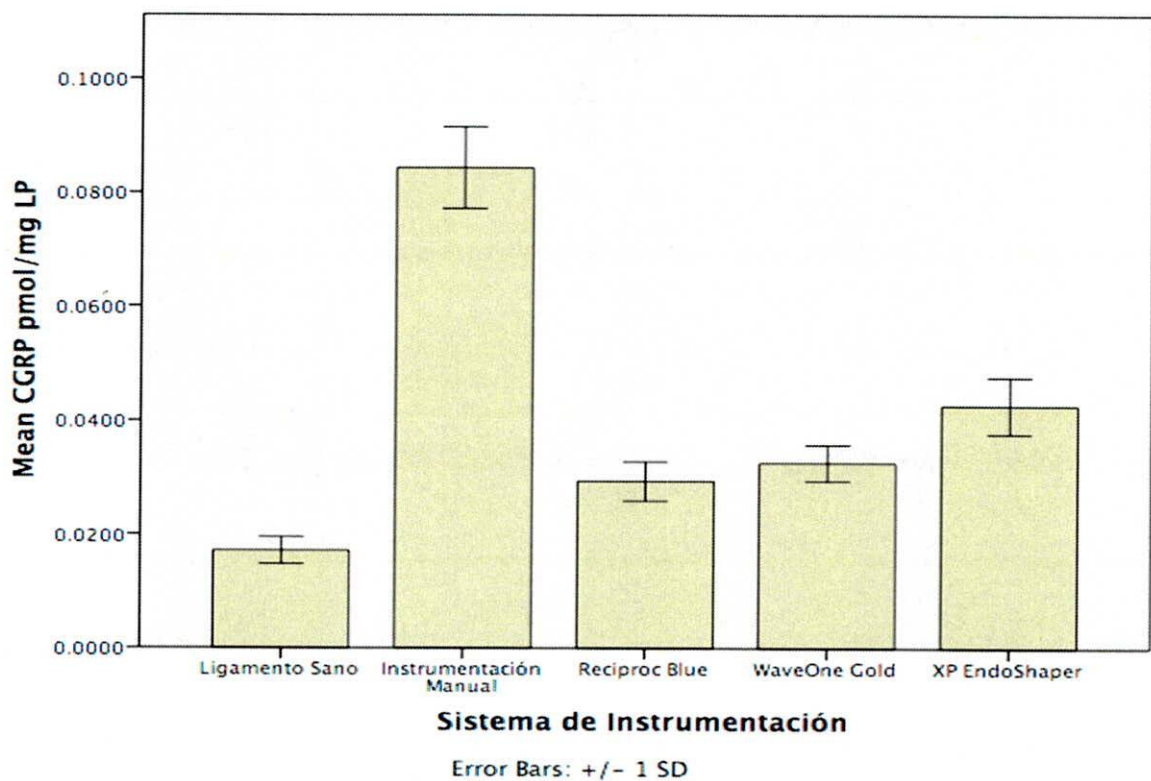
La figura 2 muestra gráficamente el comportamiento de la expresión de CGRP en ligamento periodontal en los diferentes grupos analizados.

Puesto que la prueba de Kruskal Wallis demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$) se realizaron pruebas post-hoc de comparación entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney. Tanto el grupo de ligamento sano como el grupo de instrumentación manual y el grupo XP EndoShaper, mostraron diferencias estadísticamente significativas con todos los demás grupos ($p < 0.001$). El grupo Reciproc Blue mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo WaveOne Gold ($p = 0.075$). De igual forma el grupo WaveOne Gold mostró diferencias significativas con los demás grupos excepto con el grupo Reciproc Blue. Los resultados de estas pruebas pueden observarse en la tabla 4.

