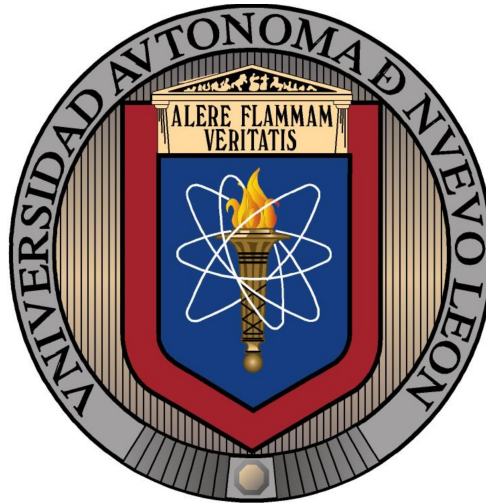


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
POSGRADO DE PERIODONCIA



*“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE RIFAMPICINA  
NANOENCAPSULADA CONTRA AGGREGATIBACTER  
ACTINOMYCETEMCOMITANS PRESENTE EN LA  
PERIODONTITIS”*

Por  
CINDY HERNÁNDEZ ROMERO  
Cirujano Dentista  
Universidad Veracruzana 2008

Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN  
PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA

*“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE RIFAMPICINA  
NANOENCAPSULADA CONTRA AGGREGATIBACTER  
ACTINOMYCETEMCOMITANS PRESENTE EN LA  
PERIODONTITIS”*

**APROBACIÓN DE TESIS:**

---

Dra. María de los Ángeles Andrea Carvajal Montes de Oca  
**Directora de tesis**

---

MEP. Gloria Martínez Sandoval  
**Coordinadora del Posgrado de Periodoncia**

---

MEO. PhD. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

*“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE RIFAMPICINA  
NANOENCAPSULADA CONTRA AGGREGATIBACTER  
ACTINOMYCETEMCOMITANS PRESENTE EN LA  
PERIODONTITIS”*

**DIRECCIÓN:**

---

Dra. María de los Ángeles Andrea Carvajal Montes de Oca  
**Directora de tesis**

---

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez  
**Co-Director de tesis**

---

Dr. Claudio Cabral Romero  
**Asesor de investigación**

*“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE RIFAMPICINA  
NANOENCAPSULADA CONTRA AGGREGATIBACTER  
ACTINOMYCETEMCOMITANS PRESENTE EN LA  
PERIODONTITIS”*

**COMITÉ DE TESIS**

**Presidente**

**Secretario**

**Vocal**

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	ii
Abreviaturas.....	iii
I. Resumen.....	iv
II. Abstract.....	v
III. INTRODUCCIÓN.....	1
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	4
V. HIPÓTESIS.....	6
VI. OBJETIVOS	
Objetivo General.....	8
Objetivos particulares.....	8
VII. ANTECEDENTES	
VII.1 Enfermedad periodontal.....	10
VII.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	12
VII.3 Tratamiento de la enfermedad periodontal.....	18
VII.4 Nanopartículas.....	21
VII.5 Rifampicina y Nanopartículas poliméricas.....	23
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
VIII.1 Tipo de estudio.....	26
VIII.2 Periodo de estudio.....	26
VIII.3 Lugar de estudio.....	26
VIII.4 Metodología.....	27
VIII.4.1 Toma de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal para obtener la población de microorganismo.....	27
VIII.4.2 Identificación de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> mediante extracción de ADN genómico y PCR en tiempo real.....	27
VIII.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de la rifampicina libre.....	32
VIII.4.4 Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas de rifampicina.....	36
IX. RESULTADOS	
IX.1 Toma de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal.....	40
IX.2 Identificación de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> mediante extracción de ADN genómico y PCR en tiempo real.....	42
IX.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de la rifampicina libre.....	44

IX.4 Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas de rifampicina y su evaluación antimicrobiana.....	45
X. DISCUSIÓN.....	51
XI. CONCLUSIONES.....	54
XII. LITERATURA CITADA.....	56
XIII. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	68

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Víctor Hdez. Mtz. y Ma. Esther Romero Ascanio infinitas gracias por su confianza depositada en mi para realizar esta meta la cual me propuse hace tres años. Por las largas platicas siempre que los necesitaba y me sentía lejos de ustedes.

A mis hermanos Víctor y Oliver Hdez. Romero, así como a mi cuñada Dydia Valdovinos Ramírez por tratar de siempre de entender mis conversaciones profesionales y apoyarme para alcanzar el objetivo trazado. Además a Víctor Damián por que sin una palabra me enseñó el poder de los abrazos y las sonrisas, mostrándose el sol en aquellos cielos nublados.

A toda mi familia que aun que lejos se que siempre preguntan por mi, a mis amigos “jarochos” y no “jarochos” a los cuales he desatendido y me he perdido de grandes eventos con ellos, saben que siempre están presentes en mi corazón: Helia, Claudia, Jenifer, Erika, Alonso, Eduardo, Juan Miguel, Raymundo, Daniel, Oscar, Alex, Reynaldo, por mencionar unos cuantos... Gracias. Tania y Gaby, que les puedo decir, convivimos en hermandad tres años y como tal hubo momentos buenos y otros... excelentes, los cuales atesoro en mi corazón por que gracias a esos puedo llamarles amigas y sentirme orgullosa de haber hecho el posgrado con ustedes dos.

A ti, que has llegado a mi vida para impulsarme, inyectarme de energía y felicidad día a día, para recordarme que no existen limites, que los sueños se convierten en realidad, confiando en mi misma, visualizando e intensificando día a día lo deseado.

A mis grandes MAESTROS, Dr. Sergio Galindo Rodríguez y Dr. Claudio Cabral Romero, por su paciencia, ayuda incondicional y desinteresada, ya que sin conocerme depositaron su confianza en mi, gran parte de este logro se lo dedico a ustedes ya que sin su ayuda este proyecto no hubiera salido adelante. Así mismo agradezco a Rene Hdez. Delgadillo, Juan José Martínez Sanmiguel y Vilma por compartir sus conocimientos y siempre hacer un lindo y agradable ambiente de trabajo. Me enorgullece el haber colaborado con grandes profesionistas como ustedes con una excelente calidad humana. Así mismo a Claudia Janeth Martínez Rivas por su gran colaboración en el área de la nanotecnología.

A cada uno de mis pacientes durante el posgrado, gracias de corazón.

Gracias Dios por permitirme estar en el momento y lugar adecuado para toparme todas aquellas personas que conocí en esta etapa y por la inmensa luz que irradias siempre en mi, para valorar quienes son aquellas, que me acompañarán en el transcurso de mi vida.

## ABREVIATURAS

**A.a-** *Aggregaribacter actinomycetemcomitans*

**Rif-** Rifampicina

**TCS-** Tripticaseína de soya

**CMI-** Concentración Mínima Inhibitoria

**NP(s)-** Nanopartícula (s)

**PLA-** Ácido poliláctico

**UFC-** Unidades Formadoras de Colonias

**IP-** Índice de polidispersidad

## I. RESUMEN

**Introducción.** A pesar de los esfuerzos tanto de la medicina como de la industria farmacéutica, el incremento en la prevalencia de resistencia en bacterias patógenas frente a antibióticos se ha vuelto uno de los mayores problemas en la medicina moderna. El área odontológica tampoco se encuentra exenta, siendo común el uso excesivo de antibióticos lo que contribuye al desarrollo de resistencia antimicrobiana. La primera etapa para el desarrollo de la enfermedad periodontal es la formación de un biofilm de bacterias periodontopatógenas, siendo el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) uno de los más asociados a dicha enfermedad. El tratamiento de esta patología se basa en remover mecánicamente la placa dentobacteriana y, en segunda instancia, en el apoyo de terapia antimicrobiana para coadyuvar la eliminación de las bacterias periodontopatógenas, cuales tienen gran similitud con *Mycobacterium tuberculosis*. La rifampicina es uno de los antibióticos efectivos contra bacterias multi-resistentes y la primera elección en el tratamiento de tuberculosis activa. Con el fin de mejorar la terapia farmacológica y evadir la resistencia del agente infeccioso, se han propuesto nuevas estrategias basadas en sistemas de liberación controlada. Entre los más estudiados en los últimos 10 años se encuentran las nanopartículas poliméricas. El **objetivo** del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de la rifampicina nanoencapsulada contra el *A.a* presente en la periodontitis. **Materiales y Métodos.** Para el estudio, se tomaron muestras de fluido crevicular en pacientes con bolsas periodontales de 5-10 mm de profundidad. Se inoculó caldo de tripticaseína de soya (TCS) con las muestras tomadas y se incubaron a 37 ° C en condiciones aeróbicas por 7 días. La presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) fue determinada mediante PCR en tiempo real. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de rifampicina para interferir con el crecimiento de bacterias orales fue determinada mediante la técnica de dilución de tubos. Posteriormente se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación NP de Eudragit® EPO, L100-55 y PLA entre 100 y 200 nm y su IP con distribución de tamaño homogéneo. **Resultados.** *A.a* fue detectado en muestras de fluido crevicular en pacientes con periodontitis, corroborando su asociación con dicha patología. La efectividad de la rifampicina libre contra bacterias orales fue confirmada, obteniéndose una CMI de 1 µg/ml. Las NP con Rifampicina se ajustaron a la misma CMI que la Rif libre. Las NP de Eudragit® EPO cargadas con Rif mostraron que la liberación de la Rif de la NP fue inmediata, mientras que el Eudragit® L100-55 y PLA con Rif no mostró inhibición durante los 5 días de incubación. Esto hace suponer que el fármaco no fue liberado o solo se liberó en una baja proporción que no permitió llegar a la CMI. **Conclusión.** La rifampicina es una excelente alternativa terapéutica para el tratamiento de la enfermedad periodontal, promoviendo resultados favorables en la evaluación clínica de pacientes. Sería interesante continuar con estudios utilizando otro polímero o mezcla de ellos para favorecer la liberación del fármaco en la NP.

## II. ABSTRACT

**Introduction.** Despite continuing efforts of both medicine and pharmaceutical industry, the increasing prevalence of resistance among pathogenic bacteria to common antibiotics has become one of the most important problems in modern medicine. Dental area is not absent of this problem, being common the excessive use of antibiotics contributing to develop antimicrobial resistance. The first stage to develop periodontal disease is to get a biofilm of periodontopathogen bacteria. These bacteria have high homology with *M. tuberculosis* regarding growth, slow metabolism and cell division. Rifampicin is one of few efficient antibiotics against multi-resistant bacteria, being the first election to treat active tuberculosis. However, there are no reports about the capability of rifampicin against oral bacteria. With the aim of improving drug therapy and avoid microbial resistance it has been proposed new alternatives based in controlled delivery systems. The most studied in the last 10 years are the polymeric nanoparticles. The **aim** of this study was evaluate the antimicrobial activity of nanoparticles loaded with rifampicin against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* found in the peridontal disease. **Material and methods.** Samples of crevicular fluid were taken of patients with periodontal pockets around 5-10 mm of probing depth. Oral bacteria were grown in Trypticase Soy Broth (TSB) at 37 °C in aerobic conditions for 7 days. The presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) was determined by real time PCR. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of rifampicin to interfere with oral bacteria growth was detected by tube dilution technique. After that polymeric nanoparticles with Eudragit® EPO, L100-55 y PLA were prepared by nanoprecipitation technique between 100 and 200 nm with a homogeneous PI. **Results.** It was detected *A.a* from crevicular fluid in patient samples with periodontal disease. This datum supports the association of this bacterium with development of periodontal disease. The effectiveness of rifampicin against oral bacteria was confirmed. The MIC of rifampicin necessary to interfere with periodontopathogen bacteria growth was 1 µg/ml. The NP loaded with Rifampicin were adjusted at the same concentration. The Eudragit® EPO NP loaded with Rif showed the delivery of Rif from the nanoparticle was immediate. Eudragit® L100-55 and PLA loaded with Rif did not show inhibition during 5 days of incubation. This suggests that the drug was not delivered or was delivered in low proportion. **Conclusion.** The rifampicin is an excellent therapeutic alternative for the treatment of periodontal disease which promotes more favorable results in the clinical evaluation of patients. It will be interesting to continue conducting studies using different polymers or mixtures of them to favor the delivery of the drug in the nanoparticles.

### III. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal constituye el segundo padecimiento oral más importante a nivel mundial, incluido México. La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupo de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con formación de bolsas periodontales, recesiones o ambas (Ranney, 1993).

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es uno de los patógenos asociados a la enfermedad periodontal y es normalmente encontrado en la placa dental, bolsas periodontales y en el surco gingival (Aberg *et al.*, 2009; Isaza *et al.*, 2008; Haar *et al.*, 2006; Cortelli *et al.*, 2010). Este microorganismo es asociado con diferentes infecciones humanas, incluyendo endocarditis infecciosa, abscesos cerebrales y severas formas de enfermedad periodontal. Además, está bien establecido que existe un vínculo entre los padecimientos periodontales y algunas enfermedades sistémicas, como en el caso de la enfermedad cardiovascular (Van Winkelhoff & Slots, 1999).

Muchos han sido los factores que han contribuido al incremento de cepas multiresistentes a antibióticos, como su uso inadecuado, migración nacional e internacional que facilita la diseminación, aglomeraciones de personas, entre otros (Becerra *et al.*, 2009; Stuart & Bonnie, 2004).

Debido al uso indiscriminado de fármacos tanto en el área médica como dental, se propone la aplicación de nuevos antibióticos de uso tópico en el área odontológica, los cuales permiten actuar mejor en el sitio específico sobre las bacterias de la biopelícula y evitan la resistencia de los microorganismos periodontopatógenos (Slots & Rams, 1990). La Rifampicina es el bactericida por excelencia para el tratamiento de *M. tuberculosis* el cual tiene gran similitud con las bacterias de la cavidad oral (MyceK *et al.*, 2004; Cox 2004). Las nanopartículas sirven como acarreadores de fármacos, las cuales podrían solucionar las principales limitaciones de la aplicación local de fármacos

como lo es la poca residencia y la baja disponibilidad del mismo (Galindo- Rodríguez *et al.*, 2005), como lo que sucede con fármacos que son aplicados localmente en el tratamiento de las enfermedades periodontales.

En este contexto el presente estudio se enfocó a la evaluación antimicrobiana de la rifampicina encapsulada en nanopartículas contra el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presente en la periodontitis.

