



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE
LA SALUD

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES DE LA
PULPA DENTAL EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES
CEMENTO PORTLAND BLANCO Y NUSMILE NEOMTA®**

Tesis presentada por:

América Portillo Recio

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Directoras de Tesis:

DRA. EUGENIA DEL SOCORRO GUZMÁN MARÍN

DRA. ELMA MARÍA VEGA LIZAMA

Mérida, Yucatán, México, junio 2020



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

"Luz, Ciencia y Verdad"

Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud

PICSA/045/20

24 de junio de 2020.

A QUIEN CORRESPONDA

La tesis "Evaluación *in vitro* de células troncales de la pulpa dental en presencia de los materiales cemento Portland blanco y NuSmile NeoMTA[®]", presentada por la C.D. **América Portillo Reola**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

ATENTAMENTE

DR. JULIO CÉSAR TORRES ROMERO
COORDINADOR DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

c.c.p. Archivo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi abuelita Rafaela[†], por su apoyo y motivación para superarme en todos los aspectos. A mis Padres Julia y Pedro por dirigirme en el camino correcto y brindarme su apoyo incondicional, a mis hermanos y primos: Valeria, Hernán, Delia, Daniela, Diana, Yuli, Paco, Maru y Cithla por su ayuda y comprensión, a mis tías Mónica y Cruz por su apoyo y cariño incondicional, a mis amigos y colegas que hicieron más ameno este camino y a Edzel, por creer en mí y estar presente, tu apoyo ha sido fundamental.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al comité tutorial, Dra. Karla Acosta, Dr. Ricardo Peñaloza, Dr. Juan Cauich, Dra. Nayeli Rodríguez, Dra. Matilde Jiménez y Dr. Gabriel Alvarado, por su valioso tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo, así como las observaciones para la mejora de este documento.

A mis directoras de tesis, Dra. Elma Vega y Dra. Eugenia Guzmán por sus consejos, paciencia, conocimiento transmitido y apoyo incondicional para la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Glendy Polanco, Dra. Luz Alcántara, Q.F.B. Karla Amaya, Dr. Enrique Reyes, Dr. Hernán Villanueva y Técnico Felipe Barredo, por su valioso tiempo y orientación metodológica brindada para la realización de este trabajo de tesis.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” y de la Facultad de Odontología de la UADY, por su amistad, su apoyo y motivación para la realización de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del posgrado.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (Clínica de Cirugía, Laboratorio Traslacional de Células de Origen Bucal, proyecto PAIIFO 2016-0008), en el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (Laboratorio de Cultivo Celular del Área de Biomateriales, proyecto CONACYT 248378), en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” (Laboratorio de Biología celular), en la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (Laboratorio de Biomedicina Molecular, proyecto CONACYT 2092).

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
III.	ANTECEDENTES	5
IV.	OBJETIVOS	20
V.	HIPÓTESIS.....	21
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
VII.	RESULTADOS	39
VIII.	DISCUSIÓN.....	52
IX.	CONCLUSIONES.....	63
X.	PERSPECTIVAS	64
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
XII.	ANEXOS	76

I. RESUMEN

Se ha demostrado que los cementos de silicato tricálcico propician un microambiente de calcio extracelular abundante, lo que ayuda a la activación de genes odonto/osteogénicos determinantes en la regeneración del complejo dentino pulpar y consecuente diferenciación de las células troncales hacia un linaje odontogénico. El estudio de las células troncales de la pulpa dental (CTPD) en contacto con estos biomateriales, es la clave para una correcta aplicación terapéutica. Con el objetivo de contribuir y ampliar el conocimiento en este campo, la propuesta de investigación se basó en evaluar la proliferación y diferenciación dentinogénica *in vitro* de las CTPD en contacto con los cementos de silicato tricálcico: cemento Portland blanco modificado con óxido de zirconia (CPBOZ), cemento Portland blanco modificado con sulfato de bario (CPBSB) y el material NuSmile NeoMTA[®]. La fase inicial de la metodología consistió en la extracción de los órganos dentarios (extraídos por motivos ajenos a esta investigación) y el aislamiento y caracterización de las CTPD. Posteriormente, las CTPD se cultivaron en interacción con los materiales de estudio y se utilizó un colorante a base de resazurina para la medición de la proliferación celular, a los tiempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas; posterior al ensayo de proliferación celular, las células se tiñeron con coloración de Giemsa[®] para el análisis de la morfología celular para el análisis de expresión de la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP, indicativa del linaje dentinogénico) se obtuvieron extractos totales de proteínas obtenidas de la interacción de las CTPD en medios de cultivo con los materiales de estudio (extractos), en interacción durante 7 y 14 días, analizados por medio de la técnica western blot. Para minimizar las limitaciones de los ensayos *in vitro*, se realizó una prueba de hemocompatibilidad con los materiales de estudio y se contabilizó el porcentaje de hemólisis. Los resultados arrojaron que estos cementos tienden a mejorar la proliferación celular, respecto al grupo control sin tratamiento ($p < 0.05$). La inmunodetección de la DSPP reveló bandas positivas en los materiales CPBOZ y en el NuSmile NeoMTA[®], por lo que se puede concluir que estos materiales mejoran la diferenciación hacia un linaje dentinogénico. La banda esperada era de 110 kDa, sin embargo, las bandas positivas en este estudio correspondieron a otros pesos moleculares, lo que puede evidenciar que la proteína DSPP presenta cambios postraduccionales importantes y refuerza la teoría de las isoformas de ésta, al ser hidrolizada en DSP-DGP-DPP. Los materiales de estudio no tuvieron potencial hemolítico a excepción del CPBSB en concentraciones del 20%; el material más hemocompatible fue

el CPBOZ al 10%. La morfología celular no fue alterada con los materiales de estudio. Podemos concluir que ninguno de los materiales de estudio es citotóxico, y tienden a mejorar la proliferación celular sin embargo; debido a los hallazgos, el CPBOZ presentó mejores características de biocompatibilidad *in vitro* y es un potencial candidato para emplear en la terapéutica endodóntica.

II. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad crónica, multifactorial que afecta a los tejidos duros de los órganos dentarios, resultante de una compleja interacción entre el huésped, la producción de metabolitos bacterianos y los carbohidratos presentes en la saliva; afecta a cerca del 100% de la población según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El factor etiológico principal son las bacterias, por lo cual se considera como una enfermedad infecciosa que en etapas avanzadas puede ocasionar la pérdida de los órganos dentarios, por consiguiente, limita funcional, fonética y estéticamente a quienes la padecen, e incluso puede llegar a provocar infecciones sistémicas potencialmente mortales y dolores incapacitantes, ya que los patógenos de la caries originan patologías pulpares y periapicales. (1–4)

Las patologías pulpares y periapicales a consecuencia de caries avanzadas o traumatismos ameritan un tratamiento especializado, los cuales son dominio de la endodoncia, rama de la odontología que se encarga del estudio de la morfología, biología y fisiopatología de la pulpa dental y los tejidos periapicales, cuyo objetivo principal es la preservación de los órganos dentarios a través de la desinfección y sellado tridimensional de los conductos radiculares. Algunos tratamientos endodónticos convencionales, involuntariamente originan una pérdida significativa de dentina, debilitando la estructura dental remanente y aumentando el riesgo de una fractura postoperatoria que se ultime en la extracción dental. La desvitalización pulpar origina una pérdida de humedad y presión intersticial, incapacitando al diente a responder ante reinfecciones, lo cual se agrava cuando se produce en órganos dentarios con formación radicular incompleta, ya que se inhibe la formación y maduración correcta del órgano dentario. (5–7)

Investigaciones actuales en endodoncia, perseveran en ampliar sus estrategias para minimizar las consecuencias desfavorables de algunos tratamientos endodónticos convencionales; en respuesta ha surgido la endodoncia regenerativa, campo emergente de la ingeniería tisular, que ofrece resultados prometedores y sostiene entre sus objetivos principales, la regeneración del complejo dentino pulpar. Para ayudar a lograr este propósito, se deben realizar estudios que evalúen las interacciones entre los biomateriales emergentes y las células troncales dentales, ya que dichas interacciones abren las puertas a diseñar protocolos de regeneración, que permitan la restauración de los tejidos dañados

o perdidos; así pues, para poder reproducir y controlar este proceso de formación tisular, primero debemos entender cómo se producen estos mecanismos a nivel celular y molecular. (8–10)

Los órganos dentarios son una fuente abundante y accesible de células troncales; su extracción y aplicación en contacto con biomateriales, ha permitido mejorar el entendimiento de los protocolos clínicos de regeneración endodóntica y favorecer la creación de nuevos, necesarios y pertinentes ante la alta demanda de pacientes con enfermedades pulpares y periapicales (tan solo en la Facultad de Odontología de la UADY asisten en promedio 1000 pacientes al mes, de los cuales el 20% requieren tratamiento endodóntico). (11–13)

Investigaciones *in vitro* han revelado la importancia que adquieren los biomateriales endodónticos en la regeneración del complejo dentinopulpar, así como también en la mejora de la actividad de las células troncales de pulpa dental (CTPD) encaminada hacia una diferenciación dentinogénica. Entre dichos agentes destacan el cemento Portland (de constitución muy similar al mineral trióxido agregado [MTA] y que tiene otras utilidades en escenarios no odontológicos, e incluso posee un menor costo a comparación con el MTA) y el NuSmile NeoMTA®; este último cemento recientemente lanzado al mercado, según el fabricante, posee propiedades superiores a los MTA convencionales y a un menor costo. (14–19)

Por todo lo anterior y con el objetivo de evaluar si los materiales cemento Portland y NuSmile NeoMTA® son candidatos potenciales para utilizarse en terapias de regeneración endodóntica con CTPD, se realizó esta investigación para evaluar *in vitro* si dichos cementos permiten la proliferación de las CTPD e inducen la diferenciación dentinogénica.

III. ANTECEDENTES

3.1. Endodoncia regenerativa

La rama de la Odontología que se dedica al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulpares y periapicales es la endodoncia, cuyo objetivo principal es la conservación de los órganos dentarios dentro de la cavidad bucal, a través de la desinfección y sellado tridimensional del sistema de conductos radiculares. Para ayudar a lograr este objetivo, la ciencia endodóntica ha incorporado notables avances científicos, entre los cuales destacan, el estudio de biomateriales endodónticos y el progreso en la investigación de la biología pulpar. Estos conocimientos permiten a los endodoncistas estar al frente del novedoso campo de la endodoncia regenerativa, uno de los mayores desarrollos de la Odontología actual, que unifica la ciencia endodóntica y la ingeniería tisular. (20–23)

El concepto de ingeniería tisular fue acuñado por Charles Vacanti y Robert Langer en el año de 1993. De acuerdo con estos investigadores, la ingeniería tisular es una interdisciplina que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular y se encuentra íntimamente ligada con la medicina regenerativa. La medicina regenerativa, a su vez, es la rama de la medicina que se encarga de estudiar las terapias con células troncales, con el objetivo de restaurar funciones, corregir defectos, traumas o envejecimiento. Durante los últimos años, este campo ha experimentado un gran progreso, ya que resulta una fuente interesante de tratamientos para distintas patologías. En la ingeniería de tejidos, se busca cultivar células con factores de crecimiento, donde se pueda desarrollar un tejido artificial que pueda ser trasplantado a un receptor. Los componentes principales de la ingeniería tisular son las células, los biomateriales y los factores de crecimiento. (24–26)

Utilizando los principios de la Ingeniería Tisular, la endodoncia regenerativa ha desarrollado protocolos clínicos de gran impacto en la regeneración de dientes con desarrollo radicular incompleto, a consecuencia de caries o traumatismos dentales. Estos protocolos disminuyen el riesgo de fractura y mejoran el pronóstico del diente a largo plazo.

El tratamiento tradicional para tratar dientes inmaduros con pulpas no vitales se basaba, casi exclusivamente, en la aplicación del material hidróxido de calcio para lograr la apexificación (barrera mineralizada apical), con la intención de mantener la obturación endodóntica en su sitio. El principal inconveniente de este procedimiento era que no se lograba la obliteración de las paredes radiculares, de manera que se implementó una modificación de dicho protocolo, la apexificación por medio de un tapón apical con MTA, la cual es más práctica, pero tampoco engrosa las paredes. Fue entonces cuando surgió el protocolo de regeneración endodóntica de para dientes inmaduros no vitales. Este protocolo cumple con los 3 componentes principales de la ingeniería tisular: las células troncales provenientes de la papila apical, el biomaterial o el andamio (cuyo material más utilizado es el MTA) y los factores de crecimiento, que en este caso provienen del plasma y fibrina rica en plaquetas, del coágulo realizado intencionalmente durante el protocolo clínico de regeneración o revitalización endodóntica. (27–32)

A pesar de la reciente aplicación de protocolos de regeneración endodóntica, los investigadores Nygaard Ostby y Hjortdal demostraron el crecimiento de tejido conectivo intrarradicular en un diente necrótico en el año 1961. A partir de ese momento, se iniciaron estudios para mejorar los resultados biológicos viables. Fue en años recientes, gracias al desarrollo de biomateriales endodónticos y al descubrimiento de las células troncales pulpares (Gronthos y cols. 2003), cuando fue posible estandarizar protocolos clínicos útiles para la regeneración endodóntica. En el caso de la revitalización endodóntica de dientes inmaduros, se ha logrado corroborar que existe la formación de nuevos tejidos conectivos blandos, vasos sanguíneos y tejido mineralizado similar a la dentina. Esto se logra gracias a la diferenciación de las células troncales de la papila apical, que son precursoras de tejidos periapicales, por lo que el tejido neoformado es de tipo “cementoide y osteoide”, sin embargo, no se trata de dentina organizada. (28,33,34)

Actualmente la endodoncia regenerativa centra sus esfuerzos en la regeneración del complejo dentinopulpar y raíces incompletas, así como en la creación de biodientes que reemplacen a los implantes dentales. La Asociación Americana de Endodoncia mediante el comité de endodoncia regenerativa, definió a la regeneración endodóntica como un “procedimiento biológico diseñado para reemplazar tejidos dentales dañados, incluyendo a la dentina y estructuras radiculares, así como células del complejo dentinopulpar”. Cabe mencionar que este Comité entró en vigor desde el año 1996, pero no fue sino hasta el

2012 cuando se agregó como parte de la terminología de la Asociación Dental Americana. Entre los avances más significativos en este campo están las investigaciones de revascularización pulpar, la terapia de células troncales postnatales, la implantación de andamios pulpaes, la impresión tridimensional celular y la terapia génica. (8,9,35)

3.2. Complejo dentinopulpar

El complejo dentinopulpar (figura 1) está conformado por dentina y pulpa, tejidos que comparten un origen embriológico, histológico y funcional. La composición de la dentina es de un 30% de materia orgánica y agua y un 70% de materia inorgánica; la pulpa dental está constituida por un tejido conectivo vascularizado que llena todo el interior del órgano dentario, cuyo estroma conjuntivo laxo es su sostén. La pulpa y la dentina se unen por prolongaciones odontoblásticas y túbulos dentinarios, alrededor de los cuales se encuentra una sustancia intersticial orgánica que conforma la dentina tubular. La predentina, es la dentina más cercana a la pulpa y se encuentra en constante formación y modificación durante toda la vida. (36)



Figura 1. Microfotografías del complejo dentinopulpar (SEM 7000:1, prepublicación "Visual Biology in Dental Medicine" de publicaciones Quintessence)(37)

En la pulpa podemos encontrar distintas zonas, iniciando desde la dentina donde se encuentra una zona rica en odontoblastos, axones amielínicos terminales y capilares, que

en conjunto con las fibras de Von Korff constituyen la membrana Eboris. La siguiente zona pulpar es la subodontoblástica, que incluye al plexo subodontoblástico de Raschkow, conformada principalmente por fibroblastos, capilares sanguíneos y pocos elementos celulares. Más abajo encontramos la zona rica en células, con fibroblastos, células mesenquimales y macrófagos. La siguiente zona es conocida como central y está compuesta por tejido conectivo laxo, troncos nerviosos y vasculares. (36)

La matriz inorgánica de la dentina está compuesta por cristales de hidroxiapatita más pequeños y delgados que los cristales del esmalte; en este sentido son más similares a los cristales presentes en el hueso. Los cristales se orientan de forma paralela a las fibras colágenas, además de encontrarse fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligoelementos, como flúor, cobre, zinc, hierro y magnesio entre otros. (38–40)

La matriz orgánica de la dentina está compuesta en un 90% de colágeno y un 10% de proteínas no colágenas, principalmente una familia de glucoproteínas fosforiladas de la matriz que se conocen como SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein o proteínas con el tripéptido RGD, relacionadas con la integrina). Estas proteínas también se encuentran en tejidos biomineralizantes como el hueso y el cemento y también comparten reguladores de formación y señalizadores tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento tumoral alfa ($TGF-\alpha$), $IL-\beta 1$, etcétera. A pesar de las similitudes entre las matrices de mineralización de los distintos tipos de tejido óseo, existe una diferencia notable del tejido dentinogénico, la proteína DSPP (sialofosfoproteína dentinaria), cuyo gen del mismo nombre codifica para la sialoproteína y la fosfoproteína dentinaria; es específica de los odontoblastos y se encuentra mayormente en tejidos que conforman el complejo dentinopulpar. (38,39,41)

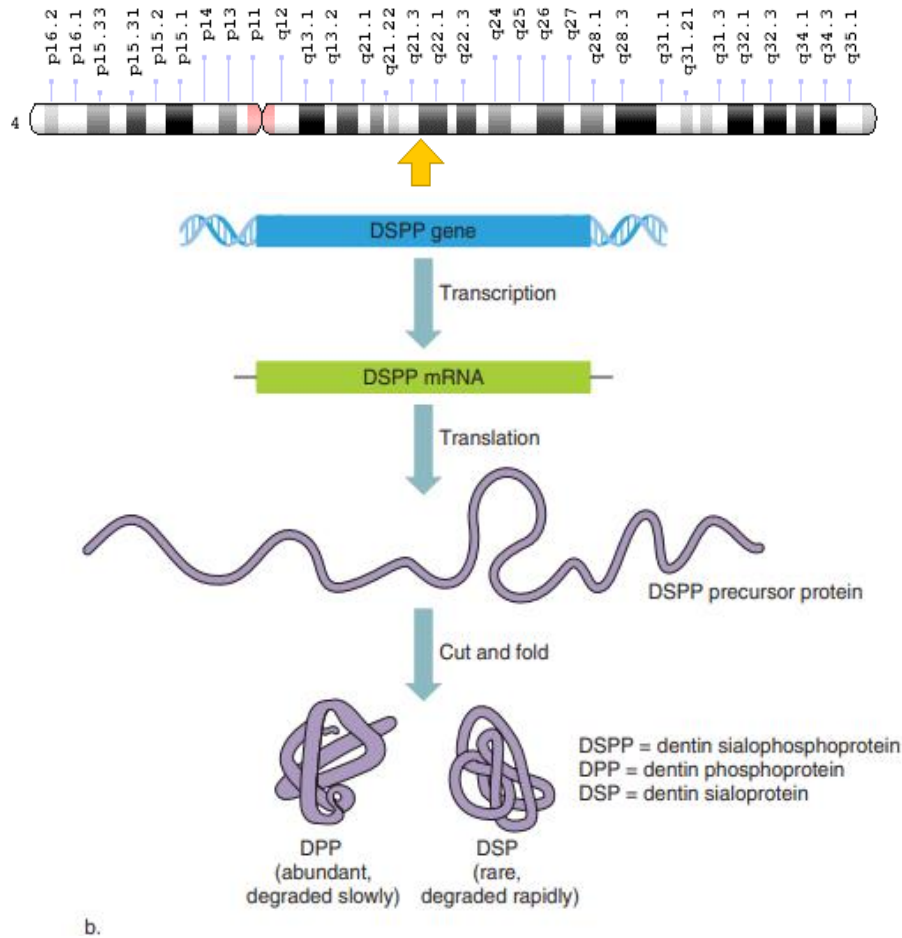


Figura 2. Representación gráfica del gen DSPP y su protocolización en DPP Y DSP (créditos a la página de decoración genómica del NCBI y al libro *Human Genetics* de Ricki Lewi, McGraw Hill) (42)

El gen DSPP, localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4q21.3), codifica la proteína DSPP (figura 2). Poco después de ser sintetizada, esta proteína se divide en dos proteínas más pequeñas, la sialoproteína dentinaria (DSP) en el extremo amino terminal y la fosfoproteína dentinaria (DPP) en el extremo carboxilo terminal. A mitad de la secuencia se encuentra una pequeña proteína llamada glicoproteína dentinaria (DGP, por sus siglas en inglés). Se considera que la DSPP es sintetizada en su totalidad como proteína precursora y procesada proteolíticamente en DSP, DGP y DPP, por proteasas como la proteína morfogenética-1 (BMP-1, por sus siglas en inglés). La expresión del gen DSPP se asocia con dentinogénesis y ocurre posterior a la formación de matriz colágena de la preentina. La DSP y la DPP, son proteínas expresadas abundantemente en los odontoblastos y se consideran indicativos de odontoblastos maduros. Bégue-Kirn y cols.

relacionaron a esta proteína exclusivamente con los odontoblastos, aunque Álvares reportó posteriormente que se puede encontrar en otros tipos de tejidos. (43)

3.3. Células troncales

Las células troncales se forman durante etapas tempranas del desarrollo embrionario y se caracterizan por ser totipotenciales, es decir que a partir de ellas se pueden generar todos los linajes celulares del organismo adulto y por poseer una capacidad ilimitada para dividirse manteniendo sus mismas características. (44,45)

Las células troncales evitan un crecimiento descontrolado (asociado con procesos tumorales) por medio de homeostasis de proliferación y diferenciación. Estas células se encuentran muy activas durante el desarrollo humano, sin embargo, en la edad adulta se encuentran en estado de quiescencia o reposo, lo cual las protege de agresiones externas físicas, químicas o de envejecimiento celular. En conjunto las células troncales se auto regulan y auto mantienen. Existen varios tipos de células troncales entre los que se encuentran las embrionarias o fetales, adultas, amnióticas y las pluripotentes. (44,45)

3.4. Células troncales de la pulpa dental (CTPD)

Entre las células troncales adultas se encuentran las de la pulpa dental, que es un tejido conectivo blando dentro del órgano dentario. Se considera que la extracción de células troncales de la pulpa dental es un procedimiento no invasivo, comparado con otras áreas de extracción, ya que se aíslan de órganos dentarios que normalmente serían desechados posterior a su extracción. (46)

La pulpa dental contiene células troncales mesenquimales definidas como células troncales de la pulpa dental (por sus siglas, CTPD), las cuales están contenidas en dientes humanos primarios y permanentes. Otras fuentes de células troncales dentales son los órganos dentarios deciduos (por sus siglas en inglés, SHEDs), la papila apical (SCAPs), el ligamento periodontal (PDLSCs) y el folículo dental (DFPCs). (46)