CGRP pmol/mg LP

Sistema de Instrumentación	N	Media	Desv. Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo
Ligamento Sano	10	,017140	,0024052	,017950	,0107	,0189
Instrumentación Manual	10	,084360	,0071877	,082900	,0744	,0989
Reciproc Blue	10	,029370	,0034575	,029400	,0235	,0341
WaveOne Gold	10	,033610	,0031445	,031500	,0290	,0384
XP EndoShaper	10	,042660	,0049484	,042100	,0334	,0499
Total	50	,041228	,0236942	,032700	,0107	,0989

Kruskal-Wallis $p < 0.001$



Post-hoc

Variable: CGRP pmol/mg

LP

U Mann-Whitney

(I) Sistema de Instrumentación	(J) Sistema de Instrumentación	Sig.
Ligamento Sano	Instrumentación Manual	,000
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000
	XP EndoShaper	,000
Instrumentación Manual	Ligamento Sano	,000
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000
	XP EndoShaper	,000
Reciproc Blue	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación Manual	,000
	WaveOne Gold	,075
	XP EndoShaper	,000
WaveOne Gold	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación Manual	,000
	Reciproc Blue	,075

	XP EndoShaper	,000
	Ligamento Sano	,000
	Instrumentación	,000
XP EndoShaper	Manual	
	Reciproc Blue	,000
	WaveOne Gold	,000

10. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

10.1 Presupuesto

Kit reactivo SP y kit reactivo CGRP	4.500.000\$
Análisis estadístico	1.000.000\$
Traducción en ingles	1.000.000\$
Gastos menores	1.000.000\$
Total	7.500.000\$

10.2 Cronograma

2016

Actividad	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
Elección de título				
Revisión de literatura				
Elaboración de protocolo				
Entrega de protocolo				
Evaluación y aprobación				
Comité de ética				

Actividad	Enero	Febr	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agost	Sep	Oct	Nov
Revisión de la literatura											
Selección de la muestra											
Análisis de resultados											
Conclusiones											
Elaboración de artículo científico											
Presentación de protocolo final											

2017

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caviedes-Bucheli J, Castellanos F, Vasquez N, Ulate E, Munoz HR. The influence of two reciprocating single-file and two rotary-file systems on the apical extrusion of debris and its biological relationship with symptomatic apical periodontitis. A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*, 2016; 49, 255–270
2. Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Carreño CP, Delgado R, Garcia DJ, Solano J, Diaz E, Munoz H. The effect of single-file reciprocating systems on Substance P and Calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *Int Endod J*, 2013; 46, 419–426.
3. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JCM, et al. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endod*, 2002; 28(6):457-460.
4. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in humandental pulp. *J Endod*. 2008 Dec;34(12):1462-5.
5. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):773-88.
6. Caviedes-Bucheli J, Moreno GC, López MP, Bermeo-Noguera AM, Pacheco-Rodríguez G, Cuellar A, Muñoz HR. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in alternatively activated

- monocytes/macrophages during irreversible pulpitis. *J Endod*, 2008; 10.1016.
7. Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and Calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J* 2002;35:30 – 6
 8. Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Gutierrez-Sanchez L, Higuerey-Bermudez F, Pereira-Nava V, Lombana N, Munoz HR. The effect of three different rotary instrumentation systems on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *J Endod*. 2010; 36:1938-42.
 9. Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Correa-Ortiz JA, Aguilar-Mora MV, Pedroza-Flores JD, Ulate E, Lombana N, Munoz HR. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2011; 627-30
 10. Webber Julian, Machtou Pierre & Perto Wilhelm, Kuttler Sergio, Clifford Ruddle & John West. The Wave One single-file reciprocating system. *Roots Int Mag Endod*: 2011; 28(1): 28-33.
 11. Kim HC, Kwak SW, Cheung GS, Ko DH, Chung SM, Lee W. Cyclic fatigue and torsional resistance of two new nickel-titanium instruments used in reciprocation motion: Reciproc versus WaveOne. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):541-4.
 12. De-Deus G, Silva EJ, Vieira VT, Belladonna FG, Elias CN, Plotino G, Grande NM. Blue Thermomechanical Treatment Optimizes Fatigue