# **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

#### IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La rifampicina incorporada en nanopartículas poliméricas tendrá mejor efecto antibacteriano *in vitro* que la rifampicina no encapsulada contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*?

# **HIPÓTESIS**

## V. HIPÓTESIS

La rifampicina incorporada en nanopartículas poliméricas tendrá una mayor actividad *in vitro* contra bacterias periodontopatógenas donde se encuentre el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* con respecto a la actividad de la rifampicina libre.

# **OBJETIVOS**

## VI. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la actividad bactericida *in vitro* de la rifampicina encapsulada en nanopartículas poliméricas contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presente en la periodontitis.

### Objetivos particulares

1. Obtener y crecer microorganismos partir de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal.
2. Identificar la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante extracción de ADN genómico por columna y PCR en tiempo real.
3. Sintetizar y caracterizar nanopartículas poliméricas cargadas con Rifampicina.
4. Determinar de la Concentración Mínima Inhibitoria de la Rifampicina libre y Rifampicina encapsulada en nanopartículas poliméricas.

# **ANTECEDENTES**

## VII. ANTECEDENTES

### VII. 1 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal, al igual que la caries dental, representan las enfermedades más comunes en adultos. Ambos padecimientos causan pérdida dental después de los 45 años (Brook, 2003). La enfermedad periodontal es un padecimiento crónico degenerativo del periodonto que incluye encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. La enfermedad periodontal se desarrolla a partir de una gingivitis preexistente. El concepto etiológico de la enfermedad periodontal comprende tres factores, los cuales determinan si la enfermedad ocurrirá: un huésped sensible, la presencia de especies patogénicas y la ausencia del llamado “beneficio bacteriano” (Socransky & Haffajee, 1992). No obstante, el principal factor etiológico para el desarrollo de la enfermedad periodontal es la placa o biopelícula asociada con bacterias anaerobias. La actividad patogénica de las bacterias de la placa dental, la resistencia del organismo y los factores de riesgo locales o sistémicos contribuyen a la formación y desarrollo de la enfermedad de los tejidos periodontales (Bhatavadekar & Williams, 2009).

La biopelícula está formada de microorganismos y proteínas del huésped, las cuales se adhieren al esmalte dental pocos minutos después del procedimiento de higiene oral. El surco gingival sano tiene una flora dominada de cocos Gram positivos, especialmente *Streptococcus spp* y *Actinomyces spp* mientras que la placa dental “madura”, presenta una flora de microorganismos anaerobios facultativos, espiroquetas y bacilos móviles; la proporción de anaerobios estrictos, Gram negativos y microorganismos móviles, aumentan de acuerdo a como se desarrolla la severidad de la enfermedad periodontal.

La composición de la microbiota subgingival y los niveles de patogenicidad difieren de una persona a otra, así como de un sitio a otro en la cavidad oral. Los patógenos asociados a la enfermedad periodontal se han investigado por más de cien años. Los microorganismos más importantes son Gram negativos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)*, *Porphyromonas gingivalis (Pg)*, *Prevotella intermedia*

(Pi), *Bacteroides forsythus* (Bf), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), especies de *Capnocytophaga* (C.sp), *Campylobacter rectus* (Cr) (Haffajee & Socransky, 1994). En general estas bacterias se encuentran asociadas en diferentes complejos (Fig. 1). No obstante, la variedad de patógenos ha sido ampliada para incluir no solo las bacterias cultivadas sino también las no cultivadas y virus (Slots,2005; Paster *et al.*, 2006).

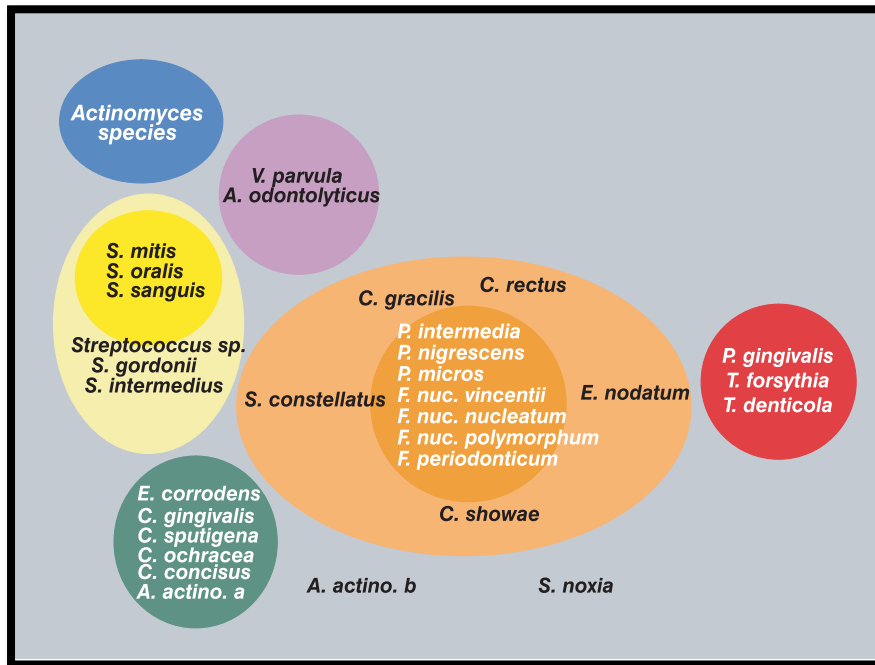


Fig. 1. Representación de las relaciones de las especies dentro de los complejos microbianos.

Cada microorganismo posee un gran número de factores de virulencia (componentes de la estructura celular, enzimas agresivas, exotoxinas y endotoxinas), importantes para el proceso de la enfermedad periodontal. Durante los trastornos de homeostasis tisular, estas especies muestran su potencial patogénico causando la enfermedad. Las bacterias y sus productos estimulan la inflamación, lo que conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios como las citoquinas y prostaglandinas, los cuales dañan los tejidos periodontales (Gomes *et al.*, 2004). La bacteria de la placa dental *A.a* destaca como una de las más potentes periodontopatógenas.

## VII.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*A.a* es uno de los patógenos asociados a la enfermedad periodontal y es normalmente encontrado en la placa dental, las bolsas periodontales y en el surco gingival. Su presencia en las bolsas periodontales esta asociada a la enfermedad periodontal en: pre-adolescentes (Aberg *et al.*, 2009), juvenil localizada (Isaza *et al.*, 2008; Haar *et al.*, 2006) y crónica (Cortelli *et al.*, 2010).

Este microorganismo también esta asociado con algunas enfermedades sistémicas, como es el caso de la endocarditis infecciosa, abscesos cerebrales, etc. (Van Winkelhoff & Slots, 1999) (Tabla 1.)

Tabla 1. Aspectos asociados de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como agente etiológico de la enfermedad periodontal (Haffajee & Socransky, 1994).

Asociación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elevada en lesiones de periodontitis juvenil localizada, en enfermedades periodontales prepuberal o adolescentes.</li><li>• Menor salud, gingivitis o sujetos o sitios desdentados.</li><li>• Elevada en algunas lesiones de periodontitis del adulto.</li><li>• Elevada en lesiones activas de periodontitis juvenil.</li><li>• Detectada en estudios prospectivos.</li><li>• Detectada en áreas apicales de bolsas y tejidos de lesiones de periodontitis juvenil localizada.</li></ul>
Eliminación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eliminación o supresión son producto de tratamientos exitosos.</li><li>• Lesiones recidivantes albergan la especie.</li></ul>
Respuesta del huésped	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anticuerpos elevados en suero o saliva de pacientes con periodontitis juvenil localizada.</li><li>• Anticuerpos elevados en suero o saliva de pacientes con periodontitis crónica.</li></ul>

Factores de virulencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucotoxina; colagenasa; endotoxina; epiteliotoxina, factor inhibidor de fibroblastos; factor inductor de resorción ósea; inducción de la producción de citosinas de los macrófagos; modificación de la función de los neutrófilos; degradación de las inmunoglobulinas; toxina distensora citoletal (Cdt); inducen la muerte por apoptosis celular.</li> <li>• Invaden las células epiteliales y del endotelio vascular <i>in vitro</i> y las células epiteliales bucales <i>in vivo</i>.</li> </ul>
Estudios en animales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad inducida en ratas gnotobióticas.</li> <li>• Abscesos subcutáneos en ratones.</li> </ul>

### VII.2.1 Taxonomía

Conforme se ha profundizado en el estudio de *A.a* se han conocido más detalles metabólicos, fisiológicos y genéticos, lo cual ha conducido a su reclasificación en varias ocasiones. Inicialmente, esta bacteria fue aislada y descrita por Klinger (1912) quien la denominó *Bacterium actinomycetemcomitans*, luego Lieske en 1921, la refirió como *Bacterium comitans*. Posteriormente, fue reclasificada como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* por Topley & Wilson (1929) y como *Haemophilus actinomycetemcomitans* por Potts y colaboradores en 1985. Esta especie atrajo la atención en gran parte, debido a su asociación con la periodontitis agresiva localizada (Slots & Ting, 1999). Neils y Mogens en el 2006, basándose en estudios de ADN, encontraron gran similitud en cuatro bacterias *A.a*, *Haemophilus aphrophilus*, *H. Paraphrophilus* y *H. Segnis*, conformando estos un nuevo género llamado *Aggregatibacter*, perteneciente a la familia *Pasteurellacea* (Neis & Mogens, 2006). Específicamente, el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se reclasificó como *A.a*.

### VII.2.2 Morfología y estructura

Al microscopio, *A.a* es de forma esférica, oval o bastón. La forma oval es la más frecuente; también pueden aparecer en forma de cocos, los cuales parecen un código morse. *A.a* es un cocobacilo inmóvil facultativo gram negativo, que tiene fimbrias, de extremos redondeados que forma colonias pequeñas y convexas con un centro en “forma de estrella” (Fig. 2). Su pared celular presenta endotoxinas o lipopolisacáridos típicos de una bacteria Gram negativa (Slots, 1982).

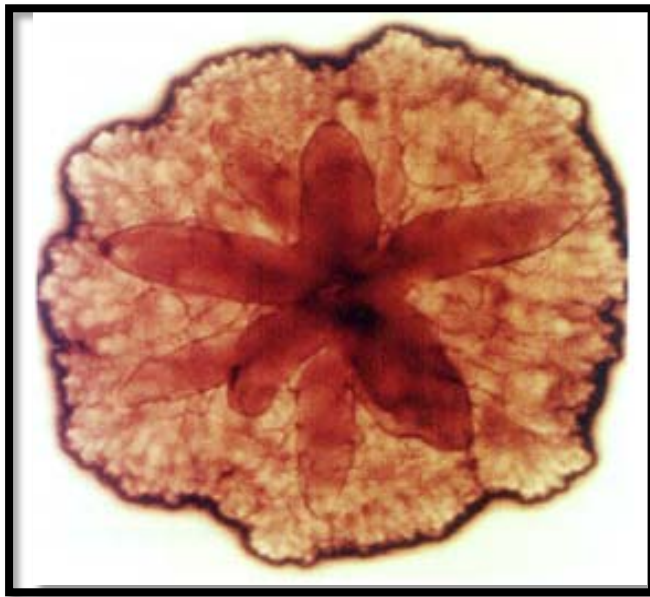


Fig. 2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

### VII.2.3 Factores de virulencia

*A.a* presenta fimbrias y vesículas, así también produce un material amorfo extracelular proteico que le permite adherirse a las células del huésped, siendo esta adherencia el primer paso de todo proceso infeccioso (Zambon *et al.*, 1988; Gasparetto *et al.*, 2000).

Los factores de virulencia incluyen:

- Leucotoxina: de la familia bacteriana de la citolisina y comparte una secuencia similar con la  $\alpha$ -hemplysina de *Escherichia coli*, la citolisina de *Pasteurella haemolitica* y la leucotoxina del *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kelk *et al.*, 2005). Es un miembro de la familia RTX (repetición en la toxina), el operón de esta leucotoxina esta constituida por 4 genes ltx C,A,B,D en orden de transcripción siendo el ltxA, la porción activa de la toxina. Tiene actividad citoletal en polimorfonucleares, leucocitos, macrófagos, penetrando y formando poros transmembranosos que producen pérdida de potasio intracelular, con un resultado fatal para la célula (Hamlet, 2001). Su nula acción sobre determinadas células como el epitelio, fibroblastos, plaquetas, eritrocitos, esta comprobado de estudios *in vitro*. Las leucotoxinas tienen un efecto destructivo sobre los neutrófilos, monocitos y linfocitos T, y de esta manea produce una inmunosupresión local en el área supragingival, la cual tiene un papel central en el desarrollo de lesiones periodontales en la periodontitis juvenil. La leucotoxina de *A.a* es un factor de virulencia y hace de este microorganismo un periodontopatógeno importante (Kolodrubetz *et al.*,1989; Lally *et al.* 1989; Gillespie & Hawkey, 2006; Henderson *et al.*, 2002; Gaetti-Jardim *et al.*, 2008; Rabie *et al.*,1988).
- Toxina de distensión citoletal (CDT): esta toxina es codificada por el operón cdt ABC, e inhibe la progresión del ciclo celular en G2, llevándola a una apoptosis celular. Así también puede inhibir la proliferación de linfocitos CD4, impidiendo una respuesta adecuada del sistema inmune (Shenker *et al.*,1999, 2005; Kachlany, 2010; Ando *et al.*, 2010).
- Endotoxina (LPS): es una toxina sumamente activa causando reabsorción ósea, activando macrófagos para que estimulados, produzcan IL1B y factor de necrosis tumoral alfa, mediadores de la inflamación y reabsorción ósea (Gillespie & Hawkey, 2006; Henderson *et al.*, 2002; Slots, 1982).

- Proteínas unidas a los receptores Fc: la región Fc de la inmunoglobulina, se une a proteínas de superficie de la bacteria, haciendo que el complemento no cumpla su función citolética, ni se lleve una adecuada opsonización para la fagocitosis (Mintz & Fives-Taylor, 1994).
- Proteína similar a GROE1 (64Kda.): Es una proteína con acción osteolítica identificada en la mayoría de las pacientes con periodontitis agresiva localizada.
- Colagenasa: enzima capaz de deteriorar el tejido conectivo del periodonto (Guillespie & Hawkey, 2006; Papone & Morteo, 2005).
- Citotoxinas: inhiben la proliferación de fibroblastos y la capacidad del huésped de sintetizar colágeno, para la recuperación de los tejidos (Henderson *et al.*, 2002b).
- Epiteliotoxinas: destruye hemidesmosomas de la unión intercelular, siendo un mecanismo de invasión y profundización de la infección (Guillespie & Hawkey, 2006; Papone & Morteo, 2005).