Las CTPD pertenecen a un grupo de células postnatales. Su linaje está comprometido hacia odontoblastos u otras células similares a las células nerviosas. Se

caracterizan por poseer una capacidad ilimitada de autorenovación, así como por una posición de pasividad en una pulpa sana. Durante la mitosis, estas células se dividen en nuevas células troncales. Las células troncales hijas, con menor capacidad de autorenovación, se caracterizan por una gran actividad proliferativa y generan las células diferenciadas, tales como osteoblastos, odontoblastos, condrocitos y células nerviosas. La dentina de reparación es una respuesta de las CTPD ante agresiones externas. Esto sucede porque la muerte de los odontoblastos estimula una cascada de señalización en la matriz extracelular, de tal manera que estimula la proliferación y diferenciación de las CTPD, ultimando a la formación de una nueva generación de odontoblastos. (47,48)

Las CTPD pertenecen al grupo de células troncales de origen mesenquimal (MSC, por sus siglas en inglés). La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) dictaminó 3 criterios para caracterizar a las MSC, a saber:

1. Morfología fibroblastoide y adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo
 2. Expresión de antígenos de superficie específicos positivos a CD73, CD90, CD105 y negativos a los marcadores de células hematopoyéticas (CD45 y CD34)
 3. Capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos.
- (49)

Es importante mencionar que las MSC no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) y expresan constitutivamente bajas cantidades de moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MHC I); esta característica posiciona a las MSC prácticamente indetectables al sistema inmune, ya que estas moléculas son las responsables de que los linfocitos rechacen los tejidos trasplantados y detecten elementos extraños. (50)

Por todo lo anterior, las CTPD representan una indiscutible fuente de terapias para la medicina regenerativa; a continuación, se describen algunas aplicaciones de las CTPD:

1) Regeneración pulpar. En orden de poder crear pulpa funcional, se debe considerar que el tejido regenerado debe estar vascularizado, incluso desde el foramen. Los odontoblastos recién diferenciados, deben existir en forma de dentina en las paredes del espacio radicular y finalmente, la dentina debe ser producida por los odontoblastos diferenciados de la dentina existente. (25,46)

2) Reconstrucción dental. Un diente perdido que tenga funcionalidad biológica debe incluir

la regeneración de la raíz y del ligamento periodontal, con nervios y vasos sanguíneos. (25,46)

3) Neurología. La pulpa dental también ha sido propuesta como terapia para nervios periféricos dañados. Inicialmente las células pulpares fueron trasplantadas en un gel de colágeno e infundidas dentro de un tubo de silicona que se reposicionó a 7 mm de la brecha de la rama del nervio facial de ratas. Las células troncales formaron vasos sanguíneos y tejido de mielinización, que contribuyeron a la regeneración neuronal. (25,46)

4) Angiogénesis y vasculogénesis. Las células troncales pulpares pueden ser utilizadas para estimular la vasculogénesis como un tratamiento para la enfermedad isquémica. (25,46)

5) Endocrinología. La terapia celular para enfermedades del hígado requiere una derivación hematopoyética de las células troncales. Las células troncales de la pulpa dental se han logrado diferenciar exitosamente en hepatocitos. (46)

A pesar de la revolución científica que representan las células troncales mesenquimales para la medicina, aún existen mecanismos de interacción entre mediadores de inflamación y procesos patológicos que aún no han sido totalmente comprendidos. (50)

3.5. Biomateriales en endodoncia regenerativa

Uno de los problemas más importantes a resolver por la endodoncia regenerativa, es la implementación y mejoramiento de biomateriales que impacten positivamente en la regeneración de tejidos pulpares y periapicales. La Sociedad Europea de Biomateriales realizó un consenso en 1992, donde definió al biomaterial como “material destinado a formar una interfase con los sistemas biológicos para evaluar, medicar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del organismo”. En ese mismo consenso realizado en Ámsterdam, introdujeron a los biomateriales de tercera generación, diseñados con el objetivo de “estimular a nivel molecular la proliferación y la organización de la matriz extracelular natural (scaffold),” que permita el desarrollo de la ingeniería de tejidos (*in vitro*) y la regeneración de tejidos (*in vivo*). Las propiedades de los biomateriales y la respuesta celular son factores de suma importancia para lograr la regeneración tisular guiada en el sistema de inserción pulpar y periapical. (51,52)

Entre los mayores avances científicos en el campo de la endodoncia regenerativa, se encuentra el desarrollo de los biomateriales de tercera generación. Estos materiales promueven la integración tisular, por medio del direccionamiento controlado de los procesos inflamatorios y de reparación tisular. Como ejemplo de biomateriales de tercera generación, podemos citar a los vidrios bioactivos y a los biomateriales de soporte para ingeniería de tejidos, que influyen en el proceso inflamatorio y modulan la regeneración tisular del sistema de inserción dental (cemento, periodonto y cortical ósea). (53)

Los biomateriales endodónticos son principalmente cementos de silicato tricálcico compuestos por un polvo y un líquido que al mezclarse forman una pasta que endurece o fragua a cierto tiempo y temperatura y se une a una superficie. El cemento dental es un producto de una reacción química entre un ácido y una base, los más comunes son los óxidos y los hidróxidos. En la endodoncia los cementos no solamente sirven como agentes cementantes, sino también como aislante térmico, químico y eléctrico de la pulpa dental. (54,55)

El biomaterial más ampliamente utilizado en los tratamientos endodónticos es el hidróxido de calcio Ca(OH)_2 , constituido por un polvo blanco que se forma por la calcinación del carbonato de calcio; tiende a formar carbonato con el anhídrido carbónico del aire. Presenta baja solubilidad y un pH alcalino de 12.4. Usualmente se prepara con solución fisiológica o agua estéril. El mecanismo de acción del hidróxido de calcio es la disociación iónica. La alcalinización producida induce el rompimiento de los enlaces iónicos de las proteínas de las bacterias, sin embargo, no limita su crecimiento en tejidos vivos, ya que la concentración de iones hidroxilo se ve reducida por la capacidad amortiguadora de la dentina, la cual presenta una alta tensión superficial, dificultando la entrada del Ca(OH)_2 a los túbulos dentinarios y no propicia un sellado marginal. (56–58)

En respuesta a las limitaciones del hidróxido de calcio, han surgido nuevos biomateriales para los protocolos clínicos endodónticos, entre los cuales destaca el mineral trióxido agregado (MTA), material derivado del cemento Portland (CP). El MTA fue descrito inicialmente por Lee y Torabinejad (1993), quienes afirmaron que este material contiene una composición química similar al CP a excepción de la adición del óxido de bismuto, que favorece la radiopacidad del material y mejores propiedades de manipulación. Los resultados de sus investigaciones arrojaron que tiene un comportamiento biológico similar

al CP y provee de una barrera física impenetrable al fraguar. El MTA fue aceptado por la FDA en 1998. Para 1999 fue lanzado al mercado bajo el nombre comercial de Pro Root MTA® por la casa comercial Dentsply®, siendo en principio un polvo gris. Posteriormente, en el año 2002 se comercializó como un polvo blanco. La diferencia entre el polvo blanco y el gris radica en que el polvo blanco contiene significativamente menos óxido de hierro. (18,59–61)

A pesar de las notables características del MTA en la práctica clínica, Aponte, Araki y Menezes coinciden en que el elevado costo del MTA frente al CP es una desventaja, ya que poseen una composición y utilidad clínica muy similar. Numerosos estudios se han llevado a cabo comparando la composición química del CP y del MTA. Camilleri, García Aranda y Rodríguez analizaron los elementos del CP, encontrando principalmente calcio, sílica y aluminio, con algunos elementos traza como el magnesio, el potasio y el sodio; en el MTA detectaron elementos traza como el fósforo, el cromo y el hierro, aun cuando los cementos eran blancos. Flores Aranda y cols., analizaron el CP blanco y el MTA Angelus® blanco con la técnica PIXE (técnica empleada para determinar la composición de los elementos de una muestra de material, por medio de emisión de rayos X inducida por protones, en un acelerador de partículas). Sus resultados fueron similares en cuanto a la composición de elementos traza en el CP blanco y en el MTA encontrando cromo, zirconia, hierro y manganeso; adicionalmente en el MTA hallaron cobre y estroncio. Concluyeron que los elementos principales (calcio, sílica y aluminio) se encuentran en porcentajes altos en ambos materiales. Los elementos férricos se hallaron en un bajo porcentaje, ya que ambos cementos analizados eran blancos, así como también hubo ausencia de la fase férrica, como se presenta en los cementos grises. Se encontró mayor cantidad, de sulfuros en el CP blanco que en el MTA, ausencia de sulfato de calcio en el MTA y ausencia de óxido de bismuto en el CP. En ambos materiales las fases mineralizantes fueron silicato dicálcico, silicato y aluminato tricálcicos. (61,62)

A nivel mundial, el CP funge como el cemento más común y de uso cotidiano. Fue creado por Koseph Aspdin en Inglaterra, en el año de 1824. Se compone principalmente fases impuras: fase alita (silicato tricálcico Ca_3SiO_5), fase belita (silicato dicálcico, Ca_2SiO_4), fase aluminada (aluminato tricálcico, $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$) y fase ferrítica (aluminoferrita tetracálcica, $\text{Ca}_2(\text{Al/Fe})\text{O}_5$) que contiene un 15% de iones de sustitución. Adicionalmente, alrededor de 5% del peso es yeso, CaSO_4 . Los silicatos tricálcicos del material constituyen alrededor del

75% del peso del CP; y al reaccionar con el agua pueden formar dos nuevos compuestos: el hidróxido de calcio y el hidrato de silicato de calcio. La fabricación del cemento ocurre en tres fases: preparación de la mezcla de la materia prima, producción del “Clinker” y preparación del cemento. La materia prima para la producción del CP consta de minerales que contienen 44% de óxido de calcio (CaO), 14.5% de óxido de silicio (SiO), 3.5% de óxido de aluminio (Al²O³), 3% de óxido de hierro (Fe²O³), 1.6% de óxido de magnesio (MgO). (63–69)

Existe una variación del CP, el CP blanco, producida al minimizar los componentes de hierro y manganeso. De esta variación se derivan algunos MTA como el ProRoot® blanco, al cual se le adiciona óxido de bismuto. El óxido de bismuto actúa como un agente de radiopacidad, el cual retrasa el proceso de hidratación, incrementa la porosidad y disminuye la resistencia mecánica y durabilidad de la matriz del cemento. Adicionalmente se ha reportado que el óxido de bismuto es tóxico para las CTPD. Existen alternativas a este elemento como el óxido de zirconia, el sulfato de bario y la tantalita, que se busca sean materiales radiopacificadores, bioinertes, biocompatibles, en adiciones que van del 10 al 20% y que excedan los 3mm de aluminio de radiopacidad según la norma ISO para selladores endodónticos (ISO 6876/2002). Estos agentes requieren de mayor concentración que el óxido de bismuto para lograr los mismos niveles de radiopacidad en los cementos, aunque Hungaro y cols. mencionaron que no existen diferencias significativas entre la radiopacidad de los cementos. (69,70)

El CP es radiográficamente poco visible, su radiopacidad es semejante a la dentina; posee un pH de 9, sin embargo, posterior a la hidratación, alcanza un valor de 12.3 a 12.9 lo que le confiere propiedades antimicrobianas y de biocompatibilidad. Estas características lo postulan como un cemento útil en aplicaciones clínicas endodónticas. Se ha demostrado la efectividad del CP en otras aplicaciones clínicas, tales como pulpotomías y cirugía periapical, debido a la capacidad de adhesión celular, que favorece la formación de tejido duro y blando. También se ha reportado que el cemento Portland no es tóxico y promueve la cicatrización ósea. Adicionalmente se ha comprobado su efectividad antimicrobiana ante cepas como el *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, sin ninguna efectividad contra *Escherichia coli*. Con todas estas características, el CP es una alternativa viable frente al MTA y demás cementos biocerámicos utilizados en la práctica endodóntica.

Sin embargo, es necesario profundizar en estudios de citotoxicidad y biocompatibilidad para analizar los riesgos de utilizarlos en seres humanos. (61,66,68)

El MTA es hoy por hoy el líder indiscutible de los materiales para terapias pulpares, gracias a sus propiedades bioactivas y no citotóxicas. A pesar de que inicialmente surgió como un material para cirugías periapicales, se han documentado con éxito diversos procedimientos durante 23 años, tales como pulpotomías, recubrimientos pulpares directos, apicogénesis, apicoformaciones, revascularizaciones pulpares y reparación de defectos dentales profundos. Aun así, presenta ciertas desventajas, como la pigmentación dental, lo cual es perjudicial si los dientes involucrados son anteriores. En pacientes pediátricos es de suma importancia contar con materiales prácticos, de fácil manipulación y fraguado. Para ello surgió un nuevo material en el mercado, el NuSmile NeoMTA®, que posee ventajas sobre otros tipos de MTA. Es de menor costo y resuelve, según el fabricante, varios de los inconvenientes de los MTA convencionales. (19)

El material NuSmile NeoMTA®, es un cemento biocerámico en forma de gel coloidal formado por la mezcla de un gel y polvo. Se indica principalmente para tratamientos pulpares en la odontología pediátrica y produce la precipitación de fosfatos cálcicos, promoviendo los puentes dentinarios. Está compuesto principalmente de silicato tricálcico, tantalita, silicatos dicálcicos, sulfatos de calcio y sílica, mezclado con un gel basado en agua. No provoca coloraciones y es compatible con restauraciones dentales como las coronas de zirconia y composite. (56)

Para la endodoncia regenerativa, el biomaterial ideal debe cumplir ciertas características:

1. Tener la capacidad de adaptarse al medio bucal sin ser afectado, es decir, presentar características reológicas de plasticidad, viscosidad dinámica y viscosidad de compresión que permita la adaptación a la compleja morfología radicular.
2. No modificar tridimensionalmente la anatomía radicular al fraguar.
3. Poseer propiedades antimicrobianas, por lo tanto, debe liberar sustancias que inhiban o neutralicen el crecimiento del biofilm endodóntico pulpar y periapical característico.
4. Lograr un adecuado sellado.

5. Biocompatible. No debe inducir toxicidad, mutagénesis, carcinogénesis o alguna otra reacción desfavorable al huésped.
6. Propiedades biocerámicas para su fácil manipulación y fraguado.
7. Propiedades mecánicas similares a los tejidos dentales, para poder soportar las cargas masticatorias y parafunciones, inclusive.
8. Bioactivos. Debe poder interactuar con el huésped, para inducir la diferenciación celular y propiciar la regeneración tisular pulpar y periapical.
9. Radiopacidad adecuada. (53,71)

En la búsqueda del biomaterial endodóntico ideal, los estudios “*in vitro*” que evalúen el comportamiento celular, son estrictamente necesarios, ya que es fundamental asegurarnos que los materiales que estarán en contacto directo con el paciente no generen toxicidad. Adicionalmente es necesario profundizar acerca de cómo interactúan con las células y como pueden producir una diferenciación favorable encaminada hacia una verdadera regeneración. Comúnmente se realizan cultivos celulares para poner en contacto los materiales investigados con los linajes celulares, con el fin de contabilizar tasas de proliferación celular y zonas de apoptosis. (71)

Las CTPD son consideradas las progenitoras de los odontoblastos, que son capaces de proliferar y diferenciarse hacia células odontoblásticas para producir nueva dentina. Las CTPD intervienen en el proceso de reparación del complejo dentino pulpar, a través de la diferenciación a odontoblastos. Se ha demostrado que los cementos de silicatos tricálcicos inducen la diferenciación de las CTPD, a través del proceso regulado por una compleja red de moléculas señalizadoras, vías, receptores y sistemas de control de transcripción. Las moléculas de señalización y la respuesta de las CTPD son los factores claves en la regeneración pulpar y en la dentinogénesis. (43)

3.6. Estudios de biomateriales endodónticos en CTPD

Desde que Kakehashi y cols. en 1965 realizaron el primer reporte confirmando que las bacterias son las causantes de la inflamación pulpar, la ciencia endodóntica se ha enfocado en lograr una desinfección óptima de los conductos radiculares. Durante años se han tratado las diversas patologías pulpares y periapicales, obteniendo con éxito la reparación de los daños tisulares, a través de la obturación tridimensional. Estos esfuerzos

han logrado restablecer la salud bucal a los pacientes afectados. Sin embargo, gracias al advenimiento de nuevas tecnologías y al desarrollo de biomateriales, se está cada vez más cerca de, no solo reparar las lesiones, sino de lograr una verdadera regeneración dental. La comunidad científica actual, no sólo se enfoca en comprender la interacción entre los biomateriales y los tejidos pulpares y periapicales en términos de biocompatibilidad histológica, sino que también se preocupa por entender el potencial de estos materiales para modular el tejido intervenido a nivel celular y molecular, utilizando el abordaje de las células troncales, encaminadas hacia una regeneración autóloga. (72–74)

Gronthos y Batouli confirmaron que las CTPD fueron capaces de diferenciarse hacia odontoblastos. Este grupo de odontoblastos expresó el gen de la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), indicador de la dentinogénesis. Adicionalmente, Wei y cols. demostraron que las CTPD aumentan la expresión del mRNA de DSPP y de fosfoglicoproteína de la matriz extracelular, que son indicadores diferenciales de la progresión celular en el linaje odontoblástico. (41,75)

Min y cols. evaluaron al CP como favorecedor de la mineralización en CTPD. Encontraron la expresión de mRNA de DSPP aumentada en contacto con el CP a diferencia del grupo control, por lo cual sugirieron que este cemento facilita la diferenciación a odontoblastos y la formación de dentina en pulpa dental. Wang y cols. evaluaron la citotoxicidad del CP en CTPD; sus resultados demostraron la biocompatibilidad celular por medio de ensayos de viabilidad. Sugieren al CP como un candidato potencial para la terapia pulpar y como un material coadyuvante para la regeneración pulpar. Mencionaron que los mecanismos de los efectos del CP permanecen inciertos. (76,77)

Ortolani presentó los resultados de su investigación en 2015; entre sus resultados mencionó que el cemento sellador AH PLUS (cemento endodóntico resinoso utilizado rutinariamente como obturador de tratamientos de conducto convencionales), presenta una alta toxicidad para las células troncales del ligamento periodontal, en comparación con el cemento MTA fillapex®, por lo que se deduce, que algunos de los cementos empleados día a día para sellar los conductos, no propician la regeneración dental, a diferencia de los cementos basados en silicatos tricálcicos. (78)

Huang y cols. realizaron un estudio para regenerar pulpa dental y dentina por medio de regeneración tisular guiada, utilizando CTPD y células troncales de la papila apical. Implantaron estas células en un andamio de poly-D, L-láctico-glicólico, insertado en fragmentos dentales y transplantados en ratones. Sus resultados mostraron que los conductos radiculares fueron ocupados por un tejido similar al pulpar *de novo*, con una vascularización bien establecida. Utilizaron un sellador de MTA y la dentina neoformada expresó el gen DSPP, indicando la posible diferenciación a odontoblastos. (79)

Diversos estudios han evaluado la viabilidad celular de las CTPD en presencia de cementos tricálcicos tales como Biodentine®, MTA Angelus®, OrthoMTA®, MicroMega MTA®, cemento Portland, Endocem® y no se hallaron diferencias significativas en cuanto la expresión de genes tales como el gen de DSPP. Aun es desconocida la razón por la cual los cementos tricálcicos inducen la diferenciación odontoblástica, sin embargo, se cree que es debido a la liberación de iones de calcio que activa la vía de señalización MAPK (Proteínas quinasas activadas por mitógenos). Ésta a su vez activa la expresión de mRNA de genes asociados a la diferenciación odontoblástica. Por otro lado, se ha reportado en estudios de expresión genética que los iones de silicio actúan como promotores odontoblásticos y están relacionados con el metabolismo, la síntesis de colágena, la mineralización ósea y en la formación de tejido conectivo. Adicionalmente estos estudios refieren que los materiales sílicos promueven la actividad osteoclastogénica. Los cementos tricálcicos están envueltos en la regulación de la mayoría de los genes que expresan para osteogénesis, dentinogénesis y reducen los niveles de mRNA de ciclooxigenasas y proteínas proinflamatorias de la pulpa dental. Por todo lo anterior podemos mencionar que los estudios que ponen en contacto CTPD con materiales derivados de silicatos tricálcicos han demostrado que existe un mayor nivel de activación génica, lo cual se puede traducir en una reparación más efectiva del complejo dentinopulpar. (14,43,80–86)

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro*, la respuesta y diferenciación dentinogénica de las células troncales de la pulpa dental (CTPD) en presencia de los materiales cemento Portland blanco y NuSmile NeoMTA®.

4.2. Objetivos específicos

1. Establecer un cultivo primario de células troncales procedentes de pulpa dental y caracterizar su origen mesenquimal.
2. Evaluar el efecto del cemento Portland blanco (modificado con sulfato de bario u óxido de zirconia) y del NuSmile NeoMTA® sobre la proliferación de las células troncales de pulpa dental (CTPD).
3. Evaluar el efecto del cemento Portland blanco (modificado con sulfato de bario u óxido de zirconia) y del NuSmile NeoMTA® sobre la morfología de las células troncales de pulpa dental (CTPD).
4. Evaluar el efecto del cemento Portland blanco (modificado con sulfato de bario u óxido de zirconia) y del NuSmile NeoMTA® sobre la diferenciación dentinogénica de las células troncales de pulpa dental (CTPD) mediante la expresión de la proteína DSPP.
5. Determinar la hemocompatibilidad de los materiales de estudio.

V. HIPÓTESIS

El cemento Portland blanco modificado con óxido de zirconia, o con sulfato de bario y el cemento NuSmile NeoMTA®, mejoran la proliferación de las células troncales de la pulpa dental, son hemocompatibles e inducen la diferenciación dentinogénica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tipo y diseño del estudio

Descriptivo, transversal, experimental y prospectivo.