- Resistance and Flexibility of the Reciproc Files. J Endod. 2017;43(3):462-466.
13. Available at: <https://www.vdw-dental.com/en/products/detail/reciproc-blue-instruments/>
14. Özyürek T. Cyclic Fatigue Resistance of Reciproc, WaveOne, and WaveOne Gold Nickel-Titanium Instruments. J Endod. 2016; 42(10):1536-9.
15. Available at: https://www.dentsply.com/content/dam/dentsply/pim/manufacture/Endodontics/Obturation/Gutta_Percha_Points/WaveOne_Gold_Gutta_Percha_Points/W1G_Brochure_EN.pdf
16. Elmaghry AM, Elsakka SE. Torsional resistance of XP-endo Shaper at body temperature compared with several nickel-titanium rotary instruments. Int Endod J. 2017 Jul 12.
17. Available at: <http://www.fkg.ch/products/endodontics/canal-shaping-and-cleaning/xp-endo%C2%AE-shaper>
18. Urrutia G, Bonfill X (2010) PRISMA declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses. Medicina Clinica 135, 507–11.
19. Shea BJ, Grimshaw JM, Wells GA et al. (2007) Development of AMSTAR: measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. BMC Medical Research Methodology 7, 10.
20. M.A GÓMEZ, A. CAMPOS. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Editorial Panamericana. 3º Edición. Madrid 2008

21. J. LINDHE, N.P. LANG. Periodontologia clínica e implantologia odontologica. Editorial Panamericana. 6º edición.
22. Caviedes-Bucheli J, Gomez-Sosa JF, Azuero-Holguin MM, Ormeño-Gomez M, Pinto-Pascual V, Munoz HR. Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. *Int Endod J*. 2017 Apr;50(4):339-351. doi: 10.1111/iej.12627. Epub 2016 Apr 2. Review. PubMed PMID: 26953220.
23. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JC, Abad EC. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endod*. 2002 Jun;28(6):457-60. PubMed PMID: 12067129.
24. Gutmann J, Baumgartner C, Gluskin A, Hartwell G, Walton R (2009) Identify and define all diagnostic terms for Periapical/Periradicular health and disease states. *Journal of Endodontics* 35, 1658–74
25. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. 2008 Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*.
26. Caviedes-Bucheli J, Rojas P, Escalona M, Estrada A, Sandoval C, Rivero C, Lombana N, Muñoz HR. The effect of different vasoconstrictors and local anesthetic solutions on substance P expression in human dental pulp. *J Endod*, 2008; 10.1016
27. SELTZER AND BENDER, DENTAL PULP, Quintessence Publishing Co, 2002. Cap 11, Molecular Mediators of Pulpal Inflammation.
28. KIM S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *Journal of endodontics*, 16, 48- 53. 1990.

29. COHEN, S. Pathways of the Pulp. Ed. Mosby. 8ª ed. México 2002: 34-35.
30. CAVIEDES J, CAMARGO C, GÓMEZ AM, TRUJILLO SM, MORENO GC, GONZÁLEZ JM. Expression of calcitonine gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. J Endodon 2004; 30(4): 201-204.
31. Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. J Endod. 2003 Apr;29(4):265-7. PubMed PMID: 12701777.
32. Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins, and correlation. J Endod. 1990 Feb;16(2):67-9. PubMed PMID: 2388020.
33. MJOR I. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. Quintessence Int 2001;32:427-446.
34. Caviedes-Bucheli J, Correa-Ortíz JA, García LV, López-Torres R, Lombana N, Muñoz HR. The effect of cavity preparation on substance P expression in human dental pulp. J Endod. 2005 Dec;31(12):857-9. PubMed PMID: 16306817.
35. KLAVDIEVA MARIA M., The History of Neuropeptides II, Frontiers in neuroendocrinology 17, 126–153 1996
36. HARRISON Selena, GEPETTI Pierangelo, Substance P Review, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 33 (2001) 555–576
37. CHANG MM, LEEMAN SE, NIAL HD. Amino acid sequence of substance P. Nature New Biol 1971;232:86-87