#### VII.2.4 Alteraciones locales inmunitarias

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está asociado a la activación temprana de los linfocitos T supresores, así como a la inhibición de inmunoglobulinas IgG, IgM por células B (Guillespie & Hawkey, 2006; Henderson *et al.*, 2002).

Otros factores que podrían aumentar su virulencia, son la producción de bacteriocinas, que producen un antagonismo bacteriano contra *Streptococcus mutans* y otros microorganismos de la cavidad oral. Además, altera la quimiotaxis de neutrófilos, ya que producen una molécula de bajo peso molecular. Produce intraleucocitariamente catalasa y superóxido dismutasa inhibiendo la destrucción intracelular, así también presenta plásmidos y bacteriófagos (Guillespie & Hawkey, 2006).

### VII.2.5 Fisiopatología

En la biopelícula dental se han encontrado más de 700 tipos bacterianos, siendo uno de ellos *A.a*, una bacteria residente del surco gingival. Su agresividad se debe a muchos factores de virulencia ya mencionados, que actuando en un huésped con algún grado de susceptibilidad, activa su mecanismo de proliferación y destrucción, causando un gran daño al periodonto (Zambon *et al.*, 1988), pero no todas las cepas tienen la misma importancia (Fine & Kachlany, 2006; Fine *et al.*, 2007; Haraszthy *et al.*, 2000; Haubek *et al.*, 2004; Kilian *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2004), algunas presentan ciertas características específicas, como una activación de su leucotoxina (Rabie *et al.*, 1988), que tiene dos funciones bien marcadas, daños de células de defensa y reabsorción ósea. Se han descrito seis serotipos a-f. La especificidad serológica es definida mediante seis componentes O-polisacáridos antigénicamente y estructuralmente distintos de sus respectivas moléculas lipopolisacáridas (Page *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1996).

El clon JP2 del *A.a* (serotipo b) tiene una supresión de 530 pares de bases en su delección del operón de leucotoxina que aumenta la producción de leucotoxinas de 10 - 20 veces comparado a cepas no leucotóxicas (Haubek *et al.*, 2008; Brogan *et al.*, 1994; Gary, 2010).

El daño producido por esta bacteria es rápido, más aun si se acompaña de abundante biopelícula alrededor del diente, llegando a deteriorar al periodonto con formación de bolsa periodontal, pérdida de inserción, amplia movilidad de los dientes y con el tiempo pérdida de éste.

### VII.2.6 Aislamiento bacteriano

El *A.a* es una típica bacteria que puede crecer en medios enriquecidos como tripticaseína de soya, agar sangre, infusión cerebro-corazón, chocolate, suplementado con hemina, vitamina K y menadiona, en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5-10% o anaerobiosis. Forma colonias después de su incubación de 24 a 48 h. Este bacilo anaerobio inmóvil crece a una temperatura de 37 °C, pero también a temperaturas de 20-42 °C. El *A.a* produce colonias pequeñas y viscosas en placas especiales que se encuentran en el

aislamiento primario, las cuales son difíciles de desprender de superficie de la placa de agar. Un cultivo notable se forma después de 5-7 días de crecimiento.

Hay muchos medios que han permitido aislar la bacteria de forma selectiva, como el de Socransky, Medio MGB (bacitracina, verde de malaquita), el de Slots, Medio TSBV (bacitracina, vancomicina), el de Slots modificado medio A (TSBC con espiramicina, ác. fusídico y carbenecilina) y el de Dentaaid-1 (BHIA, vancomicina).

### **VII.3 Tratamiento de la enfermedad periodontal**

El tratamiento exitoso en la enfermedad periodontal depende de su diagnóstico temprano, de la orientación del tratamiento hacia la eliminación o la supresión de los microorganismos infectantes y de la creación de un ambiente que promueva el mantenimiento a largo plazo. Inicialmente, el tratamiento se basa en remover mecánicamente la placa dentobacteriana y/o el tejido afectado, y en segunda instancia se puede apoyar en una terapia antimicrobiana para coadyuvar a la eliminación de los periodontopatógenos.

Los antibióticos se administran por vía sistémica o por colocación directa en el interior de la bolsa periodontal. En caso de la administración por vía sistémica se favorece cuando las bacterias dianas se hallan dispersas, sin embargo, el incremento de la prevalencia de la resistencia en las bacterias patógenas frente a antibióticos se ha vuelto uno de los mayores problemas en la medicina moderna. El área odontología tampoco se encuentra exenta, siendo común el uso excesivo de antibióticos lo que contribuye al desarrollo de resistencia antimicrobiana (Struthers & Westran, 2005; Williams *et al.*, 2001).

Muchos han sido los factores que han contribuido a incremento de cepas multiresistentes a antibióticos, como su uso inadecuado, migración nacional e internacional que facilita la diseminación, aglomeraciones de personas, entre otros

(Becerra *et al.*, 2009; Stuart & Bonnie, 2004). Las bacterias pueden ser resistentes intrínsecamente a uno o mas agentes antimicrobianos, pueden adquirir la resistencia por mutaciones *de novo* o por genes de resistencia de otros organismos, así como por adaptaciones metabólicas del fármaco (Becerra *et al.*, 2009).

Además de la resistencia bacteriana, otra desventaja del tratamiento sistémico se desarrolla con el hecho de que el fármaco se diluye por dispersión en la totalidad del cuerpo y solo una pequeña parte de la dosis total llega en realidad a la microflora subgingival de la bolsa periodontal (Williams *et al.*, 2001 ).

Con respecto a la liberación local, ha sido usada pero no extensivamente. Esto es debido a las dificultades en la liberación de algunas formulaciones. El concepto de que un antibiótico de liberación local dentro de una bolsa periodontal logre una concentración potente y mayor al medicamento sistémico es muy atractivo. La cantidad de fármaco liberado a menudo crea una concentración sulcular superando el equivalente de 1mg/ml (1,000 mg/ml). Este nivel es considerado bactericida para la mayoría de las bacterias que muestran resistencia a concentraciones de liberación sistémica. Igualmente importante, la liberación local de una antibiótico muestra un impacto insignificante en la microflora en otras regiones del cuerpo (Williams *et al.*, 2001).

La bolsa periodontal es un sitio fácilmente accesible para el clínico ya que puede ser monitoreada individualmente para determinar la respuesta de tratamiento. Microbiológicamente, el concepto de tratamiento en esos sitios que necesitan de terapia mediante la remoción mecánica de la placa subgingival y, subsecuentemente, la colocación de un antimicrobiano aplicado de manera local, parece ser ideal. En teoría, el desbridamiento mecánico sirve para desorganizar y eliminar la biopelícula. Se puede lograr una mayor concentración del antibiótico con una administración local que una sistémica. La tetraciclina, doxiciclina, minociclina y el metronidazol han sido incorporados individualmente dentro de dispositivos liberadores y elaborados comercialmente para su uso médico (Walker *et al.*, 2004).

### VII.3.1 Ventajas y desventajas la liberación local de antimicrobianos

El uso tópico de antimicrobianos en el tratamiento de la enfermedad periodontal presenta algunas ventajas, pero también desventajas (Tabla 2.). La vía local de administración antibiótica puede lograr 100 veces mas la dosis terapéutica en sitios subgingivales que los posibles en terapia sistémica. Además, la terapia local permite la utilización de agentes antimicrobianos los cuales no pueden ser proporcionados en la administración sistémica. La administración de la terapia profesional tópica puede ser útil para mujeres con propensión a infecciones vaginales, para individuos con afecciones gastrointestinales u otros efectos secundarios después de la terapia antibiótica sistémica (Slots & Rams, 1990).

Por otra parte, las desventajas en el tratamiento local antimicrobiano de la periodontitis incluye la dificultad en la colocación del agente antimicrobiano dentro de la parte profunda de la bolsa y las lesiones de furca. La aplicación personal de los agentes antimicrobianos como parte del procedimiento de cuidado en casa es frecuentemente comprometido por la falta de destreza manual del paciente, limitado entendimiento de la anatomía periodontal y la falta de compromiso con los procedimientos recomendados. La falta de retención del fármaco subgingivalmente es limitado por solo una breve exposición del microorganismo a la aplicación del agente antimicrobiano. Estos agentes aplicados localmente dentro de la bolsa periodontal no afectan marcadamente a los patógenos periodontales que habitan dentro de el tejido conectivo gingival adyacente ni tampoco a las superficies fuera de la bolsa (lengua, amígdalas y mucosa bucal), las cuales aumentan el riesgo de reinfección posterior y enfermedad recurrente en las áreas tratadas (Rams & Slots, 1996).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los antimicrobianos sistémicos y locales

Parámetro	Administración sistémica	Administración local
Distribución del fármaco	Distribución amplia.	Rango reducido de eficiencia.
Concentración del fármaco	Niveles variables en diferentes compartimientos del cuerpo.	Dosis alta en el sitio tratado, niveles bajos en cualquier parte.
Potencial terapéutico	Puede llegar mejor a microorganismos dispersos.	Puede actuar mejor localmente sobre las bacterias de la biopelícula.
Problemas	Efectos colaterales sistémicos.	Reinfección de los sitios no tratados.
Limitaciones clínicas	Requiere el buen cumplimiento del paciente.	Infección limitada a los sitios tratados.
Problemas diagnósticos	Identificación de patógenos, elección del fármaco.	Patrón de distribución de lesiones patógenas, identificación de sitios por tratar.

Con el fin de mejorar la terapia farmacológica y evadir la resistencia de bacterias periodontopatógenas, se han propuesto nuevas estrategias basadas en liberación controlada. Entre los más estudiados en los últimos 10 años se encuentran las nanopartículas poliméricas.

#### VII.4 Nanopartículas

En los últimos años, las nanopartículas poliméricas han resultado una opción prometedora para la liberación local de fármacos que podrían funcionar como excelentes vectores de antibióticos en enfermedades periodontales (Kurmar *et al.*, 2010).

La manipulación de la materia a nivel nanométrico y su aplicación en alguna rama de la medicina se denomina nanomedicina. Las principales aplicaciones que se estudian en el área odontológica van orientadas al diseño de biosensores, sistemas de diagnóstico, creación de nuevos materiales (i.e. poliméricos y compositos) y vehículos acarreadores de fármacos. Esta última aplicación, la vectorización de principios activos, tiene un gran potencial en odontología debido a que podría solucionar las principales

limitantes de la aplicación local de fármacos: la poca residencia y la baja disponibilidad del fármaco.

Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales formados por macromoléculas y presentan tamaño 10 a 100 nm; el principio activo que transportan se encuentra disperso, disuelto o absorbido. Según su estructura, las nanopartículas pueden ser nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas son de tipo matricial y en este caso el principio activo puede ser absorbido o incorporado en la partícula. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares que consisten en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica; la molécula de interés puede estar disuelta o dispersa en el núcleo de la partícula (Galindo- Rodríguez *et al.*, 2005).

Las nanopartículas se han utilizado como acarreadores potenciales para proteger al principio activo de la degradación, biodireccionarlo a su sitio de acción y reducir la toxicidad o efectos secundarios que pudiera causar el mismo activo administrado en una forma convencional. Esto lo pueden lograr gracias a que protegen al activo de su degradación prematura y lo pueden liberar de manera controlada. Principalmente, la liberación del fármaco depende de la composición química de la matriz polimérica de forma a las nanopartículas.

La aplicación local en dispositivos de liberación lenta ofrece la ventaja de mantener la concentración del fármaco en la bolsa, permitiendo que la dosis se mantenga baja. Esto reduce el riesgo de efectos colaterales y la posible aparición de resistencia bacteriana (Kurmar *et al.*, 2010; Galindo- Rodríguez *et al.*, 2005).

En general, no existen suficientes investigaciones en la aplicación de vectores nanoparticulados aplicados a la medicina dental. Entre los escasos estudios se encuentra el de Pinon-Segundo y col. quienes prepararon nanopartículas de 500 nm cargadas con triclosán destinadas al tratamiento de la enfermedad periodontal. Se encontró que la formulación de nanopartículas-Triclosan reducían significativamente la inflamación en donde fueron aplicadas.

Tabla 3. Fármacos administrados de manera local (Calleja *et al*; Clares, 2003; Hernández *et al.*, 2010 )

Fármaco	Presentación
Acetonido de Triamcinolona	Liposomas multilaminares
Minociclina	Microesferas
Acidos nucleidos	Micropartículas
Citarabina	Liposomas
Vincristina	Liposomas
Rifampicina	Nanopartículas

#### VII.5 Rifampicina y Nanopartículas poliméricas

Debido al uso indiscriminado de fármacos usados tanto en el área médica como odontológica, se propone el uso de nuevos antibióticos en el área odontológica, tal como lo es la Rifampicina el cual es un antimicrobiano bactericida por excelencia para el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* así como para muchas otras bacterias gram positivas y negativas (MyceK *et al.*, 2004). *M. tuberculosis* es un bacilo inmóvil, anaerobio obligado, el cual solo puede sobrevivir en un medio ambiente que contenga oxígeno. Bajo condiciones fisiológicas, la bacteria solo puede crecer dentro de las células del organismo hospedero, sin embargo, es posible cultivar *M. tuberculosis* in vitro, donde su crecimiento se caracteriza por ser extremadamente lento: el tiempo de duplicación para la bacteria es aproximadamente 16-24 h, formando colonias después de 14-28 días. (Ljiljana *et al.*, 2009; Prescott *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1999; Ramirez-Rivera *et al.*, 2002) (Tabla 4.)

Por las características antes mencionadas, se presenta en la tabla 4. una comparación entre *A.a* y *M. tuberculosis*.

Tabla 4. Comparación entre *A.a* y *M. tuberculosis* (Ljiljana *et al.*, 2009; Prescott *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1999; Ramirez- Rivera *et al.*, 2002).

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Forma de bastón, oval o esférica	Forma de bastón curvo o recto
Bacteria inmóvil	Bacteria inmóvil
Crecimiento anaeróbico sin embargo crece en condiciones de CO <sub>2</sub>	Atmosfera de CO <sub>2</sub> al 5-10%
Crecimiento lento, con notable cultivo después de 5-7 días	Forma colonias después de 14-28 días de incubación. Crecimiento con tiempo medio de generación de 12- 24 hrs.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VIII.1 Tipo de estudio

Básico, experimental acerca de la evaluación antimicrobiana de rifampicina nanoencapsulada contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presente en la periodontitis.