6.2 Diagrama metodológico

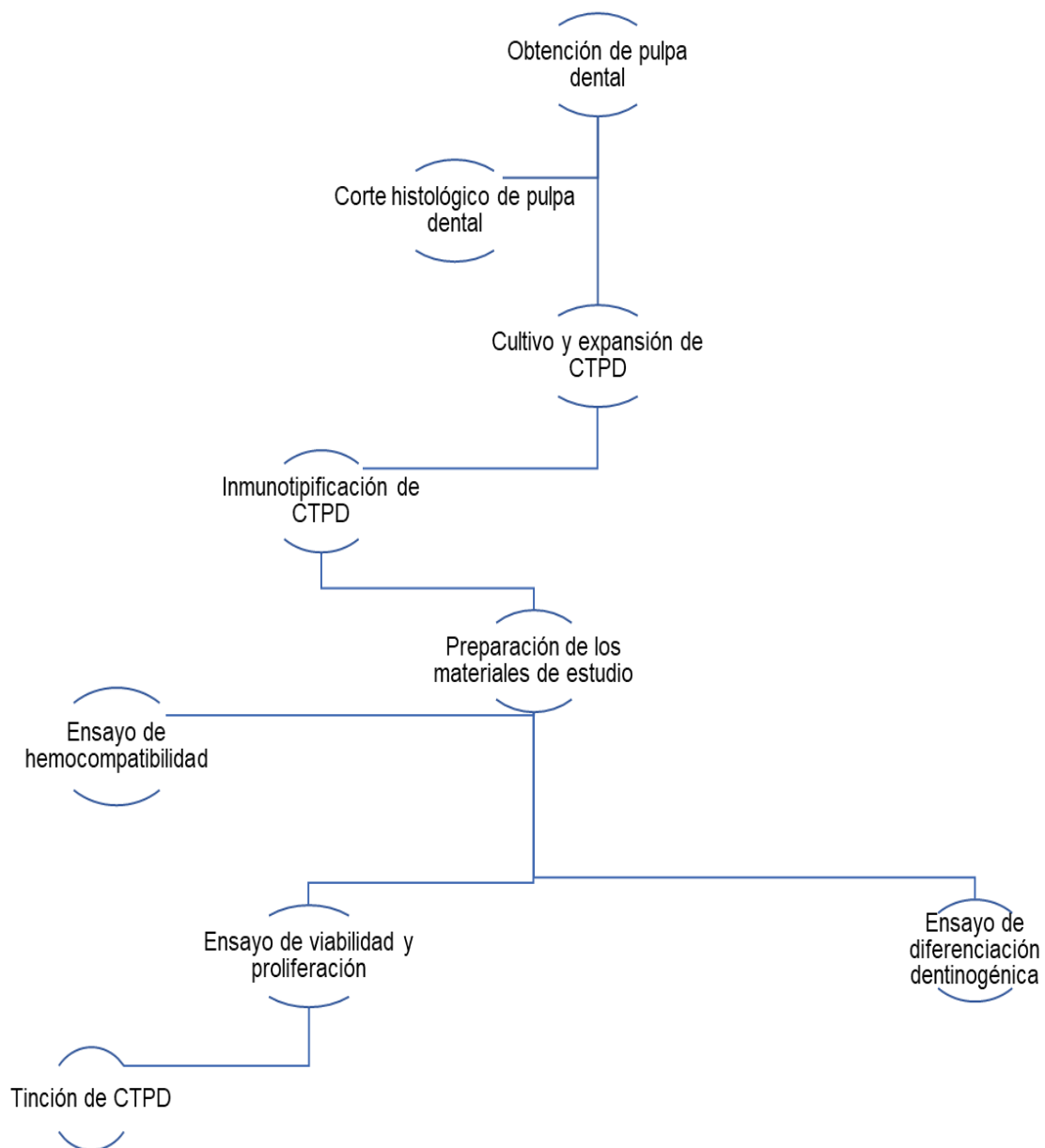


Figura 3. Diagrama del diseño experimental y metodología.

6.3 Obtención de pulpa dental

El cultivo celular primario de células troncales de pulpa dental se obtuvo a partir de pulpa dental de órganos dentarios extraídos. Se realizaron dos extracciones (por motivos ortodónticos, ajenos a este proyecto) de órganos dentarios con estructura coronaria íntegra, de pacientes que aceptaron donarlos a través de un consentimiento informado (Anexo 1) y de un consentimiento informado perteneciente al Proyecto FODO-2019-0008. Las exodoncias fueron realizadas por odontólogos de la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la UADY, utilizando el siguiente protocolo:

1. Asepsia y antisepsia del campo operatorio con Microdacyn 60®.
2. Aplicación de anestesia con lidocaína/epinefrina al 2%.
3. Debridación con explorador y periostótomo.
4. Luxación con elevador recto número 3 y fórceps (figura 4).
5. Control de la hemostasia con gasa a presión.
6. Medicación postoperatoria (antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios). El seguimiento clínico postquirúrgico se realizó evaluando el estado general, el aspecto de la herida y de la zona intervenida, el sangrado y el exudado.

Inmediatamente tras la extracción, los órganos dentarios se depositaron en solución salina (figura 5) y fueron trasladados al Laboratorio Traslacional de Células de Origen Bucal de la Facultad de Odontología de la UADY, en donde se realizó la odontosección, con la técnica horizontal (corte en la unión amelocementaria) con turbina de baja velocidad (Micromotor MDC III®, México) a 25 000 rpm, bajo irrigación continua con solución salina, en la campana de bioseguridad de flujo laminar vertical (DCB 1200V Ulbrecht®, México). Posteriormente se extrajo el contenido de la pulpa con lima número 15 (K File, Dentsply®, USA) y pinza estéril; se colocó en microviales con medio D-MEM estéril Gibco® (figura 5), suplementado con antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomina 100 µg/ml). Los microviales fueron colocados en una nevera con congelante y trasladados al Laboratorio de cultivo celular del área de Biomateriales del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY).

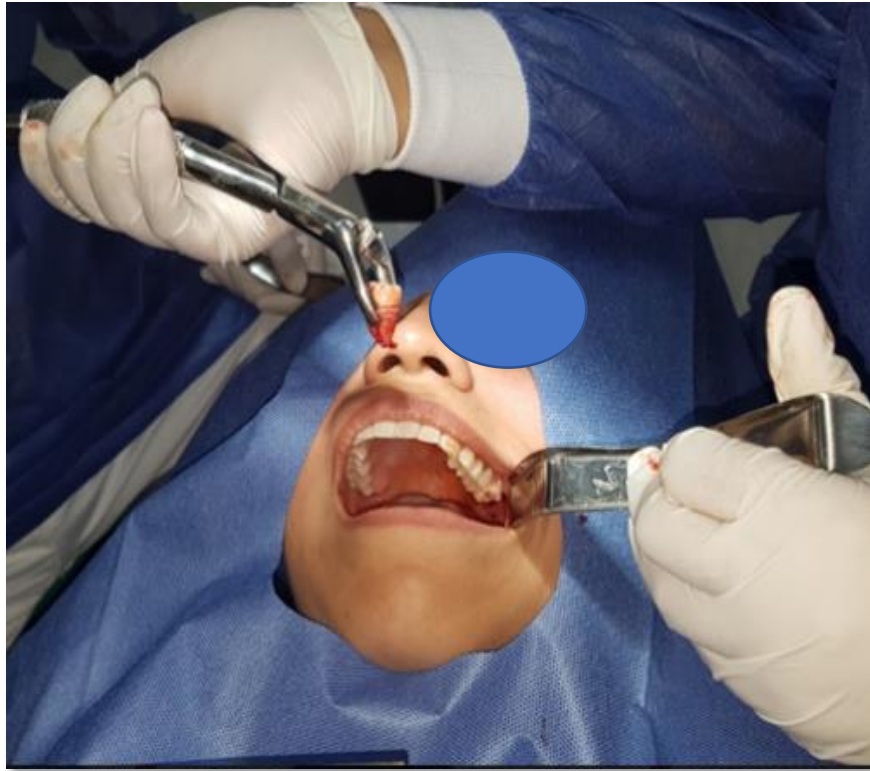


Figura 4. Extracción simple de órgano dentario.

q

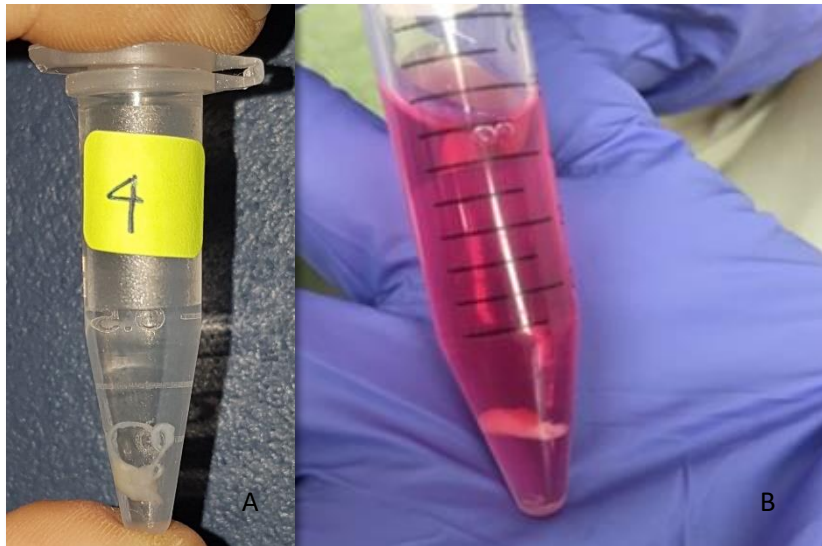


Figura 5. A. Pulpa dental colocada en solución fisiológica. B. pulpa dental colocada en medio de cultivo.

Tras la obtención del tejido pulpar de los órganos dentarios, se utilizó una muestra pulpar para la realización de corte transversal y fijación con tinción de azul de toluidina. La materia prima fue fijada en solución FAA (formaldehído, alcohol, acético) y deshidratada por medio de inmersión de alcoholes a distintas concentraciones. Las muestras deshidratadas se embebieron en la solución de infiltración de resina JB-4 (Sigma Aldrich, USA) y fueron cortadas en secciones de 8 μm en un micrótopo de rotación (Thermo Scientific® HM 325, USA) las cuales se adhirieron mediante calor a un cubreobjetos. La muestra seleccionada se tiñó con azul de toluidina al 2%. Para ello los tejidos se colocaron en contacto con el colorante durante 45 segundos. Posteriormente el exceso de colorante fue retirado mediante varios lavados con agua destilada y puesto a secar a temperatura ambiente. (87)

6.4 Cultivo y expansión de CTPD

La obtención de las células de la pulpa dental se realizó en una campana de flujo laminar horizontal (bioseguridad clase II, Air Science®, USA) bajo condiciones estériles. Previamente se preparó la solución de PBS (tampón fosfato salino solución madre 10X, con agua estéril 9:10) suplementada con 1% de solución antibiótica y antimicótica. Se preparó el medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich®, Alemania) y se le añadió 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO®, USA) con 1% de solución antibiótica y antimicótica. El medio de cultivo fue esterilizado por filtración con un filtro de 0.22 μm . Se preparó la colagenasa tipo I con 100 U/ml en medio D-MEM.

La pulpa dental (PD) se lavó con 5 ml de PBS en tres ocasiones para eliminar la sangre residual. Se realizó la disgregación mecánica con bisturí número 15 y así obtener fragmentos pulpares de aproximadamente de 1 mm^3 , los cuales se digirieron enzimáticamente con colagenasa tipo I y dispasa durante 90 minutos. El tejido digerido se centrifugó por 10 minutos a 220 RPM; se recogió el precipitado y la suspensión celular se sembró en medio D-MEM completo (suplementado con 10% de SFB, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, anfotericina B, penicilina y estreptomina) en botellas de cultivo tipo T de 25 cm^2 de superficie (figura 6). Una muestra pulpar sin disgregación enzimática también fue sembrada. (12)

Los cultivos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada (Binder, Alemania) para su proliferación. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 horas. Las células fueron observadas a diario durante 14 días, hasta obtener el 90% de confluencia. En ese momento las células se desprendieron con una solución de tripsina/EDTA al 0.25% para cultivarlas en dos botellas nuevas con medio de cultivo completo. Las células fueron expandidas por 7 días hasta alcanzar su máxima confluencia. Se obtuvieron aproximadamente 12 millones de células del cultivo primario realizado por digestión enzimática, las cuales fueron congeladas a -20°C en alícuotas con DMSO, hasta su utilización en las pruebas de caracterización inmunofenotípica y en los ensayos experimentales.

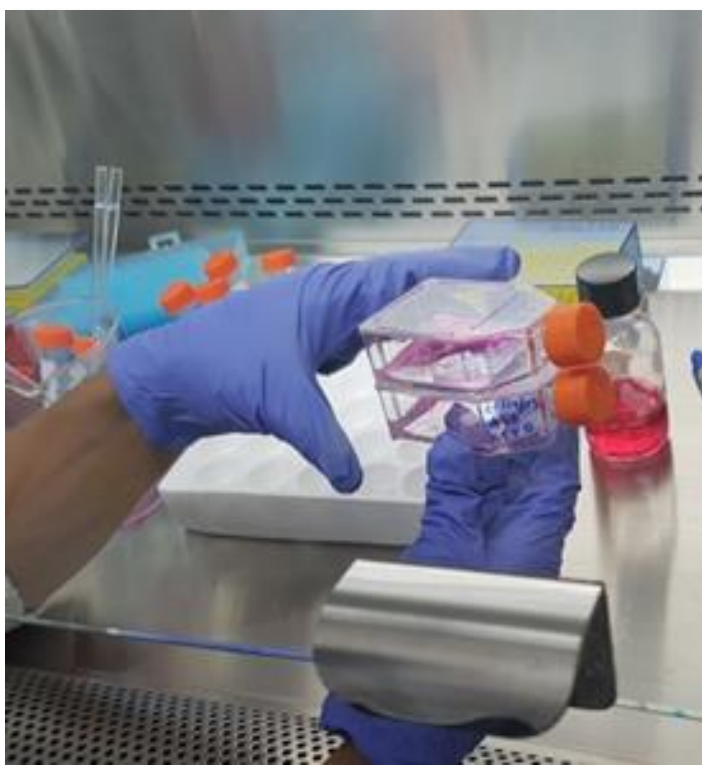


Figura 6. Botellas de cultivo con CTPD

6.5 Inmunotipificación de CTPD

Para la confirmación del linaje mesenquimal de las células empleadas en el proyecto, se realizó la técnica de identificación de marcadores de superficie por medio de citometría de flujo, la cual se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica

y Microbiología de la Facultad de Enfermería y Nutrición UASLP y del Laboratorio de Biomedicina Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (Proyecto CONACYT 2092).

La citometría de flujo constituye una técnica automatizada y altamente sensible para el estudio del inmunofenotipo de células mesenquimales. Este procedimiento permite realizar análisis multiparamétricos de los componentes celulares en suspensión, de una manera individual, célula a célula, a través de sus características fisicoquímicas, e identificación de la expresión de proteínas celulares. Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, que son detectados y visualizados mediante un sistema informático. (88)

Se emplearon células del cuarto pase del cultivo primario. Se tripsinizaron y contabilizaron con azul tripano y cámara de Neubauer (figura 7) y se fijaron con solución de paraformaldehído (PFA al 4%). Se obtuvieron dos viales de un millón de células cada uno. Los viales fueron almacenados en refrigeración hasta su utilización en las pruebas de inmunofenotipo.

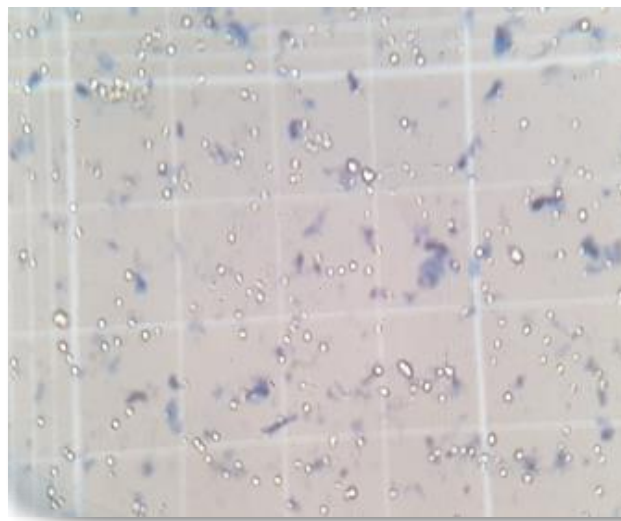


Figura 7. Contabilización de células en cámara de Neubauer.

Para la Inmunotipificación, los viales con las células previamente fijadas se centrifugaron en microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®, Alemania) a una velocidad de

13,000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 22 °C. Una vez obtenidas las pastillas celulares, se decantó el PBS+PFA y se realizaron 3 alícuotas de cada una de las pastillas. Cada alícuota contenía 190 µl de PBS y 2.5 µl de cada uno de los siguientes marcadores de superficie (BD Stemflow Bioscience®, USA):

- CD 45 conjugado a FITC/CD 34 conjugado a PE (Isotipo IgG₁, κ de ratón. #341071 BD Bioscience®, USA)
- CD 90 conjugado a PE (Isotipo IgG₁, κ de ratón albino. #55596 BD Bioscience®, USA)
- CD 105 conjugado a FITC (Isotipo IgG₁, κ de ratón albino. #561443 BD Bioscience®, USA)
- CD 73 conjugado a PE (Isotipo IgG₁, κ de ratón. #561014 BD Bioscience®, USA)
- 7AAD (#559925 BD Bioscience®, USA)

La gradilla con alícuotas de células/antígenos, se colocaron en agitación en termociclador (Thermo Mixer Eppendorf®, Alemania) a 950 rpm y 22 °C durante 10 segundos para homogeneización. La incubación se realizó durante 2 horas en oscuridad; las alícuotas fueron trasladadas al Laboratorio de Biomedicina Molecular del Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología (IPICYT), donde se utilizó el citómetro (FACS Calibur BD Bioscience®, USA). Se revisaron los niveles de los buffers del citómetro y una vez adecuados, se seleccionó la plantilla para panel de células mesenquimales BD validada (BD STEM CELL KIT®, USA). Se colocaron los 195 µl de cada muestra en tubos de poliestireno para citómetro (Trucount tubes, BD Bioscience®, USA) y se colocaron en el lector intercalando las lecturas con buffer de limpieza (FACSclean BD Bioscience®, USA). Se obtuvieron los datos por medio de gráfico de puntos con la información referente a la viabilidad y positividad al linaje mesenquimal de las poblaciones celulares analizadas.

6.6 Preparación de los materiales CPBOZ, CPBSB y NuSmile NeoMTA®

La preparación de extractos empleados en este estudio se realizó de acuerdo con lo establecido en la norma ISO 10993-12, con el objetivo de simular las condiciones en que los materiales interactúan y fraguan dentro del complejo dentinopulpar. Los materiales de estudio fueron cemento Portland blanco con adición de óxido de zirconia o sulfato de bario como agentes radiopacificadores y el NuSmile NeoMTA®. (89)

Cuadro 1. Materiales de estudio

Material	Tipo	Presentación
Cemento Portland blanco (Cruz Azul®, México) con óxido de zirconia al 10 o 20% (CPBOZ).	Biocerámico	Gel coloidal de silicato tricálcico. Preparación agua estéril y polvo proporción 3:1 con adición de óxido de zirconia o sulfato de bario.
Cemento Portland blanco (Cruz Azul®, México) con sulfato de bario al 10 o 20% (CPBSB).	Biocerámico	Gel coloidal de silicato tricálcico. Preparación agua estéril y polvo proporción 3:1 con adición de óxido de zirconia o sulfato de bario.
NuSmile NeoMTA®	Biocerámico	Gel acuoso con MTA purificado y sílica. Preparación del gel a base de agua y polvo indicaciones del fabricante.

Para la obtención de los extractos de los cementos, se mezclaron los materiales en loseta de vidrio y posteriormente colocados en dos cajas de 6 pozos hasta obtener 2 mm de grosor del material (figura 8). Cada pozo posee una superficie de 9.4 cm² y fueron distribuidos de la siguiente manera:

1. 1350 mg de cemento Portland + 150 mg de óxido de zirconia + 7 ml de agua estéril en cuatro pozos de placa de 6 pozos obteniendo un área de 37.6 cm² y 2 mm de grosor de material por pozo.
2. 1350 mg de cemento Portland + 150 mg de sulfato de bario + 7 ml de agua estéril en cuatro pozos de placa de 6 pozos obteniendo un área de 37.6 cm² y 2 mm de grosor de material por pozo.
3. 2 cucharillas de 1 g de NuSmile NeoMTA® + gel (8 gotas del gotero de gel NuSmile NeoMTA®) en 4 pozos de placa de 6 pozos obteniendo un área de 37.6 cm² y 2 mm de grosor de material por pozo.

Las placas con los materiales se dejaron fraguar durante 24 horas y posteriormente se esterilizaron con luz ultravioleta en campana de bioseguridad, 30 minutos por cada lado (figura 9). Una vez estériles, se cubrieron con medio de cultivo completo (3 ml por pozo) y se colocaron en la incubadora humidificada en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂, durante 24 horas. Una vez producidos los extractos, fueron colocados en tubos cónicos de 15 ml y

esterilizados con filtro de 0.22 μm . En total se obtuvieron 12 ml de extractos de cada material, para utilizarse en 3 diluciones por material a saber: 3 extractos sin dilución, 3 extractos dilución al 50% o $\frac{1}{2}$ y 3 extractos dilución al 25% o $\frac{1}{4}$.



Figura 8. Preparación de cementos para extractos.

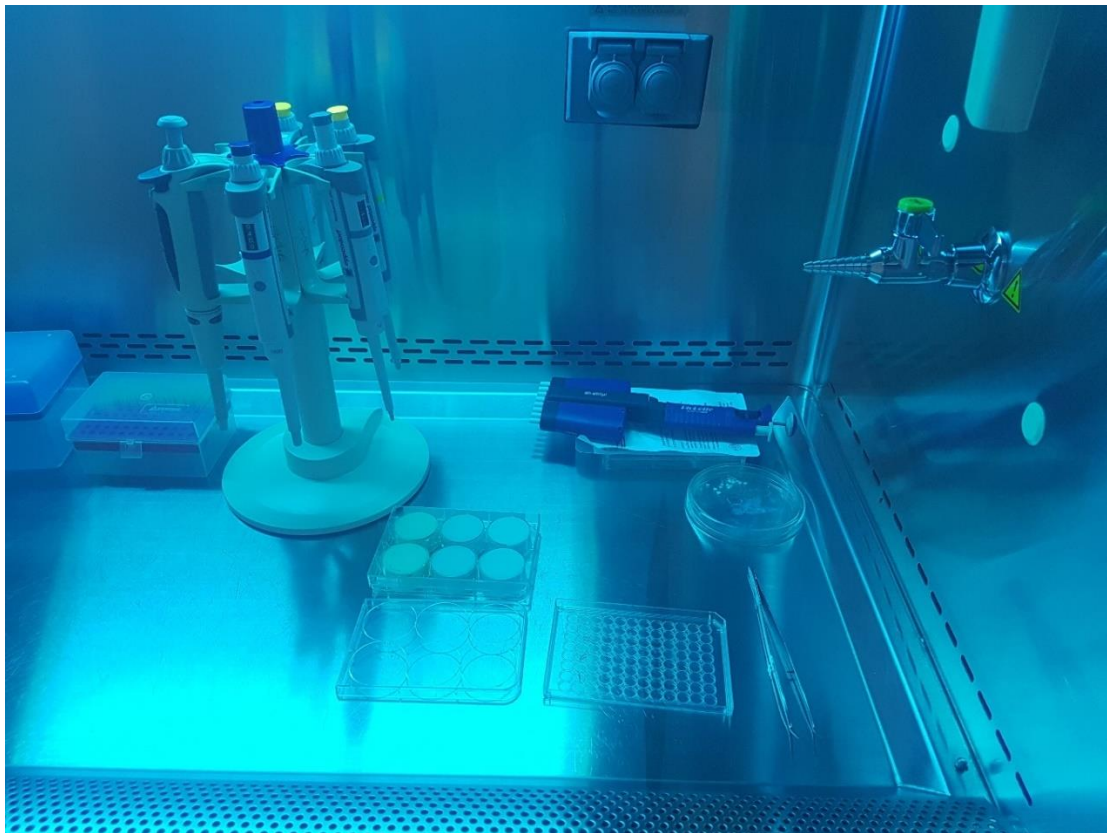


Figura 9. Esterilización de los discos de los materiales para extractos.