38. NILSSON J, VON EULER AM, DALSGAARD C. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; 315: 61-63
39. MURRAY P.E. Hafez A. A., Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *Journal of dentistry*. Vol 30. 2002, 213-222
40. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*. 1982;298:240–244. doi: 10.1038/298240a0
41. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man and eight other species. *J Neurosci* 1984;4:3101–11.
42. Frisstad I, Vandeveska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa SJ, Kvinnsland IH. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res* 2003;311:383–91
43. Edvinsson L, Cantera L, Jansen-Olesen I, Uddman R. Expression of calcitonin gene-related peptide 1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries. *Neurosci Lett* 1997;229:209 –11
44. Alvarez FJ, Kavookjian AM, Light AR. Ultrastructural morphology, synaptic relationships, and CGRP immunoreactivity of physiologically identified C-

- fiber terminals in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 1993;329:472–90
45. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endod* 1990;16:78 – 84.
46. Lundy FT, Lamey PJ, McKinnell J, Shaw C, Linden GJ. Calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 1999;26:212– 6.
47. Dennis T, Fournier A, Cadieux A, et al. hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;254:123– 8. 43.
48. Nakamuta H, Fukuda Y, Koida M, et al. Binding sites of calcitonin gene-related peptide (CGRP): abundant occurrence in visceral organs. *Jpn J Pharmacol* 1986;42:175– 80. 44.
49. Caviedes-Bucheli J, Arenas N, Guiza O, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *Int Endod J* 2005;38:712
50. Singh A, Arunagiri D, Pushpa S, Sawhny A, Misra A, Khetan K. (2015) Apical extrusion of debris and irrigants using ProTaper hand, M-two rotary and WaveOne single file reciprocating system: An ex vivo study. *J Conserv Dent*.

51. Kocak S, Kocak MM, Saglam BC, Teurker SA, Sagsen B, (2013) Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. *Journal of Endodontics* 39, 1278–80.
52. Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Ardila-Pinto J, Del Toro-Carreño HR, Saltarín-Quintero H, Sierra-Tapias CL, Macias-Gomez F, Ulate E, Lombana-Sanchez N, Munoz HR. 2011 The effect of orthodontic forces on calcitonin gene-related peptide expression in human dental pulp. *J Endod.*
53. Glennon JP, Ng Y-L, Setchell DJ, Gulabivala K (2004) Prevalence of and factors affecting postpreparation pain in patients undergoing two-visit root canal treatment. *International Endodontic Journal* 37, 29–37
54. Ahn SY, Kim HC, Kim E. (2016) Kinematic Effects of Nickel-Titanium Instruments with Reciprocating or Continuous Rotation Motion: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Journal of Endodontic*. 10.1016.
55. Baumann M. Atlas de endodoncia, primera edición. Pag 60
56. Canalda C, Brau E. Endodoncia técnicas clínicas y bases científica. Edictorial masson. Edición 2 - pag 159.

57. Goldbert, Soares. Endodoncia técnicas y fundamentos. Edictorial medica panamericana. 2003 pag 78-83.
58. Gutmann JL, Gao Y (2012) Alteration in the inherent metallic and surface properties of nickel-titanium root canal instruments to enhance performance, durability and safety: a focused review. International Endodontic Journal 45, 113–28.
59. Plotino G, Grande NM, Testarelli L, Gambarini G (2012) Cyclic fatigue of Reciproc and WaveOne reciprocating instruments. International Endodontic Journal 45, 614–8.
60. Kim H-C, Kwak S-W, Cheung GS, Ko D-H, Chung S-M, Lee W (2012) Cyclic fatigue and torsional resistance of two new nickel-titanium instruments used in reciprocation motion: Reciproc versus WaveOne. Journal of Endodontics 38, 541–4.
61. Pak JG, White SN (2011) Pain prevalence and severity before, during, and after root canal treatment: a systematic review. Journal of Endodontics 37, 429–38.
62. Capar ID, Arslan H, Akcay M, Ertas H. An in vitro comparison of apically extruded debris and instrumentation times with ProTaper Universal, ProTaper Next, Twisted File Adaptive, and HyFlex instruments. J Endod.

2014 Oct;40(10):1638-41.doi: 10.1016/j.joen.2014.04.004. Epub 2014 May 27. PubMed PMID:25260737.

63. Tanalp J, G€ung€or T (2014) Apical extrusion of debris: a literature review of an inherent occurrence during root canal treatment. International Endodontic Journal 47, 211–21
64. Scatchard, O., The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51,660 (1949)