### VIII.2 Periodo de estudio

Noviembre 2010- abril 2013

### VIII.3 Lugar de estudio

- Posgrado de Periodoncia, Facultad de Odontología. Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L).
- Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Odontología. Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L).
- Laboratorio de Nanotecnología, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L).

## VIII.4 Metodología

### VIII.4.1 Toma de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal para obtener la población de microorganismo

Se eligieron 4 pacientes activos de la clínica de Periodoncia e Implantología de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L) para la toma de 2 muestras de fluido crevicular a cada uno. Durante la revisión clínica, los pacientes presentaron bolsas periodontales entre 5 y 10 mm de profundidad.

Para obtener cada muestra se esterilizaron puntas endodónticas de papel absorbente #30, se limpió el diente con algodón estéril para retirar el exceso de saliva o sangre y se insertó la punta en el sitio del diente con la mayor profundidad. Posteriormente, se extrajo la punta, se colocó en un tubo eppendorf el cual contenía medio de cultivo Tripticaseína de soya (TSB, BDDIFCO, SparksMD, USA), preparado y esterilizado según el fabricante y se incubó a 37° C por un tiempo aproximado de 7 días en una incubadora en condiciones aeróbicas. Posteriormente cada muestra se propagó por triplicado en una cámara de anaerobiosis para obtener suficiente material para el proyecto.

### VIII.4.2 Identificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante extracción de ADN genómico y PCR en tiempo real

#### *VIII.4.2.1 Extracción del ADN genómico*

Para la identificación del *A.a* en las muestras tomadas se realizó una extracción de ADN. Para romper la pared bacteriana de los microorganismos, se incubó con Lisozima (100 mg/1ml) a 37° C, en agitación y durante toda la noche (overnight), con el objetivo de obtener ADN genómico que fue usado como molde para la amplificación del gen en interés (*A.a*), se extrajo y se purificó con el kit de extracción de ADN por columna (Cat, No. Z3100 Promega).

Partiendo de los cultivos bacterianos obtenidos de las muestras clínicas (2x cada paciente), se centrifugaron a 140 000 rpm durante 10 minutos.

Enseguida el medio se decanto, dejando las bacterias precipitadas. El pellet de cada muestra se resuspendió en 100 µl de lisozima (100 mg/ml) homogenizándolas perfectamente e incubándolas durante 24 h a 37° C a 110 rpm en un termociclador.

Posteriormente, el pellet bacteriano de cada muestra se resuspendió añadiéndoles 175µl (con β mercaptoetanol) de buffer de lisis que proporciona el kit, 350 µl de buffer de dilución y se mezclaron suavemente por inversión del tubo 3 veces, se incubaron a 70° C por 10 minutos, se centrifugaron a 14 00 rpm durante 10 minutos.

Terminando el tiempo estimado, se transfirió el sobrenadante de las muestras a un tubo eppendorff de 1.5 ml estéril, se añadieron 200 µl de etanol 96° al sobrenadante recuperado en la columna de recolección y se mezclaron por inversión 3 veces.

Se colocó una columna en cada tubo de recolección, se aplicó la muestra del paso anterior para unir el ADN y los tubos se centrifugaron a 8 000 rpm durante 1 min, se descartó el sobrenadante, se añadieron 500 µl del buffer de lavado y se centrifugo por 1 minuto a 8 000 rpm, se volvió a descartar el sobrenadante de cada muestra y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 3 minutos para secar la membrana y eliminar los restos de etanol, se desecharon los tubos y se transfirieron las columnas a tubos eppendorff estériles previamente rotulados.

Para eluir el ADN unido a la membrana, se les añadió 30 µl de H<sub>2</sub>O mQ dejando 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm por un minuto, se desecharon las columnas y se prosiguió a la amplificación por PCR.

#### VIII.4.2.2 Detección de *Aggregatibacter actinomycetemcomitas* por PCR en tiempo Real

El ADN previamente purificado fue empleado como molde para la amplificación específica del gen 18S correspondiente a *A.a* empleando oligonucleótidos y la sonda

específica diseñada mediante el empleo del software Primer Express. La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l divididos de la siguiente manera: 2  $\mu$ l de agua estéril, 0.5  $\mu$ l del stock de 10X de primer/sonda, 5  $\mu$ l de PCR master mix , 2.5  $\mu$ l de ADN templado de cada muestra. El MIX realizado junto con el DNA de cada muestra se colocó en una celda de 96 pozos para su posterior análisis.

Tabla 5. Detección de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real

# de pozo	Contenido	# de muestra
1	MIX (agua estéril, Primer-sonda y PCR master) + 2.5 $\mu$ l de agua	Control Negativo
2	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 2
3	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 4
4	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 3
5	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 5

# pozo	Contenido	# de muestra
1	MIX + 2.5 $\mu$ l de agua	Control Negativo
2	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 6
3	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 7
4	MIX + 2.5 $\mu$ l de ADN	Muestra 8

La programación utilizada en el equipo Light Cycler fue la siguiente:

- Se preparó el equipo Light Cycler 480:
- Formato de detección: HRM dye
- Tipo de bloque: 96 pozos
- Volumen de reacción: 10  $\mu$ l

Programas:

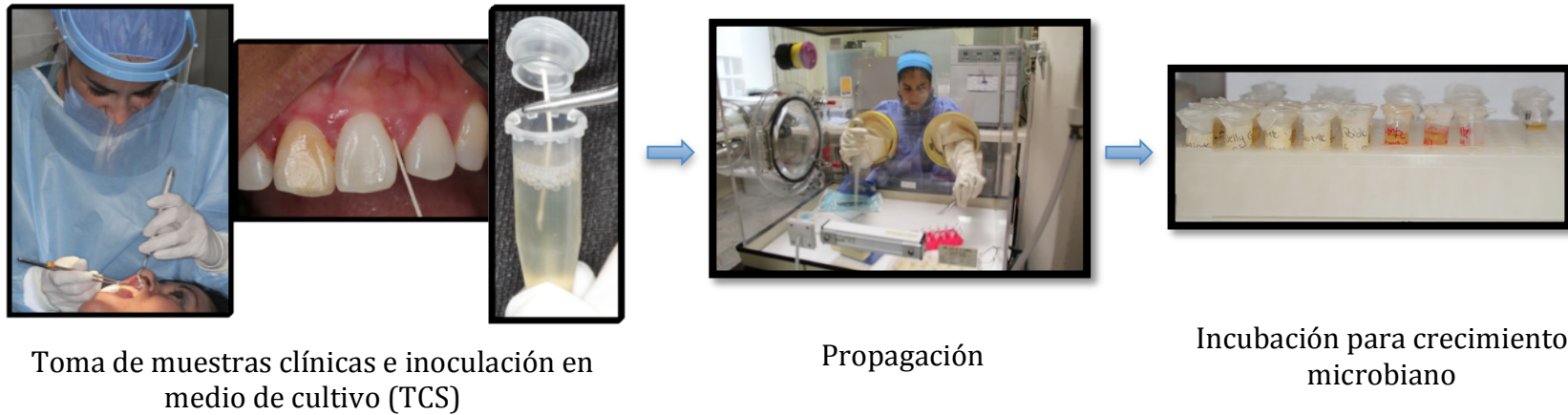
Tipo de programa	Ciclos	Modo de análisis
Pre-incubación	1	-----
Amplificación	65	Cuantificación
Enfriamiento	1	-----

Condiciones de Amplificación:

Programa	HOLDS hh:mm:ss	Rampa °C/s	Modulo de adquisición
<b>Pre-incubación</b>	00:05:00	4	-----
95			
<b>Amplificación</b>	00:00:10	4	-----
95			
55			
72			
<b>Enfriamiento</b>	00:00:30	2	-----

Las muestras que se detectaron positivas a *A.a* con claridad por encima de la fluorescencia (levantaron formando la clásica S) fueron tomadas como positivas. En cada amplificación se añadió un control negativo que contenía el mismo MIX pero sin la adición de ADN.

VIII.4.1 Toma de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal para obtener la población de microorganismo



VIII.4.2 Identificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante extracción de ADN genómico y PCR en tiempo real



#### VIII.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de rifampicina libre

##### *VIII.4.3.1 Preparación del cultivo bacteriano con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans**

Inicialmente, se realizó una dilución 1:10 del cultivo bacteriano con el *A.a* previamente identificado en las muestras clínicas. Se colocaron 10 µl de cultivo previamente homogenizado en 990 µl de Trypticaseina de soya (TCS) estéril.

Para el conteo bacteriano, se tomaron aproximadamente 100 µl de medio inoculado y se colocó en la cámara de Neubauer. El conteo se realizó por microscopía (Olympus) con el objetivo 10x.

Las bacterias contadas en cada cuadrante de los extremos de la cámara de Neubauer se sumaron y se dividieron entre 4; este resultado se multiplicó por el factor 10 000 y por 100 debido a la previa dilución hecha. Con esto se obtuvieron tubos con  $1 \times 10^9$  UFC, lo cual fue equivalente al tubo 5 de la escala de Mc Farland.

Para la obtención de suficiente material (cultivo bacteriano) para trabajar se preparo un stock bacteriano de 45 ml con  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC) en un tubo falcon de 50 ml previamente esterilizado.

Para explorar diferentes concentraciones de fármaco, a partir del stock bacteriano de 45 ml con  $1 \times 10^5$  UFC realizado, se colocó 5 ml de cultivo a 7 tubos de vidrio previamente esterilizados (6 tubos para explorar distintas concentraciones y 1 tubo como testigo de crecimiento).

##### *VIII.4.3.2 Preparación de rifampicina libre*

Antes de la preparación de la rifampicina, se tomaron las medidas necesarias para su manipulación ya que este bactericida es fotosensible. Debido a que la rifampicina no es en su totalidad soluble en agua, se pesaron y se pre disolvieron 0.0100 g de rifampicina en polvo en 200 µl de etanol 96°. Posteriormente se adicionaron 800 µl de

agua destilada estéril en el mismo tubo eppendorf para obtener un stock de 0.0100 g de rifampicina en 1 ml de solución, es decir 10 mg/ml.

Posterior a esto se realizó una dilución 1:100 para obtener un segundo stock con una solución de trabajo de 100 µg/ml. Para formularlo se realizó lo siguiente: se incorporó 10 µl del stock madre a 990 µl de agua destilada estéril en un tubo eppendorf.

Este segundo stock fue suficiente para las primeras concentraciones analizadas (10 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml).

Con la formulación del stock de 100 µg/ml se procedió a explorar las primeras concentraciones de la siguiente manera:

- Concentración 10 µg/ml: del primer tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano, se extrajeron 500 µl de este con una pipeta de 1 ml, para colocar 500 µl de rifampicina y así tener un volumen final de 5 ml.
- Concentración de 5 µg/ml: del segundo tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano, se extrajeron 250 µl de este con una pipeta de 1 ml, para colocar 250 µl de rifampicina, obteniendo un volumen final de 5 ml.
- Concentración de 1 µg/ml: en el tercer tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano se coloca por medio de una pipeta de con una pipeta de 200µl la cantidad de 50 µl de rifampicina.

En cuanto a las siguientes concentraciones exploradas (0.1µg/ml y 0.01µg/ml) fue necesario realizar un tercer stock de rifampicina de 10 µg/ml el cual se elaboró tomando 100 µl del stock de 100 µg/ml y 900 µl de agua destilada.

Del stock obtenido de 10 µg/ml se exploraron las concentraciones siguientes:

- Concentración 0.1 µg/ml: del cuarto tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano se agregó 50 µl de rifampicina.
- Concentración de 0.01 µg/ml: del quinto tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano se agregó 5 µl de rifampicina.

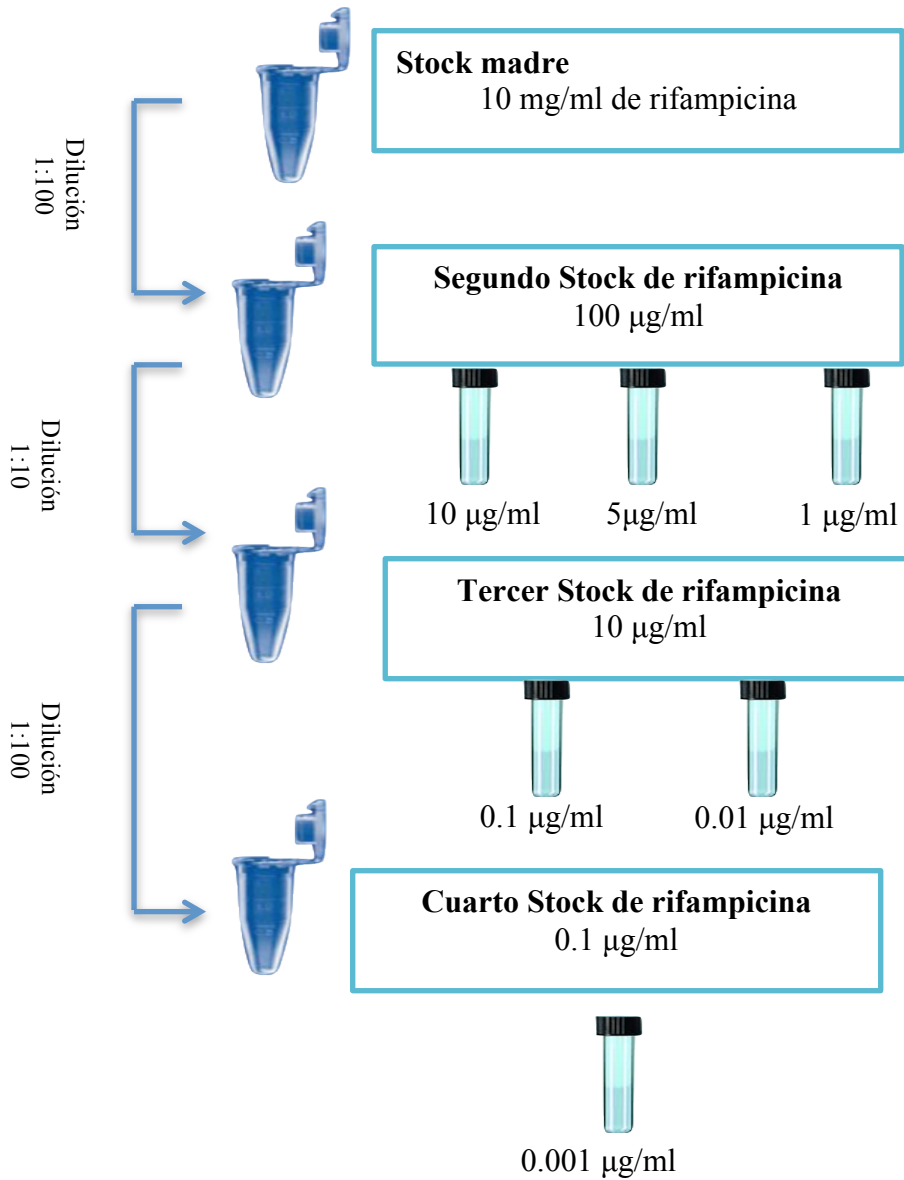
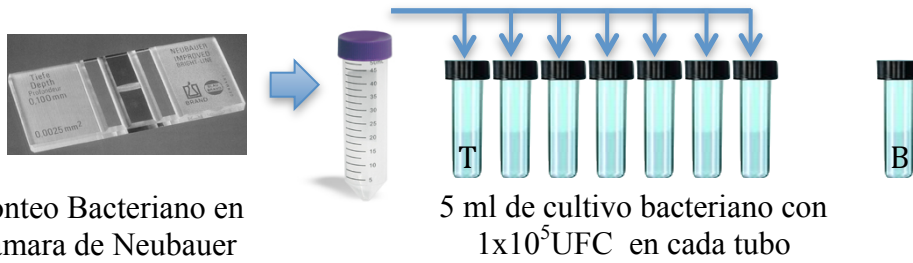
Por último se realizó un cuarto stock para analizar la última concentración (0.001 µg/ml), se realizó una dilución 1:100 del tercer stock para tener una concentración de 0.1 µg/ml. Para ello se incorporó 10 µl del tercer stock en 990 µl de agua destilada estéril.