6.7 Ensayo de viabilidad y proliferación

La proliferación celular se midió utilizando el método colorimétrico Cell titer[®], cuyo ingrediente activo es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células, de color azul intenso. Al interiorizarse en las células, el compuesto es reducido en la mitocondria, creando un indicador de actividad metabólica mitocondrial de viabilidad, al ser efectivamente convertida hacia resorufina, lo cual emite una fluorescencia roja o rosa brillante. Las células viables realizan esta reacción, generando una medida cuantitativa de la viabilidad. No produce lisis celular, lo que permite evaluar la proliferación en el tiempo que dure el experimento. (90)

Para simular las condiciones en que los distintos materiales interactúan con la pulpa dental, realizamos una evaluación de proliferación *in vitro*, utilizando CTPD del cuarto pase en contacto con los extractos obtenidos. El experimento se realizó en una placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5. (91)

Para la realización de este ensayo se cultivaron CTPD tripsinizadas en la caja de 96 pozos, con una densidad de 3000 células por pozo, utilizando medio de cultivo completo. Una vez iniciado el experimento, se dejó un periodo de adaptación celular de 24 horas. Se decantó el medio de cultivo y se colocó nuevo medio en el control positivo y negativo; en los pocillos experimentales se colocó cada uno de los 9 extractos (100 µl por pozo en diluciones 1/1, 1/2 y 1/4, así como también la adición de 20 µl de Cell Titer[®], Australia), por triplicado (figura 10). Se dejaron interactuar durante una hora y se midió el tiempo 0 de absorbancia utilizando el lector multi modal Cytation 3 (Biotek[®], USA) y el software de lectura de micropozos Gen5 (Biotek[®], USA). La absorbancia fue medida a 570-600 nm. Posteriormente se repitieron las mediciones a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Se almacenaron los datos hasta su análisis.

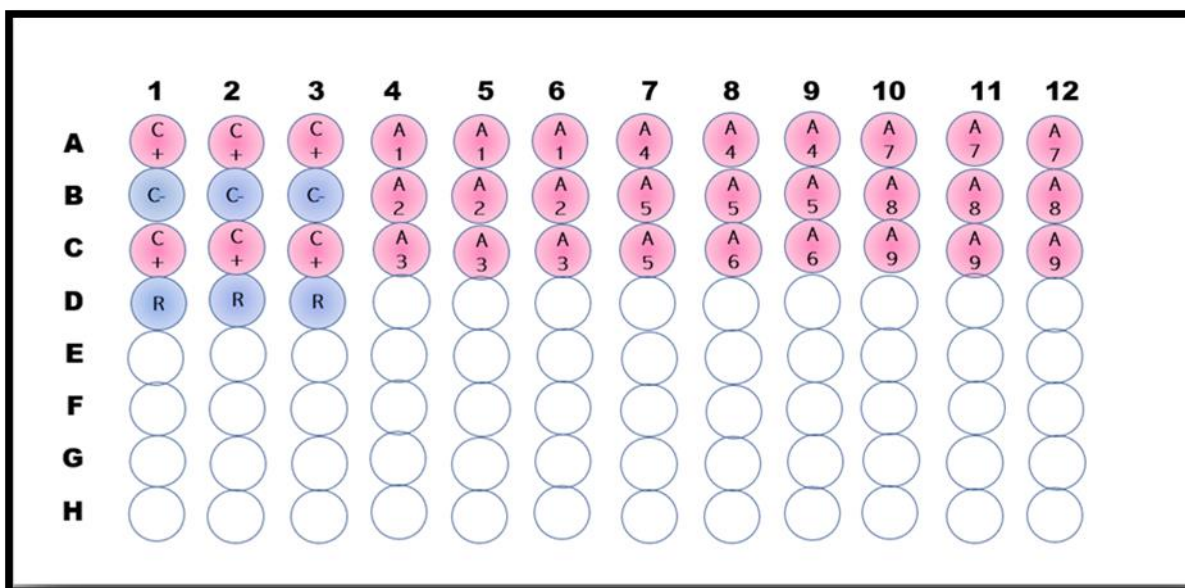


Figura 10. Diagrama del ensayo de proliferación de CTPD con extractos por triplicado. A1-A3: CTPD con extracto de CPBOZ al 10% sin dilución, dilución ½ y dilución ¼ respectivamente. A4-A6: CTPD con extracto de CPBSB al 10% sin dilución, dilución ½ y dilución ¼ respectivamente. A7-A9: CTPD con extracto de NuSmile NeoMTA® sin dilución, dilución ½ y dilución ¼ respectivamente. C+: CTPD con medio de cultivo estándar como control positivo; C-: CTPD con cobre como control negativo; R: Medio de cultivo sin células como blanco de referencia colorimétrica.

6.8 Tinción de CTPD

Para evaluar la morfología celular, se empleó un ensayo de tinción del citoesqueleto celular con colorante de GIEMSA®. El colorante tiene como fundamento utilizar un contraste entre colorantes ácidos y básicos, para teñir las estructuras básicas y ácidas respectivamente. El colorante básico utilizado es el azul de metileno y sus derivados oxidados (Azure A y Azure B), mientras que el colorante ácido es la eosina. Las estructuras ácidas de las células (tales como los ácidos nucleicos y los gránulos de los segmentados basófilos) se tiñen con el azul de metileno. Las estructuras básicas de las células (tales como la hemoglobina y algunos gránulos eosinófilos) son teñidos con la eosina. El azul de metileno y el Azure se caracterizan por ser colorantes metacromáticos, por lo cual pueden brindar una tonalidad variable a las distintas estructuras de acuerdo con la carga de poli aniones que posean. (92)

Para este ensayo, las células utilizadas en el experimento de proliferación celular que interactuaron con los extractos de los materiales de estudio fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Para la tinción del citoesqueleto y del núcleo, se utilizó el colorante Giemsa® conjugado (1:500) que se incubó durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS para retirar el exceso del colorante y se procedió al secado a temperatura ambiente. Posterior al secado, las células fueron visualizadas y examinadas en un microscopio óptico para el análisis de la morfología.

6.9 Ensayo de diferenciación dentinogénica

Para la identificación de la diferenciación de las CTPD hacia un linaje dentinogénico, se realizó la inmunodetección de la proteína DSPP (proteína indicativa de linaje dentinogénico) por medio de la técnica de Western Blot. El Western blot es una técnica analítica utilizada para identificar proteínas específicas dentro de un complejo mayor de proteínas, proveniente de extractos celulares o tejidos. Se realiza en tres etapas, a saber, separación de proteínas por tamaño (electroforesis en gel de acuerdo con el peso molecular, estructura o hidrofobicidad), transferencia a un soporte sólido (membrana adsorbente de nitrocelulosa) y visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios o secundarios apropiados (detección de la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia). (93)

El antígeno en este ensayo fueron los extractos totales de proteínas provenientes de las CTPD en todas las condiciones experimentales y sus respectivos controles a los 7 y 14 días del experimento. Para ellos las células del quinto pase fueron sembradas en cajas de 24 pozos, a una densidad de 10,000 células por pozo, con cada uno de los medios condicionados con los materiales de estudio por triplicado y sus respectivos controles negativo (cobre) y positivo (células con medio de cultivo completo), más un control de expresión protéica con medio osteogénico (preparado con medio D-MEM en polvo, SFB al 10% (Gibco®), bicarbonato de sodio, buffer zwitteriónico Hepes, SFB al 10% glutamina, piruvato de sodio, ácido ascórbico (5 µg/ml), dexametasona (0.8 µl), beta-glicerofosfato (2.16×10^{-3} µg/ml), ácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico 1% (Sigma Aldrich®). Los medios de cultivo fueron cambiados cada tercer día. Una vez realizada la interacción de los medios condicionados más las células, se realizó la extracción de proteína en frío, de cada uno de los pozos de estudio, decantando el medio de cultivo y realizando tres lavados con

PBS. Posteriormente se colocó 100 μ l de tampón de lisis de radioinmunoprecipitación (buffer RIPA Thermo Scientific®) para desprendimiento y lisis de las células troncales y se colocaron en tubos cónicos de 1.5 ml; se almacenaron en ultracongelador hasta su uso para la prueba de inmunodetección de proteína.

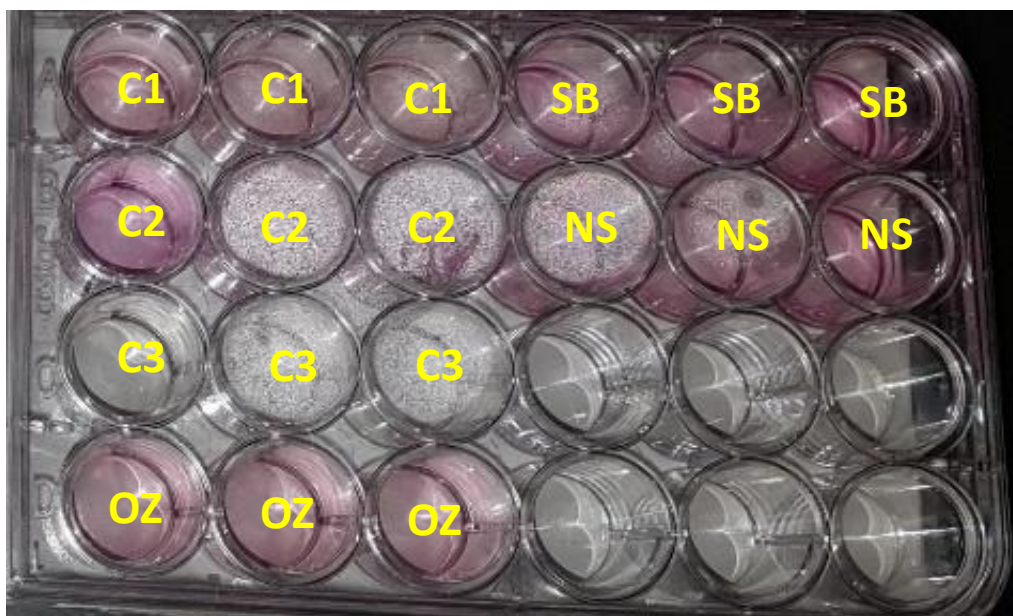


Figura 11. CTPD en contacto con los materiales de estudio; C1: CTPD con medio D MEM suplementado; C2: CTPD con cobre; C3: CTPD con medio osteogénico; OZ: CTPD con medio D MEM modificado con CPBOZ dilución $\frac{1}{4}$; SB: CTPD con medio D MEM; modificado con CPBSB dilución $\frac{1}{4}$.; NS: CTPD con medio D MEM modificado con NuSmile NeoMTA® dilución $\frac{1}{4}$.

Las muestras protéicas se trasladaron al Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” para la realización de la inmunodetección de la proteína DSPP. Los tubos se mantuvieron en hielo por al menos 45 minutos y posteriormente, centrifugados a 1200 rpm durante 15 minutos a 4 °C, de donde se obtuvieron los sobrenadantes con las proteínas celulares.

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford. Descrito por el Dr. Bradford en 1976, consiste en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas solubilizadas. El colorante libre existe en cuatro formas iónicas, cuya forma azul se une a las proteínas y se absorbe a 590 nm. La concentración proteica es determinada gracias a la cantidad de colorante azul absorbida medida en un espectrofotómetro; se une principalmente a residuos de arginina,

triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. Entre las ventajas de utilizar este método se encuentra su compatibilidad con agentes reductores tales como el DTT o el β -mercaptoetanol, los cuales no son compatibles con los métodos de Lowry o BCA, así como también es posible medir proteínas de alto peso molecular, ya que el colorante no tiene afinidad por péptidos de bajo peso molecular. Entre las limitaciones de la técnica podemos mencionar su incompatibilidad con detergentes, los cuales se utilizan de rutina para solubilizar las proteínas de membrana. Otra desventaja es que se puede subestimar el contenido de proteínas al utilizarse albúmina de suero bovino (BSA) como estándar proteico, la cual se puede sustituir por inmunoglobulina G (IgG) o lisozima dependiendo del tipo de muestra.(94)

La curva de calibración se realizó con concentraciones crecientes, utilizando el kit Quick Stuart[®] (Bradford protein Assay, Bio Rad[®], USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez determinada la concentración de proteínas de cada tubo, se utilizaron 30 μ g de cada muestra, añadiéndole buffer de carga 4x (Glicerol, SDS 10%, agua destilada, azul de bromofenol, pironina y TRIS-HCl), bajo condiciones reductoras utilizando ditroiteitol (DTT). Para la desnaturalización se colocaron en termociclador (Thermo Mixer Eppendorf[®]) a 95° durante 5 minutos. Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (por sus siglas en inglés SDS-PAGE) a un 10%, a 120 voltios por una hora (figura 12). (95)



Figura 12. SDS-PAGE al 10% representativa de los extractos proteicos de las CTPD y las diferentes condiciones experimentales y sus controles a los 7 y 14 días.

Dos de estos geles se utilizaron para comprobar si había degradación de las muestras, por lo que se tiñeron con solución de azul Coomassie (2.5 g de azul brillante de Coomassie R-250, 450 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial, 450 ml de agua bidestilada), durante 12 horas en agitación y posteriormente se colocó solución desteñidora (200 ml de metanol, 150 ml de ácido acético y 650 ml de agua bidestilada) durante una hora en agitación. Al finalizar se realizaron lavados con agua destilada en agitación para evidenciar las bandas de las proteínas presentes en las muestras analizadas.

Réplicas de los geles anteriores fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa a 80 V durante una hora. Después, la membrana se colocó en solución de bloqueo TBST 1X/leche 1% (TBST 10X: Tris-HCl, NaCl y polisorbato 20; leche en polvo marca Svelty®) durante una hora; posteriormente las membranas se incubaron durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-DSPP (anticuerpo policlonal DSPP de conejo, Mybiosource® #MBS2541229, a una dilución de 1:1000) y con Histona 3 (anticuerpo policlonal de conejo anti-Histona H3, Sigma-Aldrich® #07-690, a una dilución 1:10000). Posteriormente las membranas fueron lavadas con solución de lavado (TBST 1X) e incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo, diluido en solución de bloqueo en agitación por una hora; después se realizaron 3 lavados con solución de TBST 1x. Para el revelado se utilizó el kit de detección colorimétrica (AP Conjugate Substrate Kit, BIO RAD®, #170-6432, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se detuvo el revelado con agua destilada. Las membranas húmedas y recién reveladas se colocaron en el fotodocumentador (Chemidoc, Biorad®) y fueron capturadas con el software Image Lab®. (96)

6.10 Ensayo de hemocompatibilidad

Para evaluar la hemocompatibilidad de los materiales de estudio, se realizó una prueba de hemólisis *in vitro* de acuerdo con lo estipulado en la NOM ISO 10993-4, apartado C, sobre evaluación de propiedades hemolíticas para materiales dentales en contacto directo. (97)

La hemocompatibilidad de los biomateriales destinados a estar en contacto con la sangre, es uno de los criterios "*in vitro*" más importantes a tomar en cuenta para la aplicación clínica; tal es el caso de los biomateriales endodónticos, los cuales están en

íntimo contacto con la sangre y sus componentes. Los eritrocitos son las células sanguíneas más rígidas en la sangre, por lo que son sensibles a la ruptura y hemólisis causada por cambios en la presión osmótica. Su destrucción afecta a todas las demás células sanguíneas, incluyendo a las inmunitarias, que pueden reconocer como patógeno o alérgeno a un material. El análisis de la alteración hemática se realiza por pruebas de hemólisis. La hemólisis de los eritrocitos *in vitro*, se considera que es una medida simple y fiable para estimar la compatibilidad de los materiales con la sangre. Al final, se busca que la capacidad del producto de provocar hemólisis sea inferior al 5%. (98)

Para la prueba de hemocompatibilidad se prepararon andamios con los materiales de estudio. Se colocaron fragmentos de los materiales en un molde de silicona ligera (figura 13), con pozos de 6 mm diámetro y 2mm de alto. Se dejaron fraguar a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez fraguados los materiales, se esterilizaron por medio de luz ultravioleta en la campana de bioseguridad, 30 minutos de cada lado.

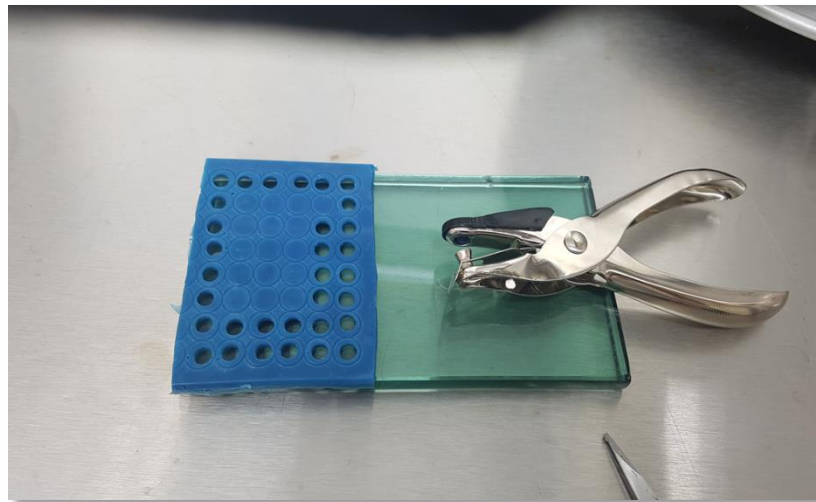


Figura 13. Molde de silicona para elaboración de andamios de los cementos.

Una vez obtenidos los andamios con los materiales, se realizó la toma de sangre de donante sano con aguja de punción y se colocó en un tubo cónico (4 ml) en 0.5 ml de EDTA como anticoagulante. Se colocaron 5 ml de solución isotónica (solución salina) y 0.25 ml de suspensión (eritrocitos) en tubos con cada uno de los andamios de los materiales de estudio.

Andamio 1: solución salina con eritrocitos al 5% + CPBPZ 20%

Andamio 2: solución salina con eritrocitos al 5% + CPBSB 20%

Andamio 3: solución salina con eritrocitos al 5% + CPBOZ 10%

Andamio 4: solución salina con eritrocitos al 5% + CPBSB 20%

Andamio 5: solución salina con eritrocitos al 5% + NuSmile NeoMTA®

Control positivo (100% de hemólisis): 5 ml de agua destilada con 0.25 ml de eritrocitos al 5%

Control negativo (0% de hemólisis): 5 ml de solución salina, 0.25 ml de eritrocitos.

Suspensión de eritrocitos al 5%

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron 100 µl de la suspensión de eritrocitos más andamio, el control positivo y el control negativo en un pocillo de la caja de 96 pozos y se realizó lectura de absorbancia a 415-600 nm. Los datos obtenidos se analizaron para obtener los porcentajes de hemólisis.

VII. RESULTADOS

Se realizó una evaluación de proliferación, morfología y diferenciación dentinogénica de células troncales de pulpa dental (provenientes del cultivo celular de pulpa dental de molar exodonciado de donante sano) en contacto con cementos de silicato tricálcico (Cemento Portland blanco con óxido de zirconia o sulfato de bario y NuSmile NeoMTA®). También se llevó a cabo un ensayo de hemólisis con los materiales de estudio y una evaluación de la materia prima (pulpa dental obtenida de molar exodonciado de un segundo donador) para el análisis y la discusión de los resultados.

7.2 Aislamiento y cultivo de CTPD

Se realizó un estudio histológico de la materia prima (pulpa dental) analizando sus características morfológicas mediante la técnica de tinción con azul de toluidina. Se pudieron distinguir las cuatro regiones topográficas de la pulpa dental (zonas odontoblástica, subodontoblástica, rica en células y central), es decir se observaron las células que son evaluadas dentro de este proyecto, en interacción con su matriz extracelular. Al tratarse de un tejido sano, se aprecian núcleos por toda la matriz extracelular en especial en la zona central y zona rica en células, lúmenes de arteriolas o vasos linfáticos y una periferia marcada formando la pre dentina (Figura 14).

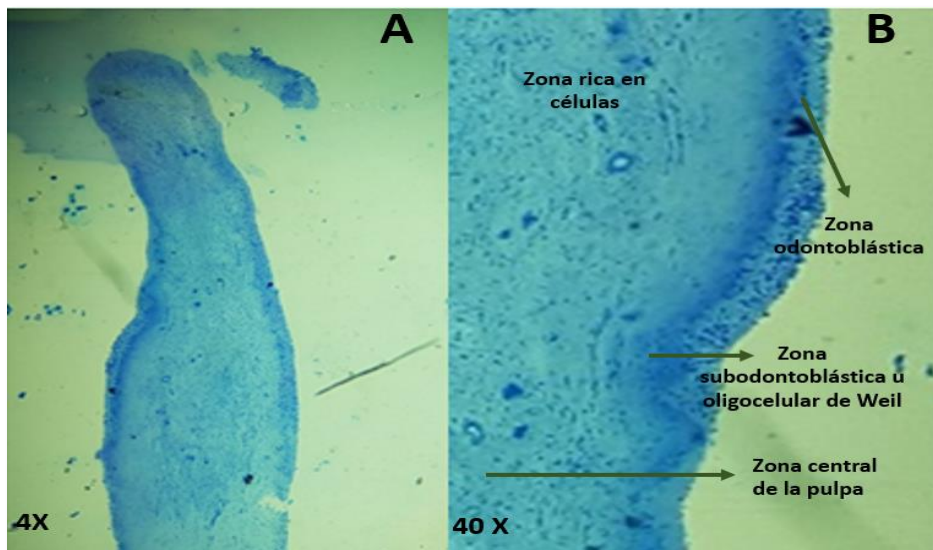


Figura 14. A. Pulpa dental teñida con azul de toluidina (4x); B. pulpa dental teñida con azul de toluidina y sus zonas topográficas (40x).

Las células utilizadas en este proyecto se extrajeron de pulpa dental y se cultivaron según lo estipulado en el apartado de material y métodos. A las 24 horas de cultivo con la técnica de digestión enzimática, se observaron las células pulpares adheridas a la superficie de la botella de cultivo. A las 48 horas, pequeñas colonias de células de tipo fibroblástico proliferaron y se expandieron por toda la superficie de la botella de cultivo (figura 15). A los 7 días, las células se mostraron confluentes al 60% de la capacidad del frasco. A los 14 días de cultivo, se observaron diferencias morfológicas entre las células extraídas por medio de la digestión enzimática y por medio de la técnica de explante (figura 16).