Con este stock de 0.1 µg/ml de rifampicina se exploró la última concentración a analizar de la siguiente forma:

- Concentración 0.001 mg/µl: en el sexto tubo de vidrio con 5 ml de cultivo bacteriano se agregó 50 µl de rifampicina.

Al concluir esta fase del ensayo, un tubo con 5 ml de TCS fue utilizado como Control (C) y el séptimo tubo preparado con 5 ml de cultivo bacteriano fue tomado como Testigo (T). Estos, junto con los tubos de diferentes concentraciones fueron incubados en condiciones aeróbicas a una temperatura de 37° C para dar lectura a la Concentración Mínima Inhibitoria a las 24 horas.

Procedimiento para la determinación de la CMI de Rifampicina libre en microorganismos obtenidos a partir de una muestra clínica



#### VIII.4.4 Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas de rifampicina.

Los lotes de nanopartículas se prepararon basándose en la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi y col. (Fessi&Puisieux, 1989). Se preparó una fase orgánica que contuvo el polímero formador de las nanopartículas (Eudragit® EPO, Eudragit® L100-55 o ácido poliláctico) en cantidades de 450-1050 mg solubilizados en 10 ml de acetona. En los lotes de nanopartículas que contenían rifampicina (NP-RIF), el fármaco se incorporó en una relación fármaco: polímero de 1:10. Posteriormente, la fase orgánica se inyectó a velocidad constante a la fase acuosa que contenía 100 mg del agente tensoactivo (Lutrol F127NF) en 25ml de agua. A la suspensión de nanopartículas resultante se le eliminó el solvente bajo presión reducida (Rotavapor Laborota 4003, Heidolph Instruments, Alemania) a fin de obtener una suspensión acuosa de nanopartículas purificadas. A partir de este procedimiento general, se modificaron distintas variables experimentales como la concentración del polímero y el tipo de polímero en la fase orgánica a fin de determinar su efecto sobre el tamaño de las nanopartículas. Así mismo, la técnica se estandarizó para obtener nanopartículas con tamaños entre 100 y 200 nm.

##### *VIII.4.4.1 Caracterización de las nanopartículas*

###### VIII.4.4.1.1 Tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de las nanopartículas por espectroscopia de correlación fotónica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido), para lo cual fueron diluidas en agua Milli Q una pequeña alícuota de la suspensión de nanopartículas purificadas. Cada medición se realizó por triplicado.

###### VIII.4.4.1.2 Porcentaje y eficiencia de encapsulación

A la suspensión de nanopartículas se le determinó el porcentaje y eficiencia de encapsulación de rifampicina. Para ello, las nanopartículas fueron centrifugadas a 25000 rpm durante 6 hrs a 5°C (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter, EE.UU.), obteniéndose una pastilla y un sobrenadante. En el sobrenadante se determinó por espectrofotometría UV-Vis el contenido de fármaco no encapsulado.

El porcentaje de encapsulación y eficiencia fueron calculados en base a las ecuaciones 1 y 2, respectivamente:

Ecuación 1

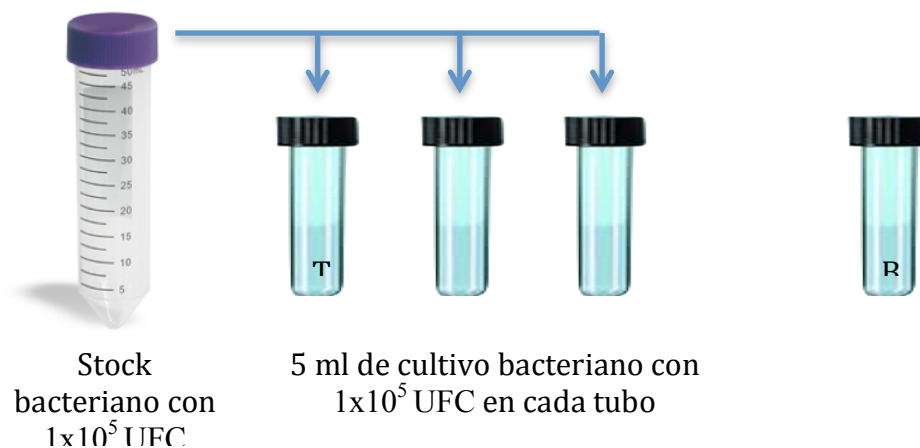
$$\% \text{ encapsulación} = \frac{(mg) \text{ rifampicina en fase orgánica} - (mg) \text{ rifampicina en sobrenadante}}{(mg) \text{ nanopartículas con rifampicina incorporada}} \times 100$$

Ecuación 2

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{(mg) \text{ rifampicina en fase orgánica} - (mg) \text{ rifampicina en sobrenadante}}{(mg) \text{ rifampicina en la fase orgánica}} \times 100$$

#### VIII.4.5 Evaluación de la liberación de nanopartículas poliméricas cargadas con rifampicina

Se realizó conteo bacteriano para la obtención de tubos con  $1 \times 10^9$  UFC, equivalente al tubo 5 de la escala de Mc Farland. Para la obtención de suficiente material para trabajar se preparo un stock bacteriano de 30 ml con  $1 \times 10^5$  UFC en un tubo falcon de 50 ml con el fin de incorporar 5 ml de cultivo en 5 tubos de vidrio estériles. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo de la misma manera que fueron descritos previamente para los ensayos de determinación de MIC de rifampicina libre.



Con los stock obtenidos de rifampicina nanoencapsulada con los dos diferentes polímeros a explorar (PLA y L100) se analizó la concentración de 1 µg/ml de la siguiente manera:

- Concentración de 1 µg/ml de rifampicina nanoencapsulada en polímero L100: se extrajo del primer tubo de vidrio 100 µl de cultivo bacteriano para incorporar 100 µl de rifampicina nanoencapsulada en L100. De manera paralela en el tubo de vidrio #2 se le extrajo de la misma manera 100 µl de cultivo para colocar 100 µl de nanopartículas Blanco en polímero L100.
- Concentración de 1 µg/ml de rifampicina nanoencapsulada en polímero PLA: se extrajo del tercer tubo de vidrio 50 µl de medio de cultivo bacteriano para agregar 50 µl de rifampicina nanoencapsulada en PLA. Al mismo tiempo, en el tubo de vidrio #4 se le extrajo 50 µl de cultivo bacteriano y se le agregó 50 µl de nanopartículas Blanco en polímero PLA.

Para finalizar esta primera fase del ensayo, un tubo con 5 ml de TCS fue utilizado como Control (C) y quinto tubo con 5 ml de cultivo bacteriano fue tomado como Testigo (T). Estos, junto con los tubos de las concentraciones de rifampicina en diferentes polímeros y sus respectivos Blancos de nanopartículas fueron incubados en condiciones aeróbicas a una temperatura de 37° C para dar lectura a la Concentración Mínima Inhibitoria a las 24 horas.

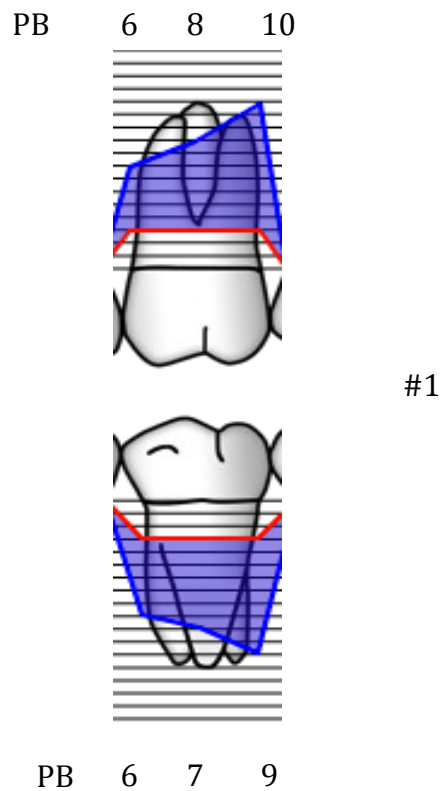
# **RESULTADOS**

## IX. RESULTADOS

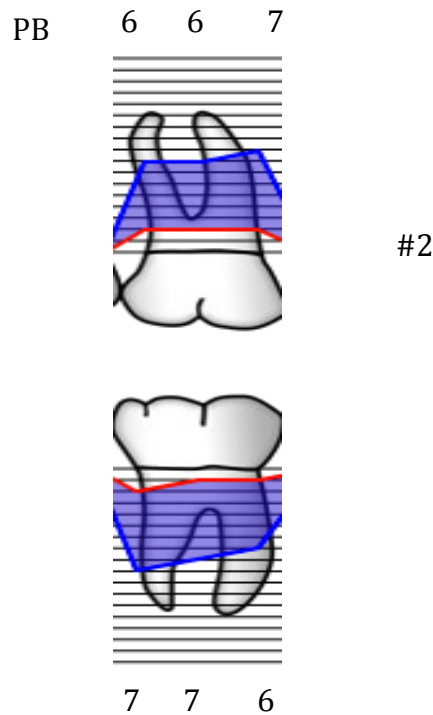
### IX.1 Toma de muestras de fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal

Posterior a la aceptación de los pacientes para su ingreso a la clínica de Periodoncia e Implantología de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L), se eligieron 4 para este estudio, los cuales se sondearon para identificar los sitios de mayor profundidad de bolsa. Una vez registrado los datos, se procedió a la toma de las muestras de la manera previamente descrita.

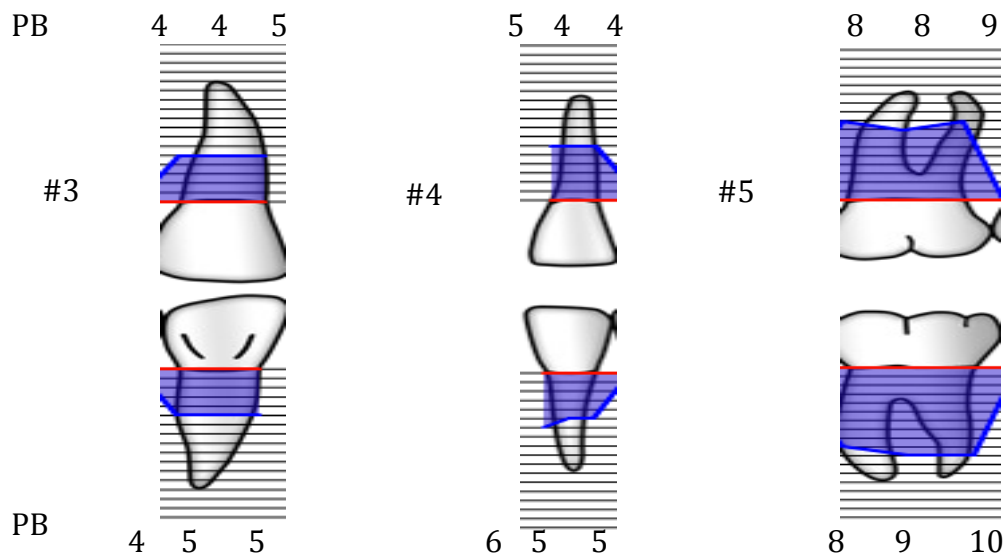
Paciente 1. Toma de muestra #1 de fluido crevicular en zona disto-vestibular con profundidad de bolsa de 10 mm en primer molar superior izquierda.



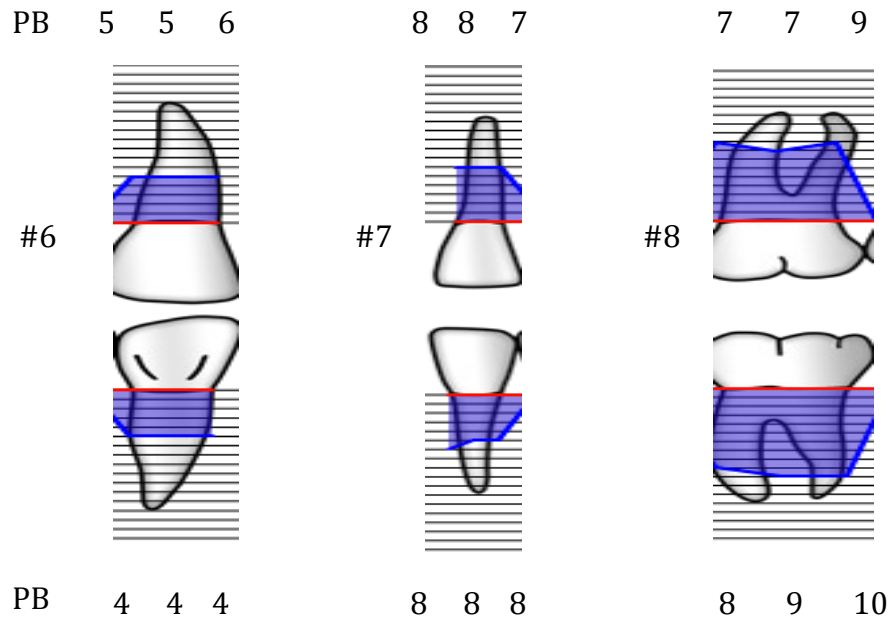
Paciente 2. Toma de muestra #2 de fluido crevicular en zona disto-bucal con profundidad de bolsa de 7 mm en primer molar inferior derecho.