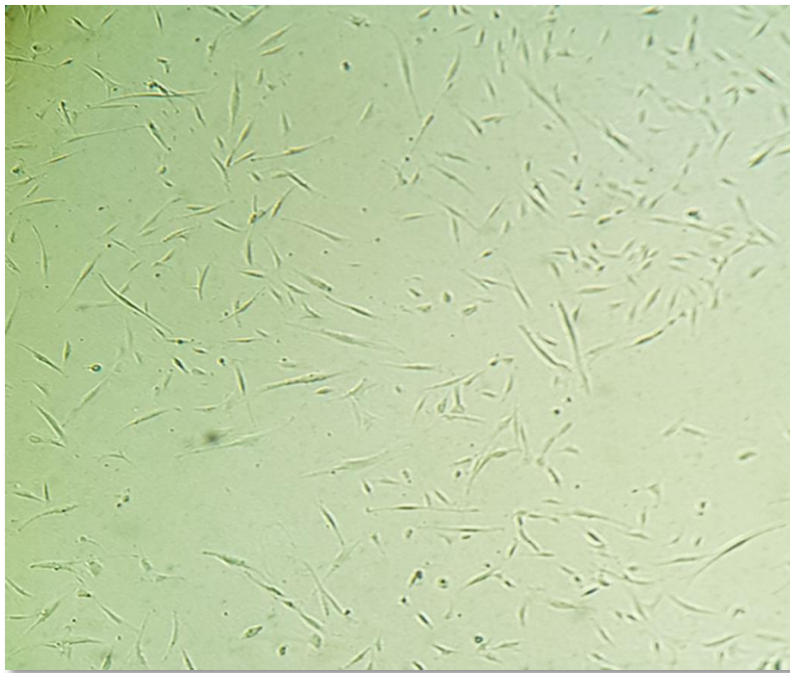


Figura 15. Células de pulpa dental a las 48 horas de cultivo vistas desde el microscopio de campo claro (10x).

Las células aisladas de la pulpa dental obtenidas por medio de la técnica de digestión enzimática poseen características de células mesenquimales, se adhirieron al plástico, tienen morfología de fibroblasto y se autorrenovaron (figura 16, panel A y B). En el caso de las células obtenidas por medio de la técnica de explante, las células se adhirieron al plástico formando una población celular heterogénea con diferentes morfologías, incluyendo células redondeadas y pequeñas, como también células grandes, planas y con forma ahusada (figura 16, panel C). Las células ahusadas, con morfología fibroblastoide,

se volvieron gradualmente predominantes en los pases sucesivos, con un crecimiento y división celular continuos a lo largo del cultivo primario.

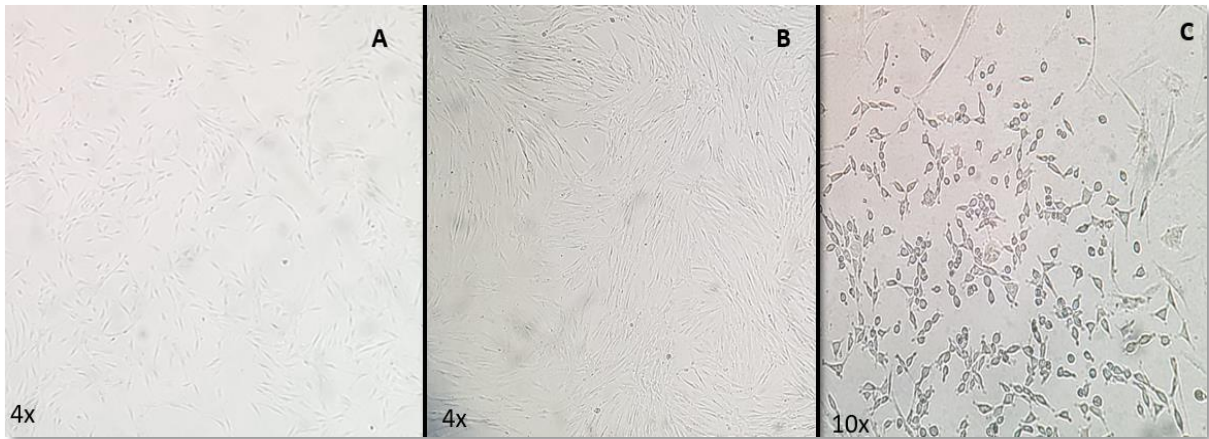


Figura 16. A. Cultivo celular por la técnica de digestión enzimática a los 7 días. B. Cultivo celular con la técnica de digestión enzimática a los 14 días. C. Cultivo celular con la técnica de explante a los 14 días.

7.3 Caracterización inmunofenotípica

Se realizó la confirmación inmunofenotípica de las células pertenecientes al linaje mesenquimal, mediante la técnica de citometría de flujo, de acuerdo con los parámetros estipulados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Al menos el 98.5% de las células empleadas en los experimentos, presentaron viabilidad (evaluado con 7AAD- 7 aminoactinomicina).

En esta prueba, resultaron positivas al linaje mesenquimal (mayor a 20% de positividad, CD 90 94.8%, CD 105 23.5% Y CD 73 95.8%) y negativo a linaje hematopoyético (CD 34/45 no expresados). Se observaron dos poblaciones celulares mesenquimales distintas (de diferente tamaño). El porcentaje de poblaciones mesenquimales en las células muestreadas fue del 71.3%, por lo que las células empleadas en los experimentos son células troncales de pulpa dental (Figura 17).

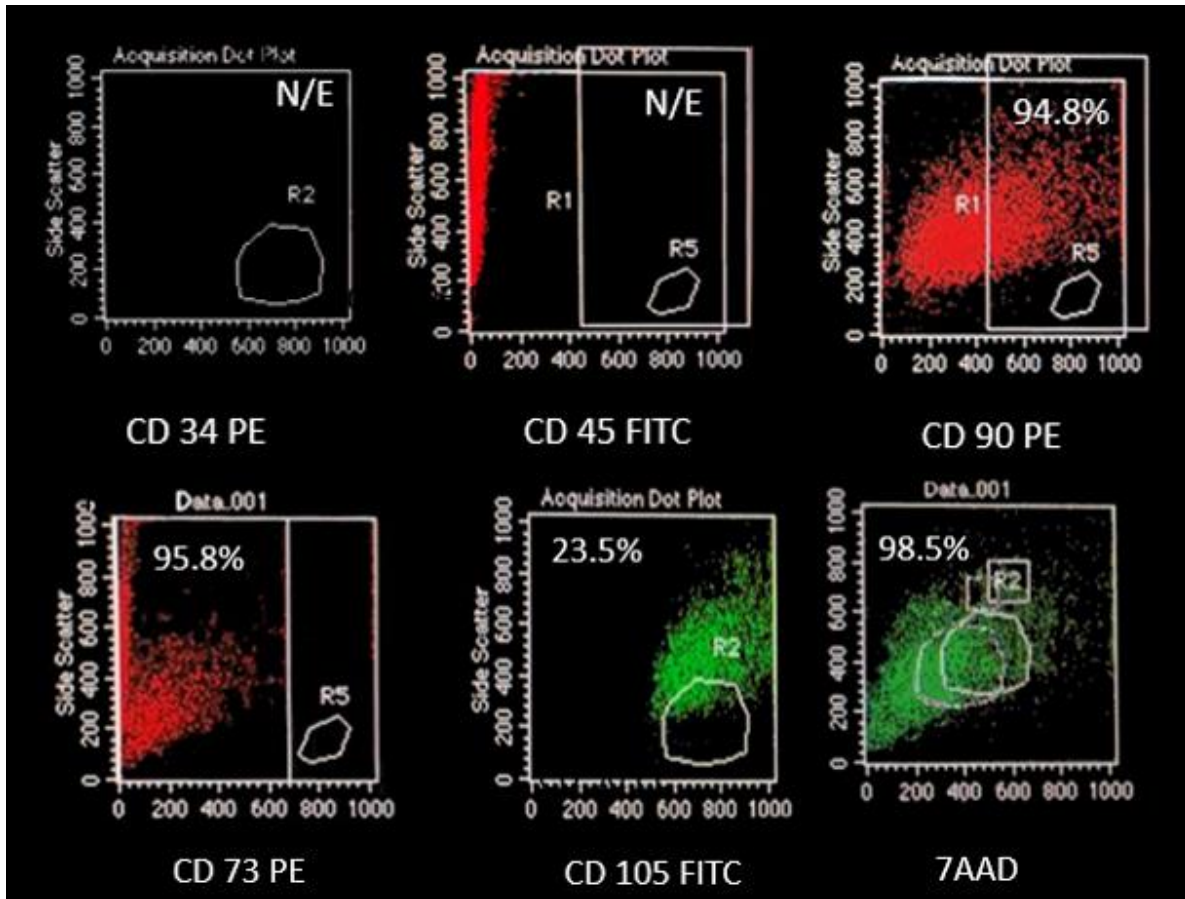


Figura 17. Dot Plots de marcadores inmunofenotípicos de linaje mesenquimal en CTPD.

7.4 Efecto de los cementos de estudio sobre la proliferación de las CTPD

Se midió la proliferación celular de las CTPD tras la exposición a diferentes diluciones de los cementos de silicato tricálcico estudiados (cemento Portland blanco con óxido zirconia, cemento Portland blanco con sulfato de bario el cemento NuSmile NeoMTA® sin diluir; dilución $\frac{1}{2}$ y dilución $\frac{1}{4}$) a distintos tiempos de incubación (tiempo 0,24,48,72,96,120 y 144 horas). Las células presentaron viabilidad durante los 7 tiempos del ensayo, sin embargo, la proliferación cesó a las 24 horas y se observó un decrecimiento en la misma.

La comparación de los datos obtenidos de la proliferación celular, se realizaron mediante un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA), para analizar los factores (grupos experimentales y tiempo) e interacciones entre ellos. También se efectuó un análisis de comparaciones múltiples (*post hoc*), utilizando el método de Tukey, con la finalidad de

evaluar si para cada condición experimental (materiales en contacto con las CTPD), los diferentes niveles de la variable dilución (sin diluir, dilución $\frac{1}{2}$ y dilución $\frac{1}{4}$) son un efecto significativo en el tiempo, es decir, si podemos o no considerar que todas las diluciones, son estadísticamente equivalentes respecto al grupo control sin tratamiento.

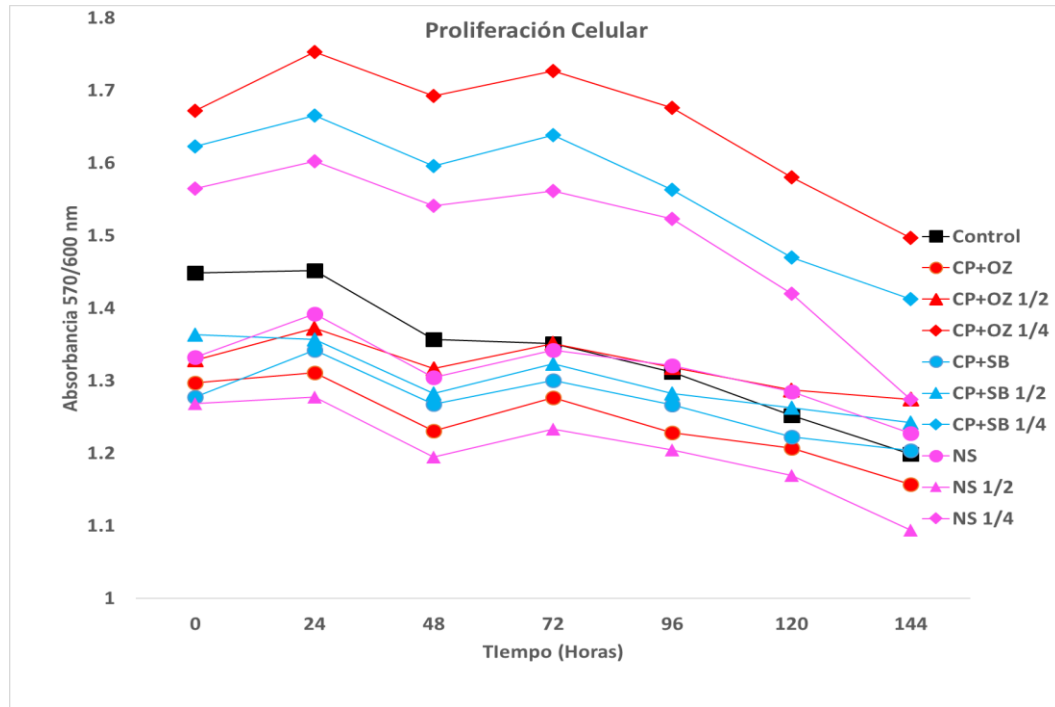


Figura 18. Curva de proliferación de las CTPD en contacto con extractos de los materiales de estudio, evaluada durante 7 días.

Los tratamientos de dilución $\frac{1}{4}$, rebasaron la proliferación del grupo control (CTPD con medio de cultivo estándar). Mientras que los tratamientos de dilución $\frac{1}{2}$ y sin dilución se asemejan o son inferiores al grupo control (figura 18).

7.4.1 Evaluación del efecto de los extractos sin dilución en la proliferación de las CTPD

La presencia del cemento Portland blanco modificado, así como del cemento NuSmile NeoMTA[®], tuvieron diferentes efectos sobre las CTPD en función del grado de dilución. El grupo control o CTPD con medio de cultivo estándar, presentó un mayor proliferación celular que en los grupos de extractos sin diluir (figura 19), a excepción del grupo de CPBOZ en los tiempos 96 y 120. Al realizar las pruebas post hoc (test de Tukey),

es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) en todos los tiempos de evaluación (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas) respecto al grupo de CPBOZ.

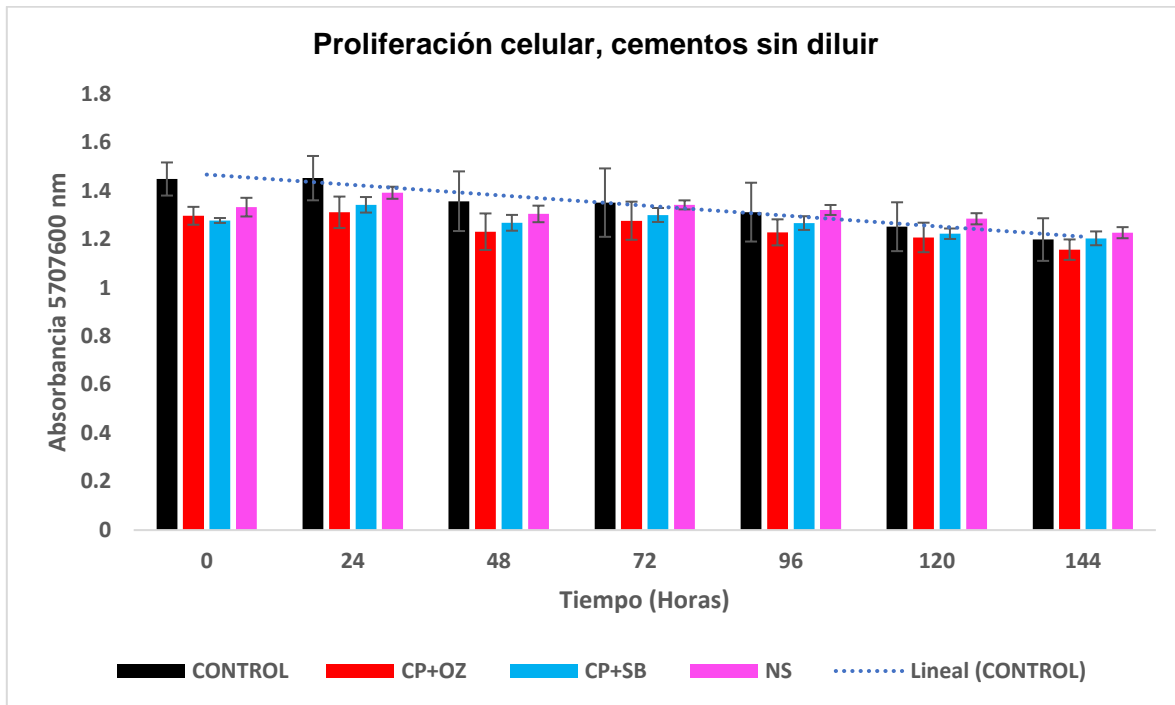


Figura 19. Proliferación celular de CTPD en contacto con extractos sin dilución de los materiales de estudio, evaluado durante 7 días.

7.4.2 Evaluación del efecto de los extractos dilución 1/2 en la proliferación de las CTPD

La figura 20 muestra que en el grupo control hay una mayor proliferación celular que en los grupos de cementos diluidos al 50%, sin ser diferente significativamente de los grupos de CPBSB y del NuSmile NeoMTA®. En el caso del óxido de zirconia, la dilución 1/2 es diferente de manera significativa respecto al grupo control en todos los tiempos.

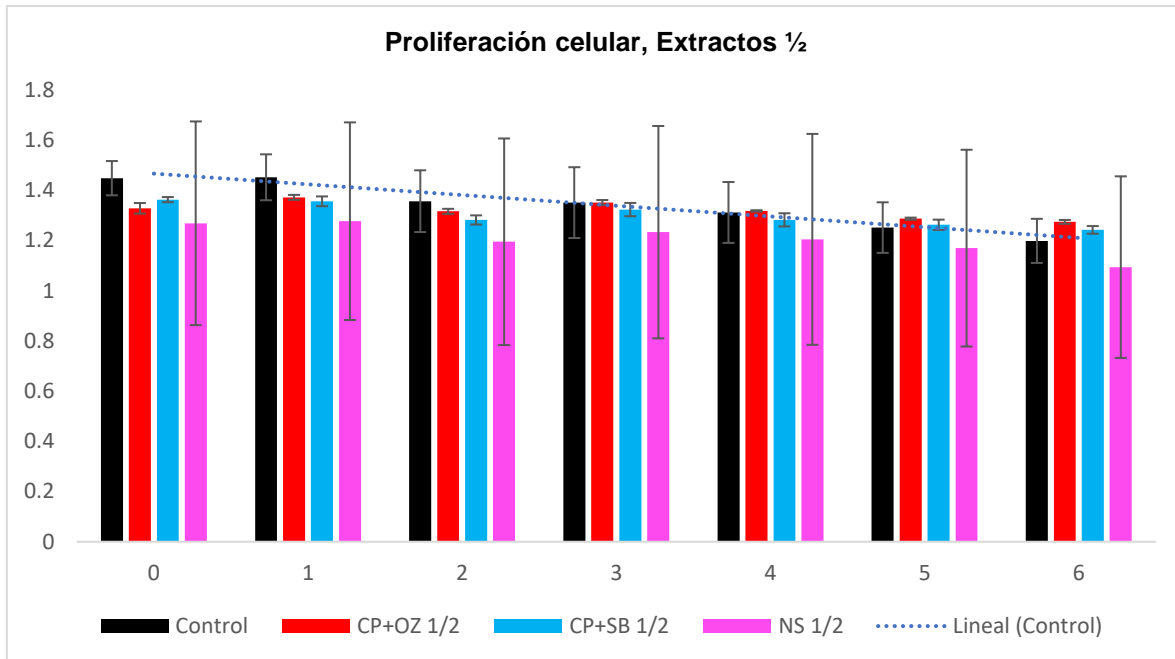


Figura 20. Proliferación celular de CTPD en contacto con extractos dilución 1/2 de los materiales de estudio, evaluado durante 7 días.

7.4.3 Evaluación del efecto de los extractos dilución 1/4 en la proliferación de las CTPD

El grupo de CPBOZ presentó un mayor proliferación celular que los otros grupos respecto al control positivo; hubo diferencias significativas en los tiempos 24,48,72,96 y 120. Los tratamientos de CPBSB y NuSmile NeoMTA® dilución 1/4, presentaron una mayor proliferación respecto al grupo control, siendo estadísticamente diferente en todos los tiempos (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144). De acuerdo con estos resultados, asumimos que la dilución 1/4, es la que más se asemeja a la condición fisiológica humana, donde los materiales dentales no están directamente en contacto con las CTPD, si no que tienen contacto con células del sistema inmunológico que influyen para contrarrestar cualquier toxicidad en los tejidos circundantes a la colocación de los biomateriales

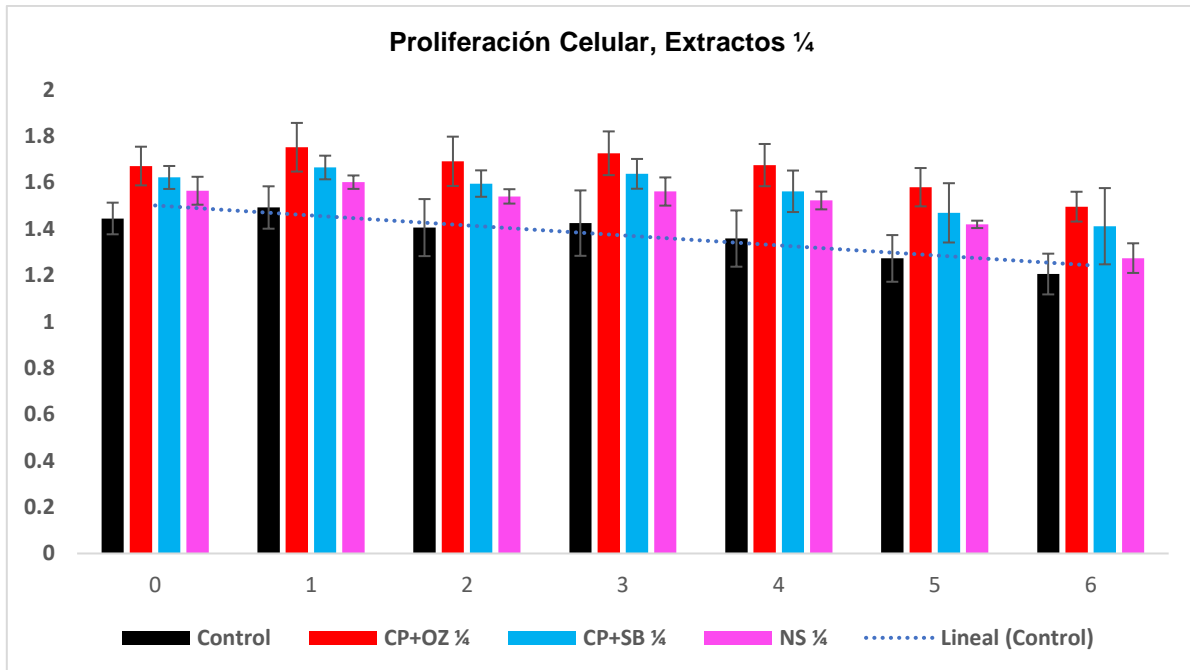


Figura 21. Proliferación celular de CTPD en contacto con extractos dilución 1/4 de los materiales de estudio, evaluado durante 7 días.