Paciente 3. Toma de muestra #3 de fluido crevicular en zona mesio-labial con profundidad de bolsa de 5 mm en incisivo superior derecho, muestra #4 mesio- bucal con profundidad de bolsa de 6 mm en incisivo inferior izquierdo y muestra #5 disto-bucal con profundidad de bolsa de 10 mm en primer molar inferior izquierdo.



Paciente 4. Toma de muestra #6 de fluido crevicular en zona mesio-labial con profundidad de bolsa de 6 mm en incisivo superior derecho, muestra #7 mesio-bucal con profundidad de bolsa de 8 mm en incisivo inferior izquierdo y muestra #8 disto-bucal en primer con profundidad de bolsa de 10 mm en primer molar inferior izquierdo.



Las 8 muestras fueron incubadas durante 7 días en condiciones aeróbicas a una temperatura de 37° C para su correcta reproducción. Posterior a esto las muestras se propagaron por triplicado para obtener suficiente material de trabajo.

## IX.2 Identificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante extracción de ADN genómico y PCR en tiempo real

### IX.2.1 Extracción del DNA genómico

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvo el ADN genómico extraído de las 8 muestras de los 4 pacientes. Esto permitió realizar la amplificación por PCR en tiempo real de todas las muestras para identificar el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

### IX.2.2 Detección de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real

Una vez que se contó con el ADN genómico extraído y purificado se programó el LihtCycler de la manera descrita previamente y se determinó la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante la amplificación de la subunidad ribosomal 16S mediante PCR en tiempo real. En la figura 3a y 3b, se aprecia la curva típica del resultado de PCR en tiempo real de la detección del microorganismo periodontopatógeno.

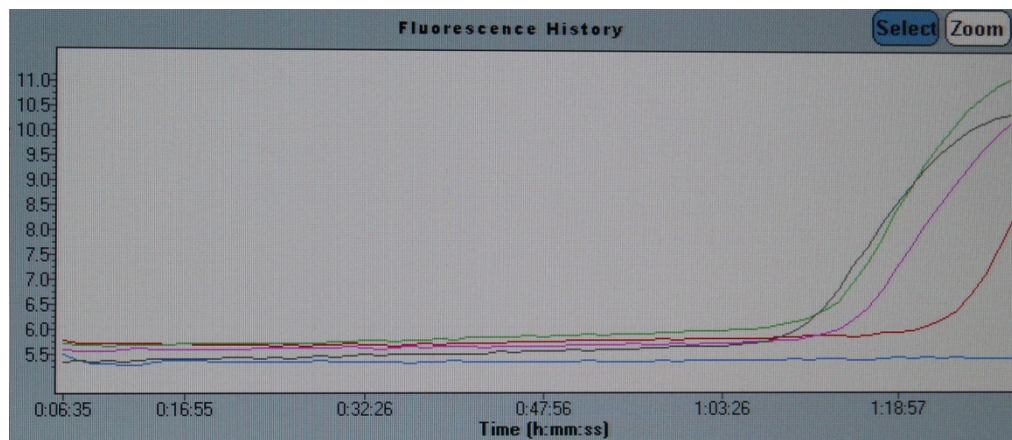


Fig. 3a. Muestra #2 (roja), #4 (verde), #3(rosa), #5 (morada)

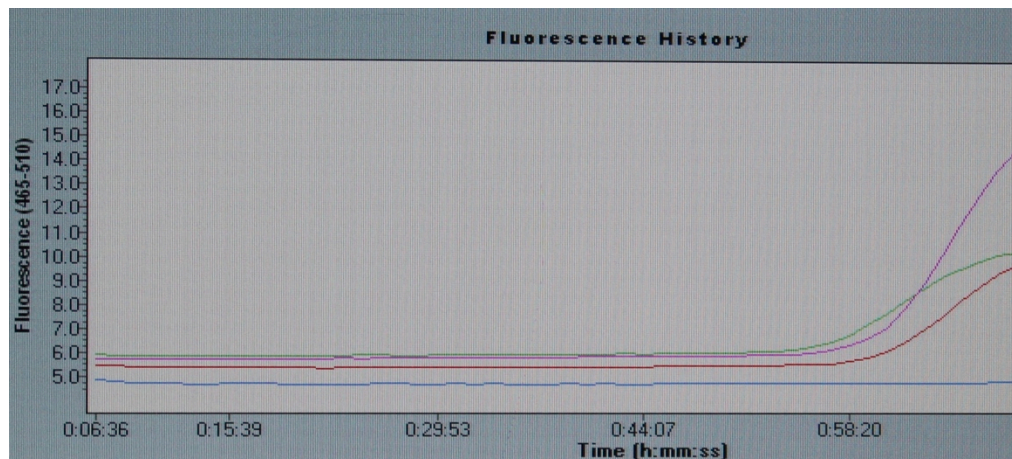


Fig. 3b. Muestra # 6(roja), #7(verde), #8 (rosa)

Fig. 3. Detección de microorganismos periodontopatógenos por PCR tiempo real. El levantamiento de la línea indica un resultado positivo, mientras que la línea horizontal indica un resultado negativo.

Como se observa gráficamente en todas mas muestras se encuentra presente el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sin embargo no en todas se presenta en la misma cantidad por lo cual se eligió para trabajar con la muestra #8 (rosa) ya que se observo el levantamiento de la línea en menor tiempo que en las demás muestras.

### IX.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de rifampicina libre

Habiendo realizado el conteo bacteriano para la obtención de tubos con 5 ml de cultivo bacteriano en cada uno con  $1 \times 10^5$  UFC y las diluciones correspondientes, se procedió se la evaluación de las concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y 0.001  $\mu\text{g/ml}$  24 horas posteriores de haberlas realizado (Fig. 3).

Como se muestra en la imagen la concentración de rifampicina de 1  $\mu\text{g/ml}$  fue la mas baja que inhibió el crecimiento visible del *A.a* después de su incubación.

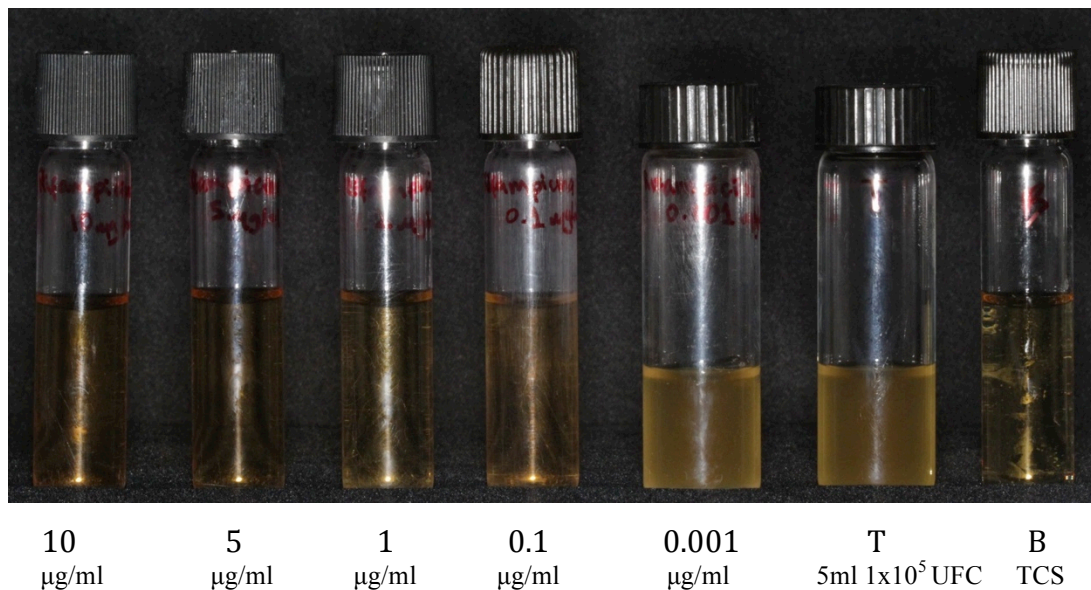


Fig. 4 . Determinación de la CMI mediante turbidez .

#### **IX.4 Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con rifampicina y su evaluación antimicrobiana**

Se desarrollaron tres formulaciones de nanopartículas poliméricas con un tamaño entre 100 y 200 nm, preparadas por el método de nanoprecipitación.

##### **Lote con Eudragit EPO**

<b>FASE ORGÁNICA</b>	<b>FASE ACUOSA</b>
300 µL etanol	10 mL Lutrol F127 (1% p/p)
2700 µL acetona	
50 mg EPO	
1 mg RIF	

##### **Lote con Eudragit L100 55**

<b>FASE ORGÁNICA</b>	<b>FASE ACUOSA</b>
300 µL etanol	10 mL agua destilada
2700 µL acetona	
25 mg L100 55	
2 mg RIF	

##### **Lote con ácido poliláctico (PLA)**

<b>FASE ORGÁNICA</b>	<b>FASE ACUOSA</b>
300 µL etanol	10 mL Lutrol F127 (1% p/p)
2700 µL acetona	
15 mg PLA	
1 mg RIF	

La preparación de los lotes de nanopartículas se ajustó para asegurar la presencia del 100% de rifampicina y se evaluó la actividad de dicho fármaco encapsulado, contra *A.a* , con distintos polímeros formadores de partículas.

La formulación con Eudragit EPO presentó un tamaño de partícula de 116 nm y un IP de 0.161 (Fig. 5). Al probar su actividad antimicrobiana mostró una CMI de 1 µg/ml (Fig. 6).

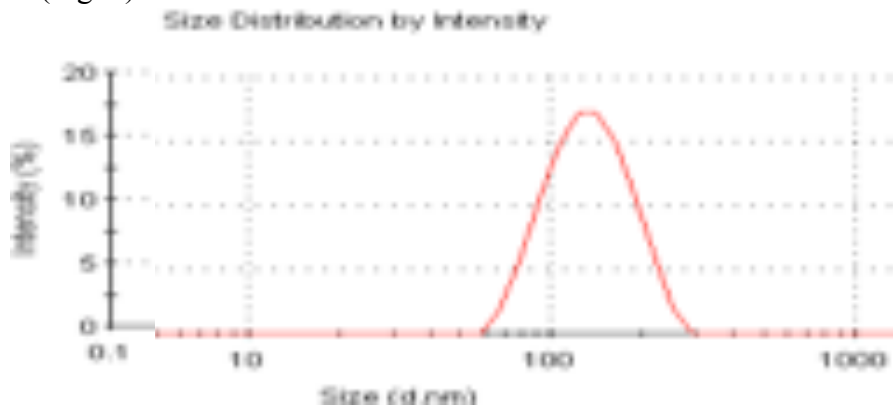
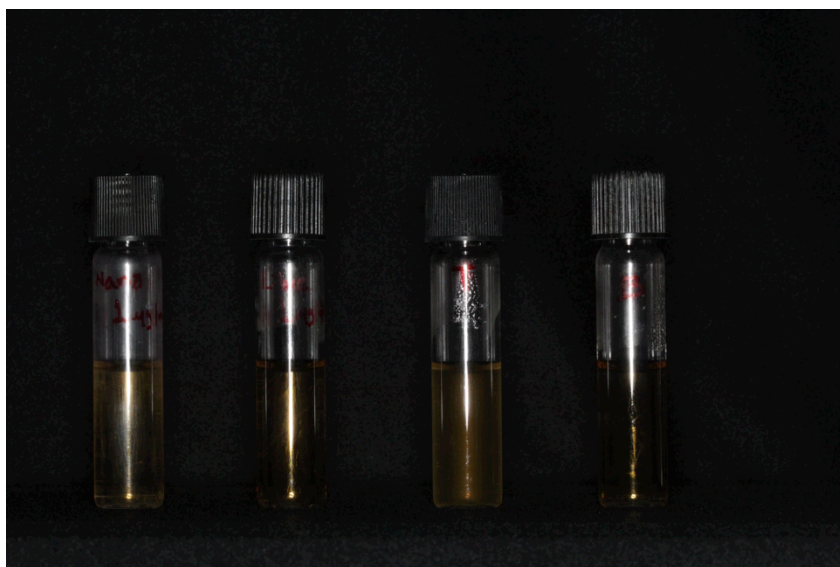


Fig. 5. Distribución de tamaño de NP de Eudragit EPO



NP con Rif 1 µg/ml      Rif libre 1 µg/ml      T      B

Fig. 6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de NP con Rifampicina a las 24 h.

Con el lote con Eudragit L100 55 se obtuvo un tamaño de partícula de 100 nm, un IP de 0.138 (Fig. 7). No presentó inhibición microbiana a las 24 h. Después de 72 h., se mantuvo el resultado.

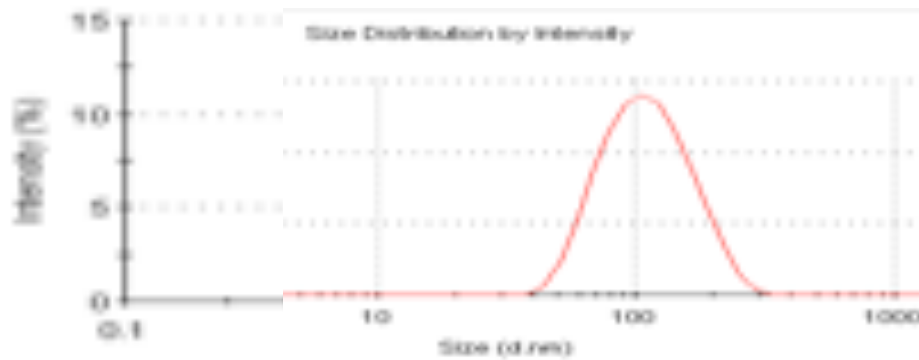


Fig. 7. Distribución de tamaño de NP de Eudragit 100- 55

La formulación de PLA mostró un tamaño de partícula de 160 nm y un IP de 0.179 (Fig. 8). Dicha formulación no presentó inhibición contra *A.a* a las 24 h (Fig.10). El crecimiento persistió hasta 5 días después. (Fig. 11 a, b).