7.5 Efecto de los cementos de estudio sobre la morfología de las CTPD

En las CTPD en interacción con medio de cultivo estándar durante 7 días, se observa patrón de células ahusadas con morfología fibroblastoide, con doble o triple nucleolo, característico del linaje mesenquimal. El citoesqueleto presenta organización adecuada y colonias celulares organizadas y con amplia proliferación (figura 22)

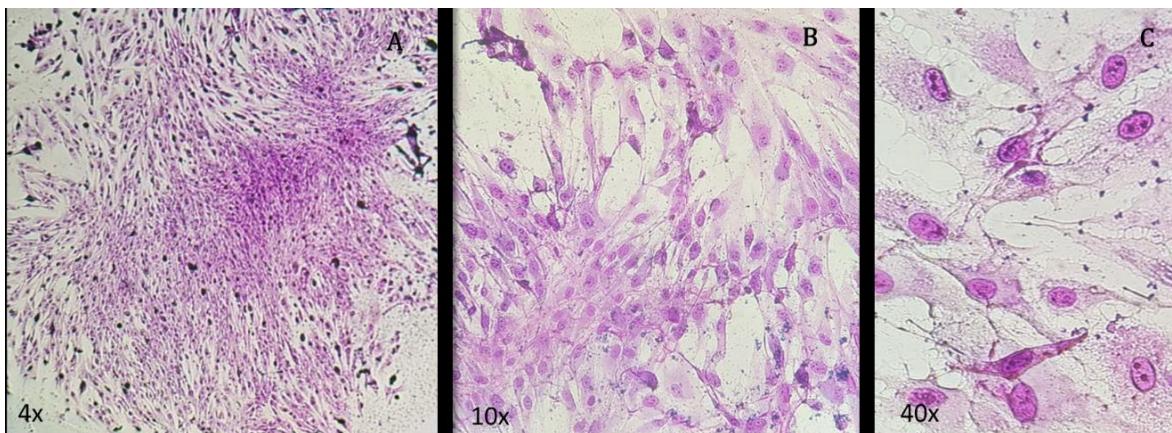


Figura 22. Tinción de Giemsa de CTPD con medio de cultivo estándar durante 7 días de interacción. **A, B Y C.** CTPD con magnificación 4x, 10 x y 40x respectivamente.

En el caso de las CTPD en interacción con los materiales de estudio sin diluir, con dilución $\frac{1}{2}$ y con dilución $\frac{1}{4}$ no se observan diferencias morfológicas notables, respecto a las CTPD sin tratamiento. De acuerdo con las microfotografías analizadas las colonias celulares se muestran en una organización homogénea y con un citoesqueleto y nucleolos típicos de células mesenquimales.

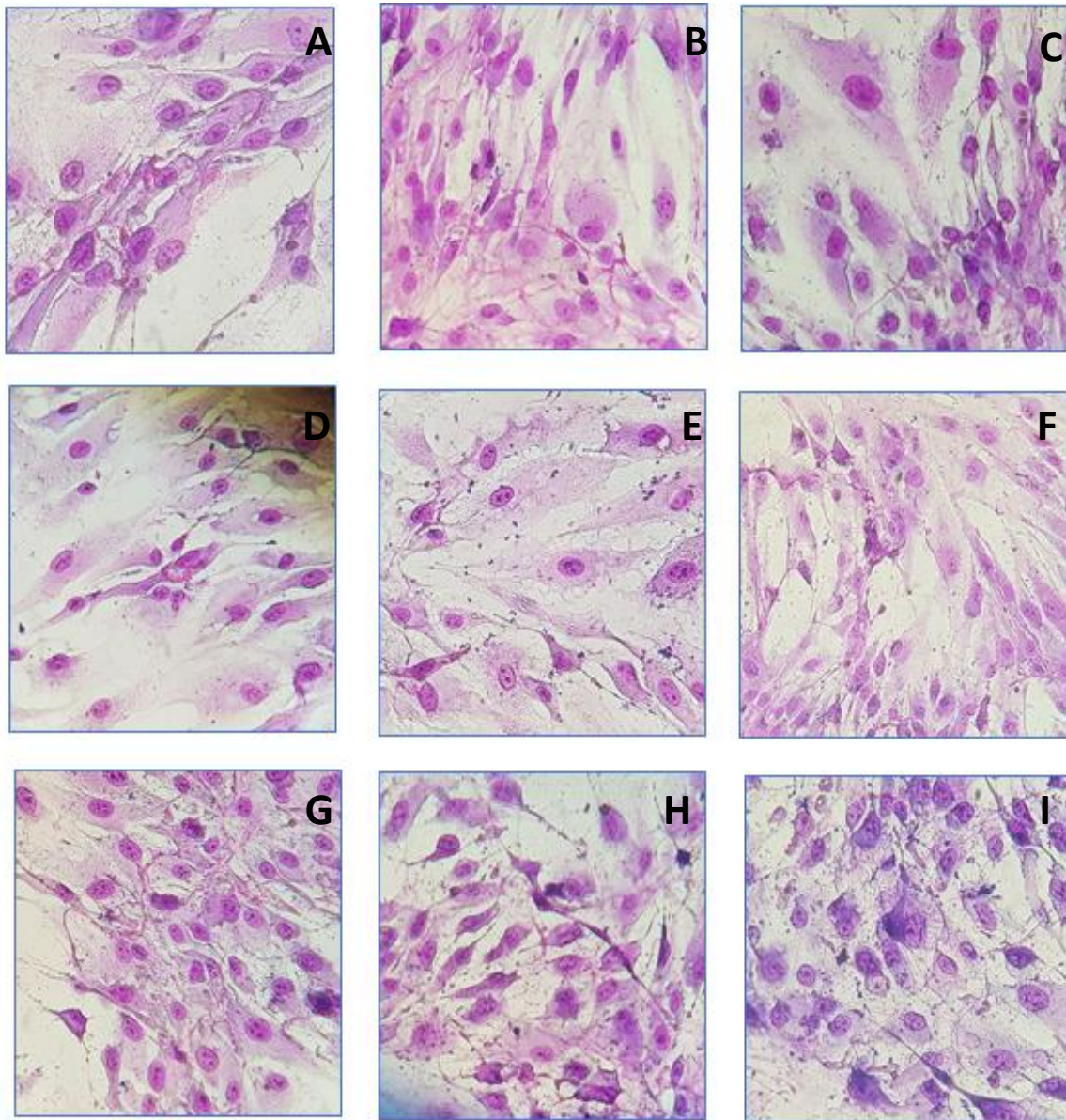


Figura 23. Tinciones de Giemsa de CTPD vistas a 40x. A, B y C. CTPD en interacción con extractos sin diluir (CPBOZ, CPBSB y NuSmile NeoMTA® respectivamente). D, E y F. CTPD en interacción con extractos dilución $\frac{1}{2}$ (CPBOZ, CPBSB y NuSmile NeoMTA® respectivamente) G, H e I. CTPD en interacción con extractos dilución $\frac{1}{4}$ (CPBOZ, CPBSB y NuSmile NeoMTA®).

7.6 Hemocompatibilidad

Los materiales CPBOZ al 10 y 20%, CPBSB al 10% y NuSmile NeoMTA® tuvieron valores de hemólisis dentro de lo permitido para un biomaterial según la norma ISO 10993 para la evaluación de dispositivos médicos en modelos *in vitro* (inferior al 5%), a excepción del CPBSB al 20%, que presentó valores de hemólisis del 12.8% (figura 24).

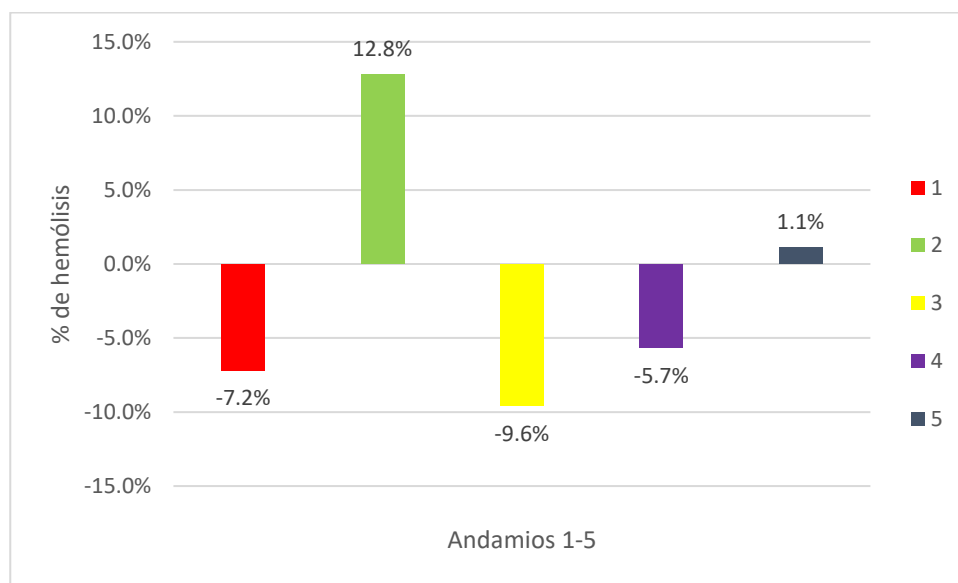


Figura 24. Ensayo de hemólisis. (1) Andamio de CP con óxido de zirconia al 20%. (2) Andamio de CPBSB al 20%. (3) Andamio de CPBOZ al 10%. (4) Andamio de CPBSB al 10%. (5) Andamio con NuSmile NeoMTA®.

Para calcular el porcentaje de hemólisis se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{Abs_{exp} - \overline{Abs}_{c-}}{\overline{Abs}_{c+} - \overline{Abs}_{c-}} * 100'$$

Donde Abs_{exp} indica el valor de la absorbancia medida en cada experimento, Abs_{c+} representa el valor promedio del control positivo (agua destilada) mientras que Abs_{c-} corresponde al promedio de la absorbancia medidas al control negativo (solución salina).

7.7 Inmunodetección proteica

La electroforesis de proteínas reveladas con tinción de Coomassie evidenció que las muestras proteicas no se encontraron degradadas, a excepción de los carriles de CTPD

con cobre, en los cuales la detección proteica fue en baja cantidad. En las muestras de CTPD en interacción con CPBSB durante 7 y 14 días, se observó poca cantidad de proteína.

En el revelado de Western Blot, se analizó la expresión de la proteína DSPP (biomarcador de odontoblastos). Para esto se analizaron los extractos proteicos de las CTPD bajo las diferentes condiciones experimentales con los materiales a probar y sus respectivos controles. En la figura 25 se puede observar una banda de 72 kDa tanto para el día 7 como para el día 14, en los carriles de CPBOZ y NuSmile NeoMTA[®], aunque también se observaron bandas menores y más débiles en los pesos de 35 kDa y un barrido de 230 a 270 kDa. Cabe mencionar que, en ninguna de las muestras de CTPD en interacción con los materiales de estudio, se detectaron bandas con el peso esperado de la proteína de interés (DSPP 110 kDa). Se puede observar que las bandas que corresponden a las muestras de 14 días son más intensas y numerosas respecto a las muestras de 7 días. La proteína constitutiva histona H3 solo se detectó en los carriles de muestra de CTPD con CPBOZ y NuSmile NeoMTA[®] en ambos paneles. En los controles negativos, es decir sin colocación de primer anticuerpo, no se observó detección de bandas.

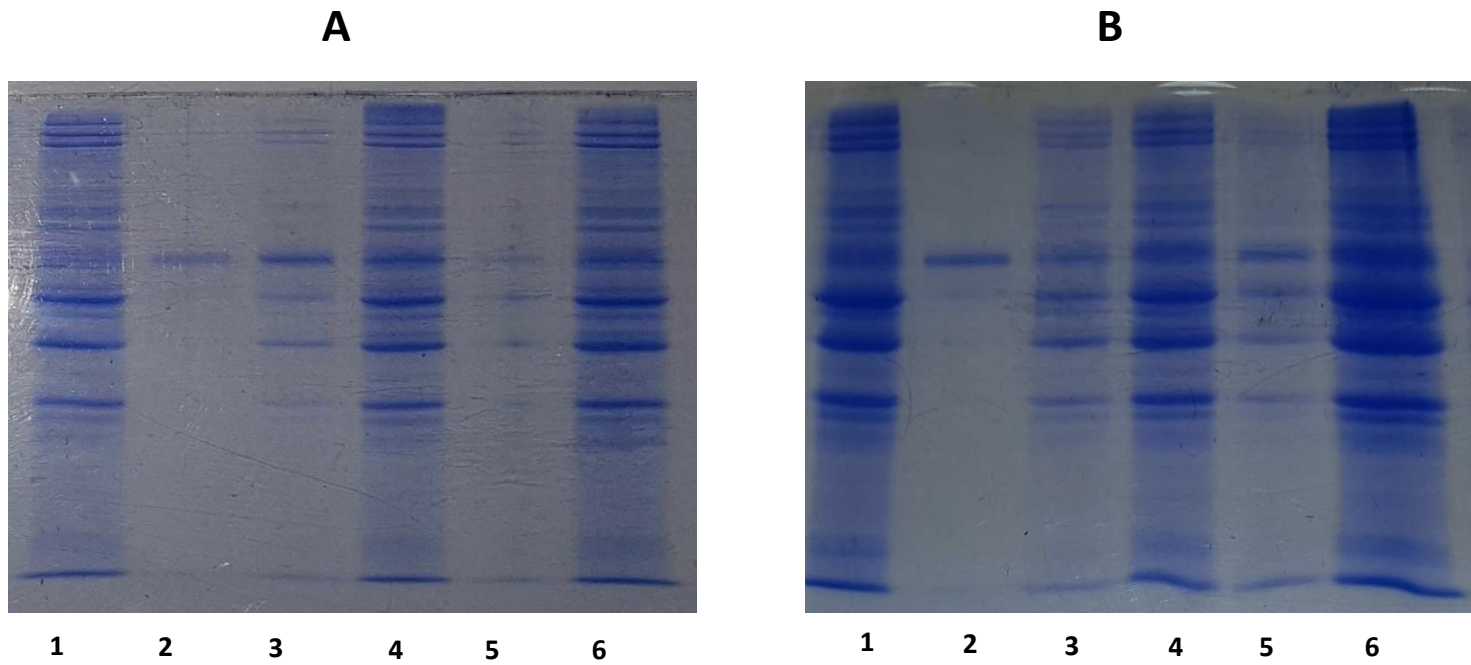


Figura 25. SDS-PAGE al 10% y tinción de las muestras de proteínas totales de CTPD en interacción con extractos de los materiales de estudio por 7 y 14 días. A. Panel de 7 días. B. Panel de 14 días. (1) CTPD con medio de cultivo estándar. (2) CTPD + cobre. (3) CTPD con medio osteogénico. (4) CTPD con CPBOZ. (5) CTPD con CPBSB. (6) CTPD con NuSmile NeoMTA®

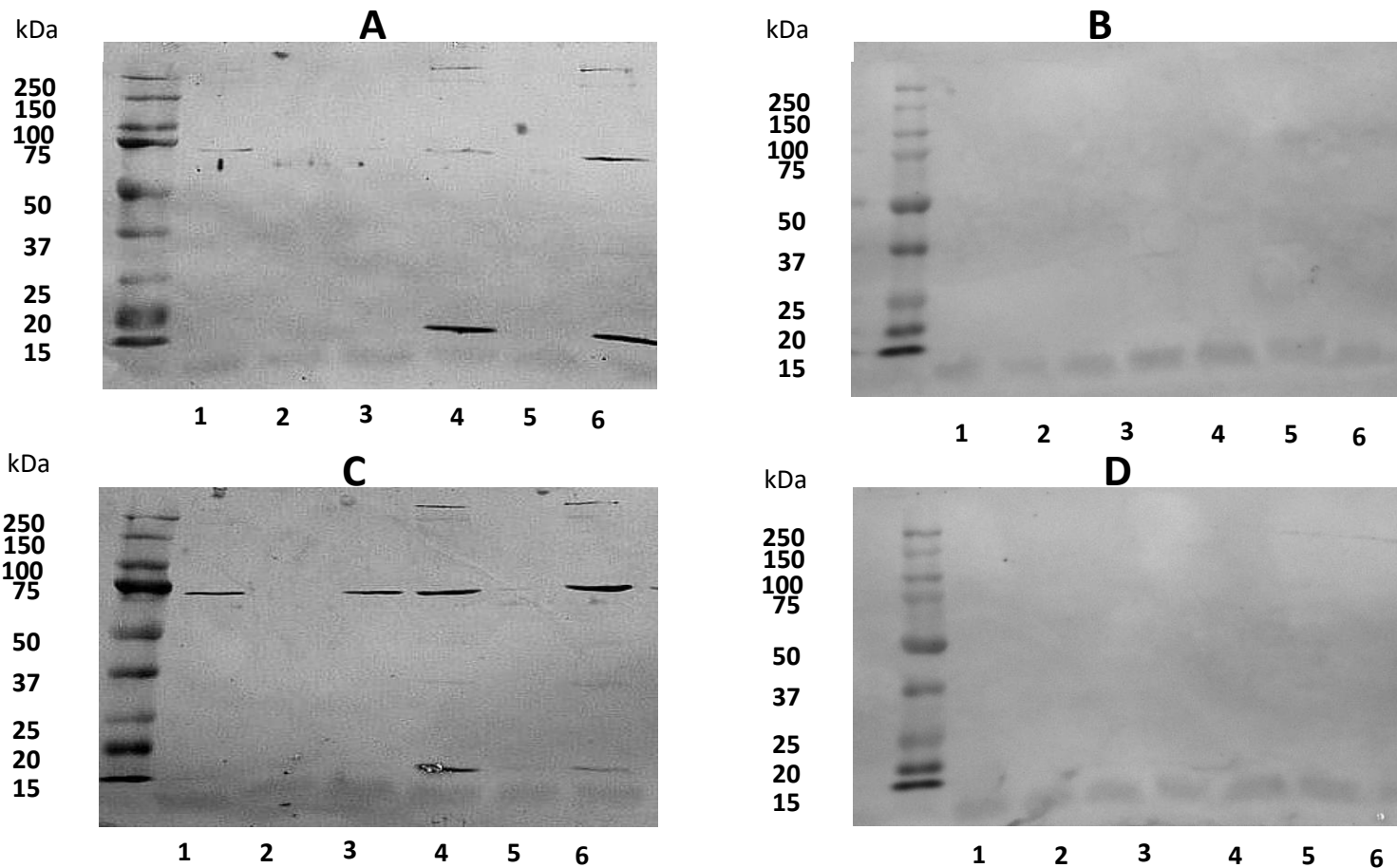


Figura 25. Evaluación de la expresión de la proteína DSPP en las fracciones proteínicas de CTPD en interacción con los materiales de estudio durante 7 y 14 días. Carriles del 1 al 6: (1) CTPD con medio de cultivo estándar. (2) CTPD + cobre. (3) CTPD con medio osteogénico. (4) CTPD con CPBOZ (5) CTPD con CPBSB. (6) CTPD con NuSmile NeoMTA®. A. A los 7 días. C. A los 14 días. B, D. Controles negativos (de segundo anticuerpo) a los 7 y 14 días respectivamente.

VIII. DISCUSIÓN

Este estudio se diseñó para realizar una evaluación de los efectos biológicos *in vitro* de células troncales de pulpa dental en contacto con cementos de silicato tricálcico, ya que la literatura señala que los biomateriales endodónticos deben ser bioactivos y garantizar un sellado biológico que implique la reparación y la regeneración de las zonas afectadas por patologías pulpares y periapicales, así como traumatismos. Diseñar un estudio de este tipo permite observar el comportamiento de células específicas del linaje mesenquimal en un ambiente controlado con los materiales de estudio, para garantizar la medición de parámetros especiales requeridos para considerar estos cementos como biocompatibles. (8,56,99)

Para llevar a cabo la investigación se empleó el método de contacto indirecto por extractos de acuerdo con el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para test de citotoxicidad *in vitro*. Este tipo de evaluación de biocompatibilidad es comúnmente utilizado por estudios de materiales endodónticos. El ensayo de contacto directo material/células por andamiaje o test directo, es el tipo de estudio que replica mejor las condiciones que se dan *in vivo*, sin embargo, no representa ninguna de las defensas con las que cuenta el organismo, por lo que puede resultar una versión aumentada de lo que ocurriría en la misma situación clínica. No obstante, con el fin de tener también una visión de la prueba directa, en este estudio se realizó una prueba de hemólisis mediante la confección de andamios con los materiales de estudio en contacto con células sanguíneas. (91)

8.1 Sobre los materiales de estudio

Los materiales analizados en este trabajo fueron 3 cementos biocerámicos, a saber, cemento Portland blanco modificado con óxido de zirconia, cemento Portland blanco modificado con sulfato de bario y NuSmile NeoMTA[®]. Estos cementos, a pesar de tener composiciones similares, tienen indicaciones diferentes. El cemento Portland no está aprobado para su uso clínico por la FDA, a pesar de que distintos investigadores concluyen que no hay diferencias significativas en su composición química respecto al mineral trióxido agregado (MTA) y que el cemento Portland es una alternativa clínica viable. Este punto es

controversial, pese a que el CP puede ser fácilmente esterilizado, esto no sugiere que se pueda usar en su estado nativo de manera clínica, ya que cualquier dispositivo médico debe manufacturarse por estrictas regulaciones de acuerdo con la FDA y al Reglamento Europeo para dispositivos médicos; en el caso de México los dispositivos médicos deben ser regulados por la COFEPRIS en conjunto con otras dependencias nacionales e internacionales. (59,60,86,99)

En este estudio utilizamos el cemento Portland blanco, perteneciente a la marca Cruz Azul®; según el fabricante este cemento no presenta propiedades mutagénicas ni carcinogénicas.(101,102) Autores como Coleman, Araki y Hungaro refieren que el cemento Portland blanco es biocompatible, es una alternativa viable al MTA y presenta mejores propiedades idóneas para uso clínico, que el cemento Portland gris. (64,69,103). Sin embargo, el CP por sí solo no presenta la radiopacidad suficiente para visualizar radiográficamente la dentina y las estructuras anatómicas adyacentes, por lo que es necesario añadirle un agente de radiopacidad. En el MTA el agente utilizado radiopacidad es el óxido de bismuto y en el NuSmile NeoMTA® el agente utilizado es la tantalita. En este estudio utilizamos como agentes de radiopacidad para el CP, el óxido de zirconia y el sulfato de bario. Húngaro reportó que el óxido de zirconia y el sulfato de bario presentan menor radiopacidad versus el óxido de bismuto, sin embargo se encuentran dentro de los parámetros de la norma ISO 6876/2001 (mayor a 3mm de aluminio). (103)

En nuestro estudio el cemento que presentó mejores condiciones para la proliferación celular, hemocompatibilidad y diferenciación dentinogénica fue el CPBOZ. El óxido de zirconia como agente radiopacificador parece mejorar la fase de hidratación inicial del cemento Portland blanco, por lo que su incorporación como agente radiopacificador acelera la reacción de fraguado del CP. Según Coleman y Li este fenómeno se debe a que el óxido de zirconia tiene sitios de nucleación heterogéneos para la precipitación del complejo C-S-H, lo cual acelera el fraguado. Otra ventaja según Shin y cols. es que el CPBOZ presenta menos decoloración dental frente a otros agentes como el óxido de bismuto, lo que se traduce en un mejor candidato para emplearse en la práctica clínica. (69,104)