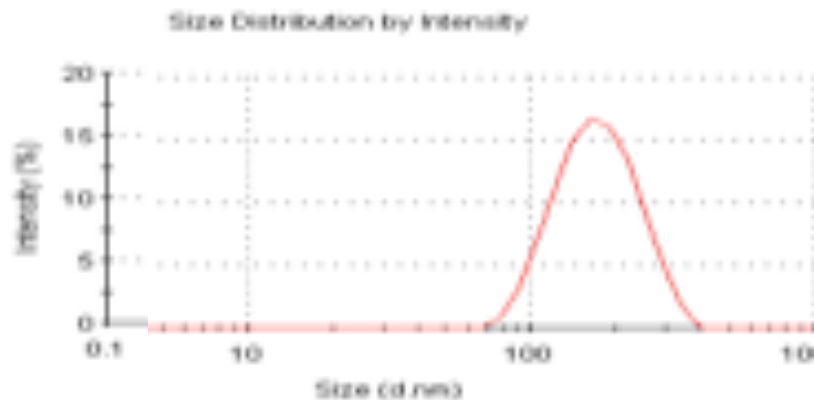


Fig. 8. Distribución de tamaño de NP de PLA

Cabe señalar que los tubos blanco con nanopartículas (sin rifampicina) presentaron crecimiento microbiano.



T	PLA Rif	L100 55 Rif	L100 55	PLA	B
	1 µg/ml	1 µg/ml	Blanco	Blanco	

Fig. 9. Evaluación de la actividad de NP con rifampicina con diferentes polímeros a las 24 h.

a.



L100 Rif  
10 µg/ml

L100 Rif  
5 µg/ml

L100 Rif  
1 µg/ml

B

T

b.



PLA Rif  
10 µg/ml

PLA Rif  
5 µg/ml

PLA Rif  
1 µg/ml

B

T

Fig. 10. a, b. Evaluación antimicrobiana de NP con rifampicina con diferentes polímeros a las 120 h.

# **DISCUSIÓN**

## X. DISCUSIÓN

El desarrollo de la nanociencia y nanotecnología han abierto un alto potencial de aplicaciones en diferentes áreas como electrónica, magnetismo, química y la medicina. El interés y la inversión en la investigación de la nanotecnología han ido en incremento por parte del sector público y privado, con el fin de incorporar sus avances en las ciencias del área relacionadas con la salud. De este manera, nace la nanotecnología farmacéutica, la cual se enfoca al desarrollo de estructuras nanométricas con potencial biocida, mostrando actividad bactericida, antifúngica y/o antiviral, además pueden actuar como vehículos de agentes terapéuticos aprovechando su propiedad “*delivery*”. Estos sistemas se pueden aprovechar para mejorar no sólo el envío de fármacos a un tejido seleccionado, sino también *dosificar* la administración de vacunas, proteínas y péptidos e incluso de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, entre otros (Verma et al., 2010).

En este trabajo, se presenta la evidencia sobre la evaluación antimicrobiana de rifampicina nanoencapsulada contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presente en la periodontitis. Una vez identificados a los pacientes clínicamente con enfermedad periodontal crónica mediante sondeo, se procedió a la toma de muestras de fluido crevicular. Debido a que las muestras tomadas llevaban un conjunto de microorganismos presentes en la zona de lesión, para verificar la presencia del *A.a*, se identificó mediante PCR en tiempo real. Las 8 muestras de los 4 pacientes fueron sometidas a dicho análisis, teniendo un resultado positivo al *A.a* en todas las muestras de pacientes. Este resultado correlaciona con previos reportes donde identificaron al *A.a* en pacientes con periodontitis agresiva ya que los pacientes para este estudio estaban diagnosticados con periodontitis crónica (Aberg et al., 2009; Isaza et al., 2008; Haar et al., 2006; Cortelli et al., 2010). Una vez identificado el microorganismo de estudio, se seleccionó solo una muestra la cual mostró en el análisis la mayor presencia de *A.a*. Prosiguiendo con el estudio, se llevó a cabo la evaluación antimicrobiana de la rifampicina libre, por lo que siguiendo con la técnica de dilución de tubos (Negroni, 2005). Los microorganismos se expusieron a diferentes concentraciones de rifampicina. El resultado obtenido de la

rifampicina libre para los microorganismos periodontopatógenos, en especial el *A.a* es de 1 µg/ml mientras que para el *M. tuberculosis* es de 0.5 µg/ml (Iseman, 2000). Esta es la primera evidencia de la actividad bactericida de la rifampicina contra bacterias periodontales.

Con respecto a las formulaciones de NP, todas presentaron un tamaño de 100 a 200 nm y su IP indica una distribución de tamaño homogénea.

Las NP de Eudragit EPO cargadas con Rifampicina (Fig. 5) se probaron *in vitro* contra *A.a* el resultado obtenido fue una CMI de 1 µg/ml (Fig. 6) misma que el fármaco libre, lo que indica que la liberación de RIF de la NP fue inmediata. No fue posible retener la molécula, ya que, Eudragit EPO es un polímero catiónico (Evonik Industries) y el activo tiene un pKa 8.25 (DrugBank), por lo que, al estar en un medio con pH por debajo de 8.25 se encontraba protonado y no se logró establecer una interacción entre polímero-fármaco adecuada para una liberación sostenida de RIF.

En base a lo anterior se desarrolló una formulación con un polímero aniónico (Evonik Industries), el cual fue Eudragit L100 55 (Fig. 7). La evaluación antimicrobiana con dicho polímero con Rif se siguió durante 5 días y no mostró inhibición (Fig. 10 a), lo cual indica el efecto contrario al lote con Eudragit EPO, es decir, hubo una fuerte interacción polímero-fármaco y no liberó el activo durante este tiempo. En el trabajo realizado por Martínez-Rivas *et. al.* se llevó a cabo la evaluación *in vitro* de RIF con Eudragit L100 55, y, el efecto inhibitorio se determinó después de 9 días de incubación de la formulación con *M. tuberculosis*. Finalmente, se evaluó un lote de NP de PLA con Rifampicina (Fig. 8) el cual tuvo un efecto similar a las NP de Eudragit L100 55, puesto que, no mostró inhibición durante los 5 días de incubación con la bacteria (Fig. 10 b). Este hace suponer que el fármaco no fue liberado o solo se liberó en una baja proporción que no permitió llegar a la CMI.

# **CONCLUSIONES**

## XI. CONCLUSIONES

- Las muestras de fluido crevicular de pacientes con bolsas de 5mm de profundidad o mayores tienen mayor probabilidad de contener *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- Las bacterias periodontopatógenas, principalmente el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tienen gran similitud con *M. tuberculosis* debido a su bajo metabolismo, crecimiento y división celular.
- Se demostró la eficacia de la rifampicina contra bacterias periodontopatógenas.
- La concentración mínima inhibitoria de la rifampicina libre contra bacterias orales fue de 1µg/ml.
- Se desarrollaron tres formulaciones de NP con distintos polímeros con tamaño de 100 a 200 nm y una distribución homogénea en cada una.
- Hay una liberación inmediata de RIF con Eudragit EPO, debido a la naturaleza catiónica de la interacción fármaco-polímero. Mientras que, los lotes de RIF en NP de Eudragit L100 55 y PLA tuvieron una fuerte interacción, lo cual, no permitió la liberación del fármaco durante los 5 días de incubación de las formulaciones con la bacteria. Por lo que será necesario, en un futuro, llevar a cabo ensayos con tiempos de incubación mayores para observar un efecto de inhibición por parte del fármaco liberado sostenidamente de las NP.

# **LITERATURA CITADA**

## XII. LITERATURA CITADA

Aberg CH, Sjödin B, Lakio L, Pussinen PJ, Johansson A, Claesson R. **Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study.** J Clin Periodontol. 2009 Oct;36(10):815-22.

Akiyama Y, Nagahara N, Kashihara T, Hirai S, Toguchi H. **In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres prepared for the gastrointestinal tract using polyglycerol esters of fatty acids and a poly(acrylic acid) derivative.** Pharm Res. 1995 Mar;12(3):397-405.

Ando ES, De-Gennaro LA, Favari M, Feres M, DiRienzo JM, Mayer MP. **Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients.** J Periodontal Res. 2010 Aug;45(4):471-80.

Arangoa MA, Campanero MA, Renedo MJ, Ponchel G, Irache JM. **Gliadin nanoparticles as carriers for the oral administration of lipophilic drugs. Relationships between bioadhesion and pharmacokinetics.** Pharm Res. 2001 Nov;18(11):1521-7.

Armitage GC. **Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis.** Periodontol 2000. 2010 Jun;53:70-88.

Arujo L, Sheppard M, Lobenberg R, Kreuter J. **Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles.** Int. J. Pharm. 1999. 176: 209- 224.

Arráiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. **Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares.** AVFT. 2005. 24 (1).

Beers M.H, Porter RS, Jones TV. Merck Manual of Diagnosis and Therapy. 18<sup>th</sup>edn. 2006.Wiley. New York. N.Y.

Becerra G, Plascencia A, Luévanos , Domínguez M, Hernández I. **Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias.** Enf Inf Microbiol. 2009 29 (2): 70-76.

Bhatavadekar NB, Williams RC. **Modulation of the host inflammatory response in periodontal disease management: exciting new directions .** Int Dent J. 2009. Oct; 59 (5):305-8.

Bodmeier R, Chen HG, Paeratakul O. **A novel approach to the oral delivery of micro-or nanoparticles.** Pharm Res. 1989 May;6(5):413-7.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. **Impact of local adjuncts to scaling and root planning in periodontal disease therapy: a systematic review.** J Periodontol. 2005. 76: 1227–1236.

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. **Regulation of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains.** Infect Immun. 1994 Feb;62(2):501-8.

Brook I. **Microbiology and management of periodontal infections.** Gen Dent. 2003 Sep-Oct;51(5):424-8.

Calleja I, Avellanal MC, Ruz N, Renedo MJ, Blando M. **Desarrollo y caracterización de nanopartículas de Rifampicina para su aplicación en el tratamiento de la tuberculosis.** Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. U. Navarra.

Callender DP, Jayaprakash N, Bell A, Petraitis V, Petraitiene R, Candelario M, Schaufele R, Dunn JM, Sei S, Walsh TJ, Balis FM. **Pharmacokinetics of oral zidovudine entrapped in biodegradable nanospheres in rabbits.** Antimicrob Agents Chemother. 1999 Apr;43(4):972-4.

Chia- Ming C, Weiner N, **Gastrointestinal uptake of liposomes. I. In vitro and in situ studies.** Int. J. Pharm 1987. 37: 75-85.

Clares B. **Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetono de triamcinolona.** Tesis Doctoral 2003.

Coll P. **Drugs with activity against Mycobacterium tuberculosis.** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003 Jun-Jul;21(6):299-307; quiz 308, 326.

Cortelli JR, Querido SM, Aquino DR, Ricardo LH, Pallos D. **Longitudinal clinical evaluation of adjunct minocycline in the treatment of chronic periodontitis.** J Periodontol. 2006 Feb;77(2):161-6.

Cortelli JR, Roman-Torres CV, Aquino DR, Franco GC, Costa FO, Cortelli SC. **Occurrence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in Brazilians with chronic periodontitis.** Braz Oral Res. 2010 Apr-Jun;24(2):217-23.

Couvreur P. **Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers.** Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(1):1-20.

Cox RA. **Quantitative relationships for specific growth rates and macromolecular compositions of Mycobacterium tuberculosis, Streptomyces coelicolor A3(2) and Escherichia coli B/r: an integrative theoretical approach.** Microbiology. 2004 May;150(Pt 5):1413-26.

de Haar SF, Hiemstra PS, van Steenberg MT, Everts V, Beertsen W. **Role of polymorphonuclear leukocyte-derived serine proteinases in**

**defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.** Infect Immun. 2006 Sep;74(9):5284-91.

Drisko CH. **Non-surgical pocket therapy: pharmacotherapeutics.** Ann Periodontol. 1996 Nov;1(1):491-566.

Dunn JM, Hollister AS. **Oral bioavailability of heparin using a novel delivery system.** Curr. Ther. Res 1995. 56: 738-745.

**DrugBank Versión 2.5.** Rifampicin. Extraído el 12 de junio de 2013 desde <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>.

Evoik Industries. Technical information Eugadrit® EPO. Extraído el 12 de junio de 2013 desde <http://eudargit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/protective-formulations/e-po/pages/default.aspx>.

Evoik Industries. Technical information Eugadrit® L 100-55. Extraído el 12 de junio de 2013 desde <http://eudragit.evonik.com/sites/dc/Downloadcenter/Evonik/Product/EUDRAGIT/specification-eudragit-l-100-55.pdf>.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,** Int. J.Pharm.1989. 55, R1-R4.

Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. **How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases.** Periodontol 2000. 2006;42:114-57.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M. **Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents.** J Clin Microbiol. 2007 Dec;45(12):3859-69. Epub 2007 Oct 17.

Gaetti-Jardim Jr. E, Wahasugui TC, Tomazinho PH, Marques MM, Nakano V, Avila-Campos MJ. **Distribution of Biotypes and Leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Isolated from Brazilian patients with Chronic Periodontitis.** Brazilian J Microbiol 2008. 39:658-663.

Galindo- Rodríguez S, Allémann E, Doelker E, Fessi H, **Versatility of three techniques for preparing nanoparticles of different sizes and drug loading.** J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2005. Submitte.22(5): 419-463.

Garzón-Serra M, García-Fernández B. **Nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapéuticos.** Razón y Palabra. núm.68, mayo-junio, 2009, pp. 1-14.

Gasparetto A, Arana-Chavez VE, Avila-Campos MJ. **Actinobacillus actinomycetemcomitans attached to oral epithelial cells: Stability and Ultrastructural Aspect.** PesqOdont Bras 2000.14(4):311-318.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. **Microbiological examination of infected dental root canals.** Oral Microbiol Immunol. 2004 Apr;19(2):71-6.

Graça MA, Watts TL, Wilson RF, Palmer RM. **A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria.** J Clin Periodontol. 1997 Apr;24(4):249-53.

Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. **Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres.** Science. 1994 Mar 18;263(5153):1600-3.

Grossi SG, Goodson JM, Gunsolley JC, Otomo-Corgel J, Bland PS, Doherty F, Comiskey J. **Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-complex bacteria in smokers.** J Periodontol. 2007 Sep;78(9):1741-50.

Guillesspie SH, Hawkey PM. **Principles and Practice of Clinical Bacteriology.** 2da edition. England: John Wiley & sons, Ltd 2006.273- 279.

Haffajee AD, Socransky SS. **Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.** Periodontol 2000. 1994 Jun;5:78-111.

Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, Seymour GJ. **Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in an Australian population.** J Clin Periodontol. 2001 Dec;28(12):1163-71.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. **Evidence for the role of highly leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis.** J Periodontol. 2000 Jun;71(6):912-22.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leukotoxic JP2 clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans and progression of periodontal attachment loss. J Dent Res. 2004 Oct;83(10):767-70.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. **Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study.** Lancet. 2008 Jan 19;371(9608):237-42. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60135-X.

Hellström MK, McClain PK, Schallhorn RG, Bellis L, Hanlon AL, Ramberg P. **Local minocycline as an adjunct to surgical therapy in moderate to severe, chronic periodontitis.** J Clin Periodontol. 2008 Jun;35(6):525-31.

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. ***Actinobacillus actinomycetemcomitans*.** J Med Microbiol. 2002 Dec;51(12):1013-20.

Henderson RJ, Boyens JV, Holborow DW, Pack AR. **Scaling and root-planing treatment with adjunctive subgingival minocycline. A clinical pilot study over six months, of sites adjacent to and remote from the antibiotic application.** J Int Acad Periodontol. 2002 Jul;4(3):77-87.

Hernandez G, Moreno A, Porras A. **Tratado de medicina farmacéutica.** Editorial Panamericana. México 2010. Pags. 825.

Hilley AM, Toth I, Shaw AJ, Florence AT. **Co- polymerised peptide particles (cpp) I: synthesis, characterisation and in vitro studies on a novel oral nanoparticle delivery system.** J. Control. Release 199. 641 271-281.

Houri-Haddad Y, Halabi A, Soskolne WA. **Inflammatory response to chlorhexidine, minocycline HCl and doxycycline HCl in an in vivo mouse model.** J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(9):783-8.

Hung HC, Douglass CW. **Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss.** J Clin Periodontol. 2002 Nov;29(11):975-86.

Hussain N, Florence AT. **Iinvasin- induced oral uptake of nanospheres: utilising bacterial mechanisms of epithelial cell entry.** J. Control. Release 1996. 41 S3-S4.

Isaza MP, Duncan MS, Kaplan JB, Kachlany SC. **Screen for leukotoxin mutants in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: genes of the phosphotranferases system are required for leukotoxin biosynthesis.** Infect Immun. 2008 Aug;76(8):3561-8.

Iseman MD. **A clinician's guide to tuberculosis.** Edit. Ilustrada. 2000. 460.

Kachlany SC. ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy.** J Dent Res. 2010 Jun;89(6):561-70.

Katzung B. 2005. **Farmacología básica y clínica**. 9a ed. México: Edit. Manual moderno. 777-778.

Kelk P, Claesson R, Hänström L, Lerner UH, Kalfas S, Johansson A. **Abundant secretion of bioactive interleukin 1 beta by human macrophages induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin**. Infect Immun. 2005 Jan;73(1):453-8.

Kilian M, Frandsen EV, Haubek D, Poulsen K. **The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis**. Periodontol 2000. 2006;42:158-79.

Kinane DF, Radvar M. **A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets**. J Periodontol. 1999 Jan;70(1):1-7.

Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. **Cloning and expression of the leukotoxin gene from Actinobacillus actinomycetemcomitans**. Infect Immun. 1989 May;57(5):1465-9.

Lally ET, Kieba IR, Demuth DR, Rosenbloom J, Golub EE, Taichman NS, Gibson CW. **Identification and expression of the Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin gene**. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Feb 28;159(1):256-62.

Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM. **Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa**. Pharm Res. 2001 Jun;18(6):788-93.

Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Durán N. **Antileishmanial activity of the violacein extracted from Chromobacterium violaceum**. J Antimicrob Chemother. 2001 Sep;48(3):449-50.

Levy SB, Marshall B. **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses**. Nat Med. 2004 Dec;10(12 Suppl):S122-9.

Ljilja K, Milica P, Radmila O. **The importance of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in etiology of periodontal disease- Mini review**. Acta medica Medianae. 2009; 48 (3): 35-37.

Lin SY, Chen KS, Teng HH, Li MJ. **In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters**. J Microencapsul. 2000 Sep-Oct;17(5):577-86.

Lu HK, Chei CJ. **Efficacy of subgingivally applied minocycline in the treatment of chronic periodontitis.** J Periodontal Res. 2005 Feb;40(1):20-7.

Martínez- Rivas CJ. (2011). Diseño y Desarrollo de Nanopartículas Poliméricas biodegradables para la encapsulación de Rifampicina y su evaluación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, N.L. México.

McClellan S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z, Brayden D. **Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia.** Eur J Pharm Sci. 1998 Apr;6(2):153-63.

Meinberg TA, Barnes CM, Dunning DG, Reinhardt RA. **Comparison of conventional periodontal maintenance versus scaling and root planing with subgingival minocycline.** J Periodontol. 2002 Feb;73(2):167-72.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. **Identification of an immunoglobulin Fc receptor of Actinobacillus actinomycetemcomitans.** Infect Immun. 1994 Oct;62(10):4500-5.

Mohanraj VJ, Chen Y. **Nanoparticles.** Trop. Journal of Pharm. Research 2006. 5 (1): 561- 573.

Murray P. **Mycobacterium.** Manual of clinical microbiology. 1999. 17 edition. 370-421.

Mycek M, Haervey R, Champe P. **Farmacología.** 2ª. Edición. Editorial McGraw-Hill. México, D.F. 2004. 393-399.

Negróni M. **Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica.** 2a edición. Ed. Médica Panamericana. 2005. 656.

Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. **Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter segnis comb. nov., and emended description of Aggregatibacter aphrophilus to include V factor-dependent and V factor-independent isolates.** Int J Syst Evol Microbiol. 2006 Sep;56(Pt 9):2135-46.

Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Nohara M, Kawashima Y. **Biodegradable submicron carriers for peptide drugs: Preparation of D,L- lactide/ glycolide copolymer (PLGA)nanospheres with naferilin acetate by a novel emulsion- phase separation method in an oil system.** Int. J. pharm. 1995. 121: 45-54.

Oringer RJ, Al-Shammari KF, Aldredge WA, Iacono VJ, Eber RM, Wang HL, Berwald B, Nejat R, Giannobile WV. Effect of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption. *J Periodontol*. 2002 Aug;73(8):835-42.

Page RC, Sims TJ, Engel LD, Moncla BJ, Bainbridge B, Stray J, Darveau RP. **The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide.** *Infect Immun*. 1991 Oct;59(10):3451-62.

Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. **Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis.** *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(6):373-8.

Papone VY, Morteo G. **Un Patógeno Periodontal Virulento *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.** *ActasOdontol*. 2005. 2(1):43-50.

Paquette D, Oringer R, Lessem J, Offenbacher S, Genco R, Persson GR, Santucci EA, Williams RC. **Locally delivered minocycline microspheres for the treatment of periodontitis in smokers.** *J Clin Periodontol*. 2003 Sep;30(9):787-94.

Paquette DW, Hanlon A, Lessem J, Williams RC. **Clinical relevance of adjunctive minocycline microspheres in patients with chronic periodontitis: secondary analysis of a phase 3 trial.** *J Periodontol*. 2004 Apr;75(4):531-6.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. **The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites.** *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.

Perry MB, MacLean LL, Gmür R, Wilson ME. **Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b.** *Infect Immun*. 1996 Apr;64(4):1215-9.

Prescott L, Harley J, Klein D. **Microbiology**. 4th edition. 1999.

Prokop A, Kozlov E, Newman GW, Newman MJ. **Water-based nanoparticulate polymeric system for protein delivery: permeability control and vaccine application.** *Biotechnol Bioeng*. 2002 May 20;78(4):459-66.

Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. **Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects.** *Periodontol 2000*. 2002;28:72-90.

Rabie G, Lally ET, Shenker BJ. **Immunosuppressive properties of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin.** *Infect Immun*. 1988 Jan;56(1):122-7.

Radvar M, Pourtaghi N, Kinane DF. **Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets.** *J Periodontol*. 1996 Sep;67(9):860-5.

Ramírez- Rivera N. **Mycobacterium tuberculosis: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa.** Revista medica de la Universidad Veracruzana. 2002

Rams TE, Slots J. **Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket.** Periodontol 2000. 1996 Feb;10:139-59.

Ranney RR. Classification of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1993 Jun;2:13-25.

Renvert S, Lessem J, Dahlén G, Lindahl C, Svensson M. **Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial.** J Clin Periodontol. 2006 May;33(5):362-9.

Renvert S, Lessem J, Dahlén G, Renvert H, Lindahl C. **Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial.** J Periodontol. 2008 May;79(5):836-44.

Rowland RN, Woodley JF. **The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase.** Biochim Biophys Acta. 1980 Dec 5;620(3):400-9.

Sai P, Damagé C, Rivereau AS, Hoeltzel A, Gouin E. **Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice.** J Autoimmun. 1996 Dec;9(6):713-22.

Sakuma S, Suzuki N, Sudo R, Hiwatari K, Kishida A, Akashi M. **Optimized chemical structure of nanoparticles as carriers for oral delivery of salmon calcitonin.** Int J Pharm. 2002 Jun 4;239(1-2):185-95.

Schmidt C, Bodmeier R. **Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms.** J Control Release. 1999 Feb 1;57(2):115-25.

Secretaria de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. ISSN 1405-2636. Sistema Único de Información

Shenker BJ, Besack D, McKay T, Pankoski L, Zekavat A, Demuth DR. **Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity.** J Immunol. 2005 Feb 15;174(4):2228-34.

Shenker BJ, McKay T, Datar S, Miller M, Chowhan R, Demuth D. **Actinobacillus actinomycetemcomitans immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells.** J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4773-80.

Shive MS, Anderson JM. **Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.** Adv Drug Deliv Rev. 1997 Oct 13;28(1):5-24.

Silva C, Bermúdez, Valmore. Arráiz, Naylet. Bermúdez, Rodríguez F. Valdelamar M, Leal L, Elliuz. **Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis.** Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2007. 26.

Slots J. **Selective medium for isolation of Actinobacillus actinomycetemcomitans.** J Clin Microbiol. 1982 Apr;15(4):606-9.

Slots J. **Herpesviruses in periodontal diseases.** Periodontol 2000. 2005;38:33-62.

Slots J, Ting M. **Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment.** Periodontol 2000. 1999 Jun;20:82-121.

Slots J, Rams TE. **Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages.** J Clin Periodontol. 1990 Aug;17(7 ( Pt 2)):479-93.

Socransky SS, Haffajee AD. **The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts.** J Periodontol. 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31.

Struthers KJ, Westran PR. **Clinical Bacteriology.** Manson Publishing. 192pp. 2003.

Levy SB, Marshall B. **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** Nat Med. 2004 Dec;10(12 Suppl):S122-9.

Timmerman MF, van der Weijden GA, van Steenberghe TJ, Mantel MS, de Graaff J, van der Velden U. **Evaluation of the long-term efficacy and safety of locally-applied minocycline in adult periodontitis patients.** J Clin Periodontol. 1996 Aug;23(8):707-16.

Tripathi. **Farmacologia en odontologia. Fundamentos.** Edit. Panamericana. 2005

Van Dyke TE, Offenbacher S, Braswell L, Lessem J. **Enhancing the value of scaling and root-planing: Arestin clinical trial results.** J Int Acad Periodontol. 2002 Jul;4(3):72-6.

van Steenberghe D, Rosling B, Söder PO, Landry RG, van der Velden U, Timmerman MF, McCarthy EF, Vandenhoven G, Wouters C, Wilson M, Matthews J, Newman HN. **A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis.** J Periodontol. 1999 Jun;70(6):657-67.

van Winkelhoff AJ, Slots J. **Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections.** Periodontol 2000. 1999 Jun;20:122-35.

Verma AK, Chanchal A, Maitra A. **Co-polymeric hydrophilic nanospheres for drug delivery: release kinetics, and cellular uptake.** Indian J Exp Biol. 2010 Oct;48(10):1043-52.

Verma SK, Prabhat KC, Goyal L, Rani M, Jain A. **A critical review of the implication of nanotechnology in modern dental practice.** Natl J Maxillofac Surg. 2010. Jan;1(1):41-4.

Walker CB, Karpinia K, Baehni P. **Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials.** Periodontol 2000. 2004;36:146-65.

Williams RC, Paquette DW, Offenbacher S, Adams DF, Armitage GC, Bray K, Caton J, Cochran DL, Drisko CH, Fiorellini JP, Giannobile WV, Grossi S, Guerrero DM, Johnson GK, Lamster IB, Magnusson I, Oringer RJ, Persson GR, Van Dyke TE, Wolff LF, Santucci EA, Rodda BE, Lessem J. **Treatment of periodontitis by local administration of minocycline microspheres: a controlled trial.** J Periodontol. 2001 Nov;72(11):1535-44.

Yang HW, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai CH. **Relationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b to aggressive periodontitis: frequency in purecultured isolates.** J Periodontol. 2004 Apr;75(4):592-9.

Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. **Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of human periodontal disease.** Adv Dent Res. 1988 Nov;2(2):269-74.

# **RESUMEN BIOGRÁFICO**

### **XIII. RESUMEN BIOGRÁFICO**

CINDY HERNÁNDEZ ROMERO

Candidata para el grado de  
Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en  
Periodoncia e Implantología

**Tema de tesis:**

*“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE RIFAMPICINA  
NANOENCAPSULADA CONTRA AGGREGATIBACTER  
ACTINOMYCETEMCOMITANS PRESENTE EN LA PERIODONTITIS”*

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Veracruz, Veracruz, México el día 9 de febrero de 1985.  
Hija de Ma. Esther Romero Ascanio y Víctor Hernández Martínez.

Educación: Egresada de la Universidad Veracruzana campus Boca del Río, Ver.  
Generación 2003- 2008 obteniendo el grado de Cirujano Dentista. Egresada de la  
Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Periodoncia e Implantología.