En cuanto al sulfato de bario y la tantalita, coincidimos con Hoekstar y cols. quienes también proponen a estos materiales como agente radiopacificador para biomateriales

endodónticos. Estos investigadores realizaron un análisis *in vivo* en el que concluyeron que no producen alteraciones biológicas, por tanto, son biocompatibles. Por otra parte, Verma y cols. estudiaron las propiedades antibacteriales de pastas antibióticas con los agentes sulfato de bario y óxido de zirconia y entre sus conclusiones mencionan propiedades antibacteriales residuales superiores, al añadir el sulfato de bario. Por su parte la tantalita contenida en el cemento NuSmile NeoMTA® ha sido reportada como un agente biocompatible y que provee buenas características de radiopacidad a los materiales, así como menor pigmentación en los órganos dentarios posterior a su colocación. (105–107)

8.3 Sobre el cultivo de CTPD

En este estudio, fue posible la identificación de las cuatro regiones de la pulpa. La importancia de comprender la organización histotopográfica radica en la posibilidad de correlacionar las regiones con los diferentes tipos celulares presentes en la pulpa dental. En el caso de las CTPD, se localizan en la zona central, tal como lo estableció Goldberg & Smith en el 2004 en su compendio sobre bases para la reparación e ingeniería tisular del complejo dentinopulpar. (108)

El aislamiento celular fue llevado a cabo mediante las técnicas de explante y la técnica de combinación de disgregación mecánica-enzimática, considerando esta última como la más conveniente, debido al menor tiempo de cultivo y menor exposición a la contaminación, coincidiendo con lo reportado por Ortolani, Pecci y Catalá; es importante mencionar que se observaron dos tipos de morfologías celulares obtenidas por la técnica de explante, mientras que en las células obtenidas por la técnica de disgregación enzimática se observó una población celular más heterogénea. Esto puede deberse a que las células obtenidas por el método de explante emergen del tejido adherido a la placa a través de un proceso de migración celular, en contraste con la digestión enzimática que logra la obtención celular producto de la degradación del tejido. (11,78,109)

8.4 Sobre la caracterización inmunofenotípica

Las células analizadas se utilizaron del cuarto pase de cultivo con la finalidad de obtener un cultivo más uniforme, sin embargo, durante la identificación del marcador de superficie de membrana CD73, se manifestaron dos poblaciones celulares positivas de

distintos tamaños. Esto puede deberse a que existen dos poblaciones de células mesenquimales encaminadas a diferentes linajes. Tremain y cols. explican este fenómeno debido a que las células mesenquimales de una misma colonia pueden diferenciarse hacia distintos linajes aún en ausencia de señalización, por medio de un mecanismo intrínseco similar a las células neurales o a las células hematopoyéticas progenitoras. (110)

8.5 Sobre la proliferación de CTPD

Se utilizó la resazurina como ingrediente activo para medir la proliferación celular, el cual fue seleccionado debido a que es un método no destructivo; la resazurina y la resorufina no son citotóxicos, lo que permite prolongar el monitoreo de los cultivos celulares. La literatura avala el uso de este componente en el campo de los biomateriales en la endodoncia, siendo una prueba esencial de citotoxicidad. (111)

Los valores máximos de intensidad de fluorescencia se obtuvieron a las 24 horas de incubación, después de este tiempo disminuyeron paulatinamente, incluso hasta intensidades inferiores a las observadas en las primeras 24 horas de incubación. Esto puede indicar que los cambios en la intensidad de la fluorescencia sólo se pueden apreciar claramente, en las primeras horas posteriores a la adición de la resazurina. Otra explicación por la cual proliferación cesó a las 24 horas es porque probablemente se saturó el sistema por falta de nutrientes, ya que una vez aplicada la resazurina, no se cambió el medio de cultivo y la absorbancia se midió de esta manera durante 7 días. Lo normal es que haya picos de proliferación por el ciclo natural de las células, que aunque si los hubo, no fueron mayores a los de 24 horas. Con un alto número de células, o por periodos extendidos de incubación de varios días, se alcanza el punto donde no hay mayor formación de reducción y la absorbancia empezará a disminuir, por lo tanto, hay una menor lectura de proliferación. (111,112)

Los materiales de estudio CPSB y el NuSmile NeoMTA® en contacto con las CTPD arrojaron datos de una proliferación celular similar al grupo control, por lo que no exhiben un comportamiento de citotoxicidad. Hubo mayor proliferación celular en los materiales de estudio en dilución $\frac{1}{4}$. Esta mejora en la proliferación celular en concentraciones específicas puede deberse probablemente a que a mayor grado de dilución, menor modificación del pH del medio de cultivo y la homeostasis celular se logra con mayor facilidad. (109)

La mejora en la capacidad de proliferación celular de las CTPD también ha sido reportada por Rahimi y cols., quienes evaluaron las propiedades biológicas del cemento Portland blanco con óxido de bismuto y óxido de zirconia, reportando que estos cementos mejoran la proliferación de las CTPD con el tiempo y que al añadir estas partículas radiopacificadores se incrementa la actividad de la enzima ALP, lo que se traduce en una mejora la capacidad odonto/osteogénica. Por su parte Wu y colaboradores evaluaron el efecto biológico de los agentes de radiopacidad óxido de zirconia y sulfato de bario en pastas antibióticas en contacto con las CTPD. Sus resultados sobre proliferación realizada con MTT, reafirman que estos agentes sostienen las condiciones de proliferación celular, sin diferencia estadística del grupo control, tal y como lo reportamos en los grupos con dilución ½ y sin dilución. (113,114)

En este estudio reportamos una mayor proliferación significativa en el grupo de CTPD en contacto con el CPBOZ, coincidiendo con lo reportado por Slompo y cols. y Silva y cols., quienes también reportan la superioridad en la proliferación celular utilizado en contacto con el CPBOZ. A diferencia de nuestro estudio, la población celular que analizaron fueron fibroblastos y observaron que la regresión de la reacción inflamatoria en fue mayor en el grupo de CPBOZ que en el MTA Angelus®. (69,115,116)

Resultados similares obtuvieron en otro estudio realizado por Catalá y cols., quienes analizaron la proliferación celular de CTPD en contacto con biomateriales endodónticos comerciales, que incluían tantalita u óxido de zirconia. Reportaron una adecuada viabilidad celular en los ensayos con MTT, siendo el grupo de CTPD en contacto con óxido de zirconia el grupo donde hubo mayor proliferación celular, similar a los hallazgos en este estudio. Por su parte Siqueira y cols. analizaron la proliferación celular de fibroblastos periodontales con MTT, en contacto con biomateriales endodónticos comerciales con tantalita, óxido de zirconia y óxido de bismuto. Sus resultados arrojaron mayor proliferación en los grupos con óxido de zirconia y óxido de bismuto, mientras que el grupo de tantalita se asemejó más al grupo control. (117,118)

8.6 Sobre la morfología

La morfología celular de las CTPD está relacionada con la función que ésta desempeñe. Las células mesenquimales se diferencian hacia una línea concreta,

dependiendo de las señales que reciben de su entorno, adaptando así su expresión de integrinas, caderinas y proteínas del citoesqueleto. A medida que las CTPD entran en contacto con materiales biocerámicos, se vuelven más alargadas y extendidas. Según los estudios de Kilian y cols., las células mesenquimales que adquieren una forma elongada y estrellada muestran una alta actividad osteogénica. (119)

Las tinciones celulares de este estudio revelaron que tanto en los extractos diluidos, como en los extractos sin diluir, la morfología celular permaneció similar al grupo control sin tratamiento, por lo tanto, a pesar de que las CTPD que se diferenciaron hacia un linaje dentinogénico (células “tipo odontoblasto”), son células mesenquimales que asumen el papel de los odontoblastos, es decir, se convierten en células secretoras de matriz dentinogénica, más no adquieren la morfología exacta de los odontoblastos. (120)

Yu. y cols. realizaron un estudio en el que pusieron en contacto CTPD con medio condicionado con células de gérmenes dentarios, las cuales implantaron en cápsulas renales de rata; entre los resultados de sus tinciones, observaron la neoformación de un complejo dentinopulpar y células diferenciadas hacia una morfología muy similar hacia los odontoblastos y que expresaron la proteína DSPP; entre sus conclusiones manejan que las células del germen dentario tienen las señales químicas más específicas para la diferenciación hacia células odontoblásticas. Si bien en nuestro estudio comprobamos que el CPB con ciertos aditivos, mejora la proliferación y diferenciación dentinogénica, la células estudiadas no modificaron su morfología drásticamente a los 7 días de exposición, por lo que no podemos saber con exactitud si las células diferenciadas son odontoblastos maduros al ser secretoras, o son células “odontoblast like” en proceso de diferenciación. Baume llamaba a la población de células pulpare mesenquimales “pulpoblastos”; con los hallazgos realizados en este estudio es interesante mencionar que los “pulpoblastos” en contacto con los cementos de silicato tricálcico se convierten en “pulpoblastos secretores”, mas no modifican su morfología dramáticamente a pesar de la evidencia de diferenciación dentinogénica. Este fenómeno fue reportado por Neunzehn y cols., quienes evidenciaron con microfotografías de microscopio electrónico de barrido (figura 26), a estas células tipo odontoblastos secretoras tras cultivar células pulpare en secciones de órganos dentarios durante 28 días. (121–123)

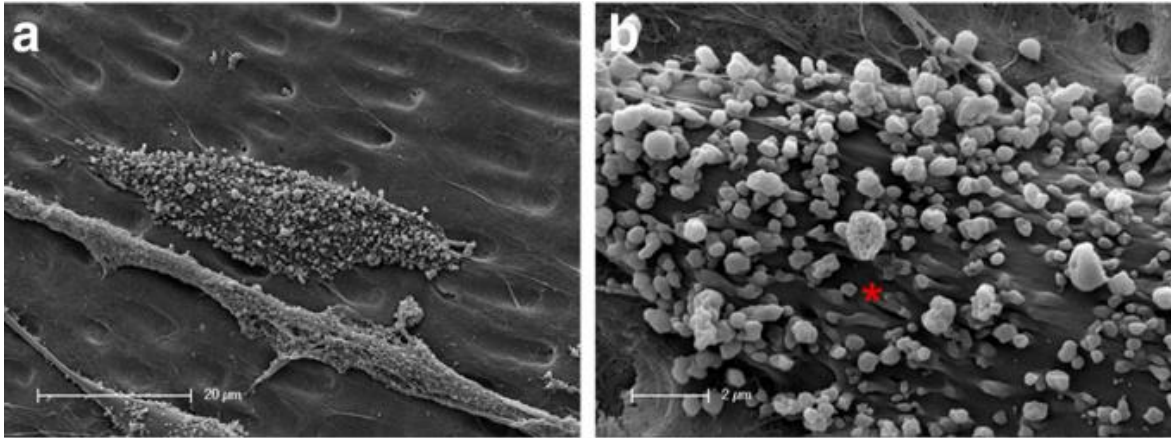


Figura 26. A y B. superficie de células pulpares con partículas minerales en distintas formas y tamaños, así como vesículas de constricción de minerales siendo transportados desde el interior hacia el exterior de la superficie celular (*). Neunzehn (122)

8.7 Sobre la hemocompatibilidad

Uno de los principales propósitos de esta investigación fue evaluar si los materiales de estudio son candidatos para utilizarse en los distintos procedimientos endodónticos. Ya sea una cirugía periapical o un recubrimiento pulpar directo, los biomateriales endodónticos al contacto directo con la sangre y los tejidos periapicales, generan una activación del sistema de coagulación y una respuesta inflamatoria del huésped como mecanismo de defensa. Así pues, la evaluación de la hemólisis es importante. (98)

Un material con óptima hemocompatibilidad debe tener una baja reacción de hemólisis. Sorprendentemente existen materiales endodónticos reportados con un porcentaje de hemólisis mayor a lo permitido. Velásquez realizó una evaluación biológica *in vitro* en la cual analizó los materiales Endobinder y MTA, cuyos porcentajes de hemólisis fueron de 13.2% y 8.5% respectivamente. Estos valores son altos si consideramos el máximo permitido (5%) para un biomaterial según la norma ISO 10993-4 para la evaluación de dispositivos médicos en modelos *in vitro*. Los materiales empleados en nuestro estudio no presentaron valores hemolíticos, a excepción del CPBSB al 20%, lo cual nos advierte a usar con cautela este elemento como agente radiopacificador de cementos biocerámicos, o bien, disminuir su concentración. (89,124)

8.8 Sobre la diferenciación dentinogénica

Las proteínas de las CTPD en contacto con el CPBSB se degradaron en mayor medida que las demás muestras, lo cual ocurrió en las muestras de 7 y 14 días, cuyas células se encontraban en cajas de cultivo separadas, por lo que se infiere la influencia del sulfato de bario en la degradación de proteínas, probablemente por su rápida oxidación o falta de solubilización. Es interesante mencionar que Sik y cols. evaluaron la influencia de partículas de sulfato de bario en osteoblastos, concluyendo que las partículas de sulfato de bario influyen negativamente en las concentraciones de calcio intracelular *in vitro*.(125)

Se ha reportado que el MTA y el CP pueden estimular la diferenciación de células mesenquimales hacia un linaje odonto/osteogénico. Distintos estudios han demostrado la formación de zonas de calcificación al poner en contacto las CTPD con estos materiales; para poder analizar si pertenecen al linaje dentinogénico se emplea la identificación de la proteína DSPP, se considera como una proteína indicativa de biomineralización de la dentina. (14,107,126)

En este estudio encontramos que los cementos CPOZ y NuSmile NeoMTA® expresaron significativamente más proteína DSPP respecto al grupo control sin tratamiento, la cual aumentó respecto al día 7 al 14, coincidiendo con lo reportado por Chang y cols., quienes evaluaron el potencial odontogénico de cementos de MTA y concluyeron que la expresión de marcadores odontogénicos aumenta con el tiempo de exposición. (17)

Es importante mencionar que el peso de la banda esperada correspondiente a la proteína DSPP es de 110 kDa, sin embargo, las membranas de 7 y 14 días presentaron bandas de aproximadamente 35, 72 y 230 a 270 kDa, esto puede deberse a que la secuencia utilizada para el anticuerpo policlonal correspondiente al extremo amino DSP (figura 27), puede estar dando señales de la proteína DSPP modificada o proteolizada debido a cambios postraduccionales aún no esclarecidos. (127)

10	20	30	40	50	660	670	680	690	700
MKIITYFCIW	AVAWAIPVPQ	SKPLERHVEK	SMNLHLLARS	NVSVQDELNA	SDNSDSSDSS	NSSNSDSSD	SSDSSDSSSS	SDSSNSDSS	DSSDSSNSSE
60	70	80	90	100	710	720	730	740	750
SGTIKESGVL	VHEGDRGRQE	NTQDGHKGE	NGSKWAEVGG	KSFSTYSTLA	SSDSSDSSDS	DSSDSSDSS	SNSSDSSDSS	SSDSSDSSNS	SDSSDSSDSS
110	120	130	140	150	760	770	780	790	800
NEEGNIEGWN	GDTGKAETYG	HDGIHGKEEN	ITANGIQGQV	SIIDNAGATN	NSSDSSDSSD	SSNSDSSDSS	SDSSDSSDSS	NSSDSDSSN	SSDSSDSSNS
160	170	180	190	200	810	820	830	840	850
RSNTNGNTDK	NTQNGDVGDA	GHNEDEVAVVQ	EDGPQVAGSN	NSTDNEDEII	SDSSNSDSSD	DSSDSSDSSD	SNSSDSSNS	DSSDSSNSSD	SSDSSDSSDG
210	220	230	240	250	860	870	880		890 900
ENSCRNEGNT	SEITPQINSK	RNGTKAEAVT	PGTGEDAGLD	NSDGSPSGNG	SDSSNSRSD	SNSSDSSDSS	SDSSNSDSSD	DSSDSSNESS	SSDSSDSSNS
260	270	280	290	300	910	920	930	940	950
ADEDEDESG	DDEDEEAGNG	KDSSNNSKQG	EGQDHGKEDD	HDSSIGQNSD	SDSSDSSDSS	SSDSSDSSNS	SDSSSSNS	DNSNSDSSN	SSDSSDSSDS
310	320	330	340	350	960	970	980		990 1000
SKEYYDPEGK	EDPHNEVDGD	KTSKSEENSA	GIPEDNGSQR	IEDTQKLNHR	SNSSDSSNS	DSSNSDSSD	SNSSDSSDSS	NSSDSSDSSD	SSDSSDSSDS
360	370	380	390	400	1010	1020	1030	1040	1050
ESKRVENRIT	KESETHAVGK	SQDKGIEIKG	FSSGNNRNTK	EVGKNEGKE	SNSSDSSDSS	DSSDSSNSD	SNSSDSSNS	SDSSDSSDSS	DSSDSSDSSD
410	420	430	440	450	1060	1070	1080	1090	1100
DKGQHGMLG	KGNVKTQGEV	VNIEGPGQKS	EPGNKVGHSN	TGSDNSDGY	SSDSSNSDSS	SDSSDSSDSS	DSSDSSDSSD	SSESSDSSD	SNSSDSSDSS
460	470	480	490	500	1110	1120	1130	1140	1150
DSYDFDDKSM	QGDDPNSSDE	SNGNDDANSE	SDNNSSSRGD	ASNSDES	DSSDSSDSSD	SSDSSDSSD	SNSSDSSDSS	DSSDSSDSSN	SSDSSDSSSE
510	520	530		540 550	1160	1170	1180	1190	1200
NGNGSDSKGA	EDDDSDSTSD	TNNSDNGNG	NNGNDDNDKS	DSGKGS	SDSSDSSDSS	DSSDSSDSSD	SSDSSDSSNS	SDSSDSSDSS	DSSDSSDSSD
560	570	580	590	600	1210	1220	1230	1240	1250
DSDSSDSSNS	SDSSDSSDSD	SSDSSDSSD	DSSDSSDSSD	SDSSDSSDSS	SSDSSDSSD	SDSSDSSDSS	DSSDSSDSSD	SNSSDSSDSS	SDSSDSSNS
610	620	630	640	650	1260	1270	1280	1290	1300
SSDSSDSSD	SDSSDSSDSS	DSKSDSSKSE	SDSSDSDSSK	DSSDSSNSD	DSSDSSDSSD	STSDSNDES	SQSKSGN	NGSDSDSDSE	GSDSNHSTSD

D

Figura 27. Secuencia completa de la proteína DSPP obtenida de la base de datos Uniprot. En amarillo la secuencia utilizada para la creación del anticuerpo policlonal DSPP. En fucsia la secuencia correspondiente a la proteína intermedia DGP, dividiendo a los subproductos DSP y DPP.

Yamakoshi y Simmer explicaron este fenómeno debido a que la proteína DSPP puede expresarse como precursora o completa, presentar modificaciones postraduccionales y presentar variantes hidrolizadas de la proteína precursora. Estos investigadores han analizado la proteína DSPP porcina y sus derivados por más de 15 años y entre sus hallazgos concluyen que la proteína completa DSPP es secretada por los odontoblastos y proteolizada por en 3 proteínas, a saber, sialoproteína dentinaria (DSP), glicoproteína dentinaria (DGP) y fosfoproteína dentinaria (DPP). Las proteínas encargadas de este procesamiento proteolítico son la proteína morfogenética ósea 1 (BMP1) y la metaloproteína de matriz 20 y 2 (MMP20 y MMP2). La variante DSP es un proteoglicano que forma dímeros covalentes, se puede presentar en 3 isoformas y se puede proteolizar para expresarse como una DSP de bajo peso molecular (figura 28). La DGP es una glicoproteína fosforilada mientras que la DPP proteína desordenada altamente fosforilada con polimorfismos genéticos. Otra de sus conclusiones es que la DPP no es detectable en tejido pulpar posiblemente por la existencia de 2 variantes de mRNA del gen DSPP. Uno de estos polimorfismos codifica para la expresión de la DSP en tejido pulpar y odontoblastos y la otra variación codifica para la proteína precursora DSPP, expresada primordialmente en odontoblastos y de manera escasa en tejido pulpar. (127)

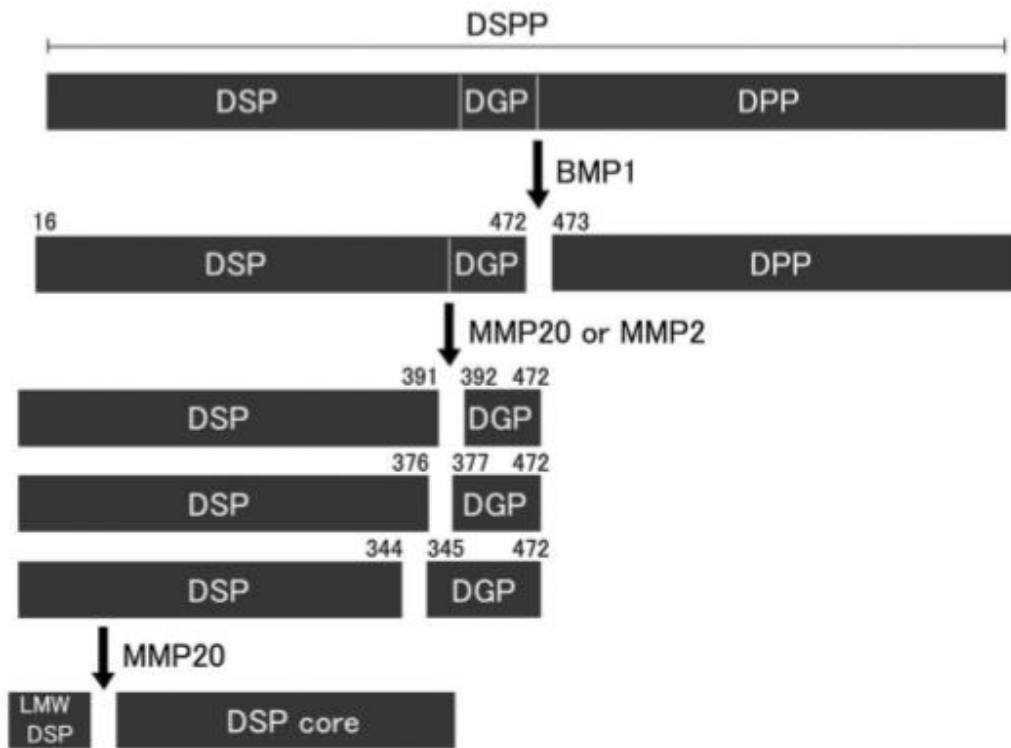


Figura 28. Proteólisis de la proteína DSPP porcina. Modelo propuesto por Yamakoshi y Simmer.

(126)

De acuerdo con nuestros hallazgos sobre la detección de bandas distintas al peso esperado (identificadas por el anticuerpo marcado con la secuencia de DSP) y a lo reportado por Yamakoshi y Simmer, podemos elucidar ciertas ideas de lo que podrían significar esas bandas encontradas:

- La proteína DSPP completa sin proteolizar en agregados o dímeros (bandas de 230 a 270 kDa)
- Una de las isoformas de DSP (37 o 72 kDa)
- La proteína DSP+DGP sin el extremo carboxilo DPP (72 kDa)
- Una de las isoformas de DSP proteolizada por MMPP hacia una DSP de bajo peso molecular (35 kDa).

Es importante mencionar que la proteína constitutiva histona H3 se expresó únicamente en las CTPD con CPBOZ y NuSmile NeoMTA®, mas no en el grupo de CTPD sin tratamiento; de acuerdo con los resultados de la colorimetría con azul de Coomassie, las proteínas de estas muestras no se encontraban degradadas, por lo que esto puede deberse a que las Histonas no se solubilizaron durante la aplicación del buffer RIPA® en las

muestras de CTPD utilizadas en el experimento. Las Histonas han sido ampliamente utilizadas como control de carga de muestras proteica nucleares e incluso citoplásmicas, sin embargo, Janes explica en su investigación sobre factores críticos de la inmunotransferencia, que al utilizar el buffer RIPA® durante la extracción de muestras proteicas, se solubilizan muchas pero no todas las proteínas celulares, entre ellas, la Histona H3. De ser así, el anticuerpo constitutivo seleccionado para CTPD debería ser uno citoplasmático o seleccionar o complementar al buffer de extracción con inhibidor de proteasas y/o fosfatasas. (128–130)

IX. CONCLUSIONES

- Se acepta la hipótesis de que el CPBOZ y el NuSmile NeoMTA[®] mejoran la proliferación de las CTPD, son hemocompatibles e inducen la diferenciación dentinogénica
- El CPBSB mejora la proliferación de las CTPD, sin embargo se rechaza la hipótesis de que el CPBSB es hemocompatible (en concentración de 20%) e induce la diferenciación dentinogénica.
- La morfología celular normal de las CTPD no fue alterada con ninguno de los materiales de estudio, por lo que se concluye que las CTPD al contacto con el CPBOZ, CPBSB o el NuSmile NeoMTA[®] se convierten en “pulpoblastos secretores” y no en odontoblastos maduros a los 7 días de interacción.
- El material con mejor comportamiento en la evaluación *in vitro* fue el CPBOZ, por lo que se puede adoptar como un candidato para terapias de endodoncia regenerativa, ya que mejora la proliferación de células pulpares, no es hemolítico, es accesible e induce la diferenciación dentinogénica.
- Los hallazgos de la inmunodetección de la proteína DSPP sugiere que esta sufre cambios postraduccionales importantes, que deben ser tomados en cuenta para investigaciones futuras sobre la conversión de “pulpoblastos secretores” a “odontoblastos maduros” y otras células de interés para la endodoncia regenerativa.

X. PERSPECTIVAS

Con base en los hallazgos de este estudio se puede sugerir la implementación del material CPBOZ al 10% como candidato a protocolos de tratamiento restaurativo atraumático (TRA), adicional a los usos potenciales en endodoncia regenerativa. Los TRA actualmente manejados por la Secretaría de Salud del país, son realizados con materiales con menos propiedades bioactivas que los utilizados en este estudio. En orden de poder realizar esta sugerencia, se requieren estudios *in vivo*, así como también de mutagenicidad y carcinogenicidad para comparar la respuesta del complejo dentinopulpar frente a los ionómeros utilizados actualmente en estos procedimientos.

Los resultados de la inmunodetección proteica de este estudio reafirman la teoría de que la proteína DSPP presenta isoformas distintas que interfieren y participan en el proceso de biomineralización, por lo tanto, es indispensable mantener los estudios en esta área para mejorar el entendimiento hacia una regeneración del complejo dentinopulpar más organizada.

Para minimizar los posibles errores en la detección de nuestra proteína de interés, proponemos repetir el ensayo de Western Blot, utilizando un buffer de extracción con inhibidor de proteasas y fosfatasas para las muestras celulares y utilizar un anticuerpo de control de carga citoplasmático.

Otra perspectiva de nuestra investigación para ayudar a entender la regeneración endodóntica es analizar y comprender las vías de señalización de las CTPD en su estado natural, en interacción con los demás componentes de los órganos dentarios y no únicamente con los biomateriales endodónticos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moncada G, Urzúa I. Cariología Clínica Bases Preventivas y Restauradoras. Primera Ed. Moncada GUI, editor. Santiago-Chile; 2008.
2. Villaizán Pérez C, Aguilar Roldán M. Estudio de la prevalencia de caries y su relación con factores de higiene oral y hábitos cariogénicos en escolares. Rev Latinoam Ortod y Odontopediatría. 2012;1–14.
3. Díaz Reissner C, Pérez Bejarano N, Sanabria Vázquez D, Urquhart Barreto DA, Arce Mena MM, Ledesma Amarilla LE. Nivel de conocimiento sobre prevención de caries dental en universitarios. CES Odont. 2016;29(1):14–21.
4. Petersen PE, Bourgeois D, Bratthall D, Ogawa H. Oral health information systems — towards measuring progress in oral health promotion and disease prevention. Bull World Health Organ. 2005;83(9):686–93.
5. Chen SC, Chueh LH, Hsiao CK, Wu HP, Chiang CP. First Untoward Events and Reasons for Tooth Extraction after Nonsurgical Endodontic Treatment in Taiwan. J Endod. 2008;34(6):671–4.
6. Nadeau B, Chen Z, Kishen A. Free Water Loss–induced Heterogeneous Residual Strain and Reduced Fatigue Resistance in Root Dentin: A 3-dimensional Digital Image Correlation Analysis. J Endod. 2019;45(6):742–9.
7. Landys Borén D, Jonasson P, Kvist T. Long-term survival of endodontically treated teeth at a public dental specialist clinic. J Endod. 2015;41(2):176–81.
8. Bansal R. Regenerative Endodontics: A Road Less Travelled. J Clin Diagnostic Res. 2014;8(10):ZE20–4.
9. Gong T, Heng BC, Lo ECM, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. Stem Cells Int. 2016;2016(1).
10. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. Int Endod J. 2018;51(12):1367–88.
11. Pecci M. Citocompatibilidad de dos nuevos cementos de ionómero de vidrio (GICS) en células madre de pulpa dental [tesis doctoral]. Universidad de Murcia; 2017.
12. Viña AJ. Obtención y caracterización de células madre de pulpa dental humanas e interacción con β -fosfato tricálcico [tesis doctoral]. Universidad de Valencia; 2013.
13. Peralta E. Frecuencia del éxito de tratamiento endodonto peralta [tesis de especialización]. Universidad Autónoma de Yucatán; 2016.

14. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014;40(1):113–8.
15. Monea M, Bereşescu G, Stoica A, Ştefănescu T. Biocompatibility of Calcium Hydroxide - Based Root Canal Sealers: A Histological Study. *Key Eng Mater.* 2016;695:243–6.
16. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med.* 2015;11(1):16.
17. Chang K, Chang C, Huang Y, Chen M, Lin F, Lin C. Effect of Tricalcium Aluminate on the Physicochemical Properties, Bioactivity, and Biocompatibility of Partially Stabilized Cements. 2014;9(9).
18. Rodríguez-villalobos DP. Propiedades y Usos en Odontopediatría del MTA (Agregado de Trióxido Mineral). *Publ Cient Fac Odontol UCR.* 2011;13(2006):65–9.
19. Xu Z, Xu Z. Is MTA finally affordable for pediatric pulp therapy? Is MTA finally affordable for pediatric pulp therapy? *Dent Econ.* 2016;
20. Reyes L, Carrazana M. Complejidad del tratamiento endodóntico, según factores asociados. *Rev Cuba Estomatol.* 2016;53(2):2–9.
21. Torabinejad M, Walton R. *Endodoncia, principios y práctica.* 4a ed. Elsevier, editor. España; 2010.
22. Barreiro S. Estudio piloto del cemento portland en el tratamiento de pulpotomía en molares temporales [tesis de maestría]. Universidad Complutense de Madrid; 2009.
23. Glickman G. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: Background and Perspectives. *J Endod.* 2009;35(12):1619–20.
24. Langer R, Vacanti J. *Tissue Engineering.* *Sci New Ser.* 1993;260(5110):920–4.
25. Denia D, Navarro M. Medicina regenerativa en estomatología Regenerative medicine in stomatology. 2014;51(3):412–29.
26. Ochoa S, Aguilar N, Méndez A. Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investig Cienc.* 2012;23(64):61–9.
27. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod.* 2012;38(6):864–8.
28. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GTJ. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2010;36(1):56–

63.

29. Bertó Botella A, Miñana Laliga R. Revascularización pulpar en dientes permanentes inmaduros con periodontitis apical. *Gac Dent*. 2016;23(3):177–87.
30. Gómez F. Actualización sobre la Evidencia Histológica de los Tejidos Formados Mediante Terapia de Regeneración Pulpar Guiada. *Int J Med Surg Sci*. 2016;3(2):881–8.
31. Alexandra M, Suárez O, Miguel J, Andrade M, Flores DS, Isaac B, et al. Medicación intraconducto utilizada para revascularización de dientes necróticos y formación radicular incompleta. *Rev ADM*. 2015;72(3):124–8.
32. Dudeja PG, Grover S, Srivastava D, Dudeja KK, Sharma V. Pulp Revascularization- It's your Future Whether you Know it or Not? *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):ZR01-4.
33. Moradi S, Talati A, Forghani M, Hossein A, Naseri M, Shojaeian S. Immunohistological Evaluation of Revascularized Immature Permanent Necrotic Teeth Treated by Platelet-Rich Plasma: An Animal Investigation. *cell J*. 2016;18(3):389–96.
34. Nygaard B, Hjtordal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Eur J Oral Sci*. 1971;79(3):333–49.
35. Santiago E, Al E. Regeneración endodóntica con células madre. *Medisan*. 2014;18(12):1748–58.
36. Mar J, Correa A, Marb R, Morffi I, Ortiz I. Complejo dentino pulpar . Estructura y diagnóstico. *REMIJ*. 2011;12(1):82–99.
37. Electron Micrographs from the Human Body Microphotographs from the human body <https://www.eyeofscience.de/medicine/>. 2020.
38. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625–30.
39. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res*. 2010;51(5):404–17.
40. Li W, Chen L, Chen Z, Wu L, Feng J, Wang F, et al. Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. *Nature*. 2017;7(1):300.
41. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of Mineralization Markers in Dental Pulp Cells. *J Endod*. 2007;33(6):703–8.
42. Lewis R. Human Genetics : Concepts and Applications. *Primisonline.com*. 1976;475.
43. Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Martens L, De Coster P. Gene expression

profiling and molecular signaling of dental pulp cells in response to tricalcium silicate cements: A systematic review. *J Endod.* 2015;41(11):1805–17.

44. Valencia R, Espinosa R, Nario H. Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primario y permanentes. *RODYB.* 2013;II(2):1–33.
45. Otero-mendoza LM. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *CES Odontol.* 2015;28(2):20–34.
46. Aljamie M, Alessa L, Noah R, Elsayed L. Dental Pulp Stem Cells , a New Era in Regenerative Medicine : A Literature Review. *SCIRP.* 2016;(6):155–63.
47. Barbich M. Formación de tejido óseo a partir de células madre de pulpa dental. *Actual osteol.* 2015;11(3):220–6.
48. Ustiashvili M, Kordzaia D, Mamaladze M, Jangavadze M, Sanodze L. Investigation of functional activity human dental pulp stem cells at acute and chronic pulpitis. *Georgian Med News.* 2014;9(234):19–24.
49. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
50. Ibaceta Pavez A, Suazo Candia Catherine. Estudio de la capacidad inmunomoduladora de las células madre mesenquimales murinas en ausencia de los receptores TLR3 y TLR4: Evaluación en modelo experimental de colitis aguda [tesis de especialización]. Universidad Andrés Bello; 2016.
51. Healy KE, Rezania A, Stile RA. Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;875:24–35.
52. Ratner BD. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 3a ed. Press A, editor. Burlington; 2013.
53. Fernandez J, Maresca B, Sabaté R. Reparación postendodóntica por regeneración de tejidos. *RAAO.* 2012;L(3):43–50.
54. Sánchez CC. Materiales restauradores con reincidencia de caries Parte II: Conceptos actuales. *Rev ADM.* 2008;65(6):314–21.
55. Schmidlin PR, Zehnder M, Schlup-Mityko C, Göhring TN. Interface evaluation after manual and ultrasonic insertion of standardized class I inlays using composite resin materials of different viscosity. *Acta Odontol Scand.* 2005 Aug;63(4):205–12.
56. Tanomaru M, Viapiana R, J G. From MTA to New Biomaterials Based on Calcium Silicate. *Int J Oral Sci.* 2016;18(1):18–22.

57. Brito T, Olano T, Teixeira L, Ramos C, Kenji C. Actividad antimicrobiana y biocompatibilidad de los cementos endodónticos a base de hidróxido de calcio. *Rev ADM*. 2016;73(2):60–4.
58. Rodriguez G, Álvarez M, García J, Arias S, Más M. El hidróxido de calcio: su uso clínico en la endodoncia actual. *AMC*. :143–52.
59. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993;19(11):541–4.
60. Torabinejad M, Hong C, Lee S. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. *J Endod*. 1995;21(12):603–8.
61. Forero J, Niño JL, Olaya AC, Cárdenas J, Guevara AF, González HP, et al. Análisis de la composición química de los cementos tipo MTA y Portland tipo I. *Rev salud bosque*. 3(2):17–22.
62. Flores Ledesma A, Barcelo Santana F, Bucio Galindo L, Arenas Alatorre J, Ruvalcaba Sil J. Elemental chemical composition and phase analysis by means of PIXE, DSC, TGA and DRX of MTA Angelus and a White Portland Cement. *Rev Odont Mex*. 2016;20(3):182–6.
63. Aponte R, Caudet S, De Ribot D, Mallart V, Queralt R, Veiga M, et al. Práctica in citro con cemento Portland previo al uso de MTA en pacientes. *Endodocia*. 2004;22(4).
64. Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod*. 2005;31(8):605–7.
65. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2004;98(3):376–9.
66. Erazo Paredes CH. Efecto osteoinductor del mta y cemento portland en un modelo experimental de lesión en mandibula de conejo [tesis de licenciatura]. 2015.
67. Sthephani L, Soriano M, Asesor L, Luis D, Castillo O, Coasesor S. Efecto inhibitorio in vitro del cemento Portland y del MTA sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [tesis de licenciatura]. Universidad Privada Antenor Orrego; 2016.
68. O'Beirne JL, Shelton RM, Lumley PJ, Hofmann MP. Influence of accelerated setting using plaster of Paris addition on long term properties of Portland cement based dental material. *Adv Appl Ceram*. 2011;110(3):157–61.
69. Coleman NJ, Li Q. The impact of zirconium oxide radiopacifier on the early hydration

- behaviour of white Portland cement. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(1):427–33.
70. Negrete Valderrama PE. Evaluación de la radiopacidad de cementos de silicato de calcio [tesis de licenciatura]. Universidad de Chile; 2017.
 71. Martínez F. Estudio de biocompatibilidad de dos composites de baja contracción sobre células madre de origen dental [tesis doctoral]. Universidad de Murcia; 2009.
 72. Witherspoon DE. Vital Pulp Therapy with New Materials: New Directions and Treatment Perspective-Permanent Teeth. *J Endod*. 2008;34:S25–8.
 73. Hincapié Narváez S, Lis A, Rodríguez V. Biodentine: A New Material for Pulp Therapy. *Univ Odontol*. 2015;34(73):69–76.
 74. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc*. 1966;34(9):449–51.
 75. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976–81.
 76. Li C-H, Wang S-M, Lin C-H, Liu J-C, Lee C-H, Chen G-S. The growth of dental pulp stem cells in portland cement micro-environment. *J Med Sci*. 2015;35(2):62.
 77. Min KS, Lee SI, Lee Y, Kim EC. Effect of radiopaque Portland cement on mineralization in human dental pulp cells. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;108(4):82–6.
 78. Ortolani P. Evaluación del efecto de los selladores con base de biosilicatos en células madre de origen dental [tesis doctoral]. Universidad de Valencia; 2015.
 79. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605–15.
 80. Liu C, Huang T-H, Hung C-J, Lai W-Y, Kao C-T, Shie M-Y. The synergistic effect of fibroblast growth factor-2 and mineral trioxide aggregate on a osteogenic accelerator in vitro. *Int Endod J*. 2014;
 81. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod*. 2014;40(3):387–92.
 82. Min KS, Yang SH, Kim EC. The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells.

- J Endod. 2009;35(6):847–51.
83. Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2013;46(10):923–9.
 84. Lai W-Y, Kao C-T, Hung C-J, Huang T-H, Shie M-Y. An evaluation of the inflammatory response of lipopolysaccharide-treated primary dental pulp cells with regard to calcium silicate-based cements. *Int J Oral Sci*. 2014;6(2):94–8.
 85. Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of Calcium and Silicate Cement and Mineral Trioxide Aggregate Biologic Effects and Bone Markers Expression in MG63 Cells. *J Endod*. 2009;35(5):682–5.
 86. Chang KC, Chang CC, Huang YC, Chen MH, Lin FH, Lin CP. Effect of tricalcium aluminate on the physicochemical properties, bioactivity, and biocompatibility of partially stabilized cements. *PLoS One*. 2014;9(9).
 87. Alemán S, González G, Barredo F. Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotechnol Veg*. 2002;2:51–6.
 88. Barrera Ramírez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Zamora AC, Gómez Arroyo F, Del Rosario Sainz Espuñes T, et al. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2004;17(1):42–55.
 89. Walin R. A Practical Guide to ISO 10993-12: Sample Preparation and Reference Materials. MDDI. 1998;1–34.
 90. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 1997;204(2):205–8.
 91. ISO. International Standard ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2016. p. 2–7.
 92. Cannova D, Brito E, Simons MI. Evaluación de técnica de coloraciones para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Salud*. 2016;20(2):24–9.
 93. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429–34.
 94. Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248–54.
 95. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;225:538–9.
96. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350–4.
 97. ISO. ISO 10993-4. Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood. 61010-1 © Iec:2001. 2002. p. 13.
 98. Santillana RA, Garc LA, Cruz BR. Bioactividad y pruebas de hemólisis de compósitos de hidroxiapatita zirconia (HAp/ZrO₂-8Y₂O₃) para implantes óseos. *Rev Mex Ing Biomédica*. 2018;39(3):272–80.
 99. Turka T, Fidlerb A. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on push-out bond strength of MTA and Biodentine. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2016;30(1):140–4.
 100. Islam I, Kheng Chng H, Jin Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod*. 2006;32(3):193–7.
 101. Gminski R, Tang T, Mersch-Sundermann V. Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicol Lett*. 2010;196(1):33–41.
 102. Van Berlo D, Haberzettl P, Gerloff K, Li H, Scherbart AM, Albrecht C, et al. Investigation of the cytotoxic and proinflammatory effects of cement dusts in rat alveolar macrophages. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(9):1548–58.
 103. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD ar., Vivian RR, Guerreiro Tanomaru JM, Filho MT, de Moraes IG. Radiopacity of Portland Cement Associated With Different Radiopacifying Agents. *J Endod*. 2009;35(5):737–40.
 104. Kang SH, Shin YS, Lee HS, Kim SO, Shin Y, Jung IY, et al. Color Changes of Teeth after Treatment with Various Mineral Trioxide Aggregate-based Materials: An Ex Vivo Study. *J Endod*. 2015;41(5):737–41.
 105. Verma R, Fischer BI, Gregory RL, Yassen GH. The Radiopacity and Antimicrobial Properties of Different Radiopaque Double Antibiotic Pastes Used in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2018;44(9):1376–80.
 106. Hoekstra JWM, Van Den Beucken JJJP, Leeuwenburgh SCG, Bronkhorst EM, Meijer GJ, Jansen JA. Tantalum oxide and barium sulfate as radiopacifiers in injectable calcium phosphate-poly(lactic-co-glycolic acid) cements for monitoring in vivo degradation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(1):141–9.
 107. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al.

Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017;50:e31–9.

108. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):13–27.
109. Catala J. Estudio in vitro de la Citotoxicidad de Materiales Biocerámicos Utilizados en Endodoncia sobre Células Mesenquimales de Origen dental [tesis de doctorado]. Vol. 281. Universidad de Murcia; 2019.
110. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG. MicroSAGE Analysis of 2,353 Expressed Genes in a Single Cell-Derived Colony of Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals mRNAs of Multiple Cell Lineages. *Stem Cells.* 2001;19(5):408–18.
111. Escobar L, Aristizábal F. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae.* 2010;17(2):173–80.
112. Al-Nasiry S, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1304–9.
113. Rahimi S, Salarinasab S, Ghasemi N, Rahbarghazi R, Shahi S, Salem milani A, et al. In vitro induction of odontogenic activity of human dental pulp stem cells by white Portland cement enriched with zirconium oxide and zinc oxide components. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2019;13(1):3–10.
114. Wu JL, McIntyre PW, Hong JM, Yassen GH, Bruzzaniti A. Effects of Radiopaque Double Antibiotic Pastes on the Proliferation, Alkaline Phosphatase Activity and Mineral Deposition of Dental Pulp Stem Cells. *Arch Oral Biol.* 2020;117(May):104764.
115. Slompo C, Peres-Buzalaf C, Gasque KC da S, Damante CA, Ordinola-Zapata R, Duarte MAH, et al. Experimental calcium silicate-based cement with and without zirconium oxide modulates fibroblasts viability. *Braz Dent J.* 2015;26(6):587–91.
116. Silva GF, Bosso R, Ferino R V., Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(12):4336–45.
117. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.*

- 2018;44(1):126–32.
118. Pinheiro LS, Iglesias JE, Boijink D, Mestieri LB, Poli Kopper PM, Figueiredo JA de P, et al. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study. *J Endod.* 2018;44(7):1140–5.
 119. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):4872–7.
 120. Peydró S. Regeneración Tisular: Estudio De La Diferenciación in Vitro De Las Células Madre De La Pulpa Dental [tesis doctoral]. Universidad de Valencia; 2015.
 121. Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng.* 2006;12(11):3097–105.
 122. Baume LJ. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monogr Oral Sci.* 1980;8:1–220.
 123. Neunzehn J, Pötschke S, Hannig C, Wiesmann HP, Weber MT. Odontoblast-like differentiation and mineral formation of pulpsphere derived cells on human root canal dentin in vitro. *Head Face Med.* 2017;13(1):1–10.
 124. Barruecos C, Cortes M. Evaluación biológica in vitro de un nuevo cemento a base de aluminato de calcio [tesis de maestría]. Universidad CES; 2019.
 125. Yong Sik Kim, Young Kyun Woo, Jin Wha Chung, Seong Chul Yang, Soon Yong Kwon, Eun Jung Lee KHL. Effect of BaSO₄ in Bone Cement on Rat Osteoblast. *J Korean Orthop Reaserch Soc.* 2002;5(1):20–5.
 126. Benetti F, Queiroz ÍO de A, Cosme-Silva L, Conti LC, Oliveira SHP de, Cintra LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. *Braz Dent J.* 2019;30(4):325–32.
 127. Yamakoshi Y, Simmer JP. Structural features, processing mechanism and gene splice variants of dentin sialophosphoprotein. *Jpn Dent Sci Rev.* 2018;54(4):183–96.
 128. Cetenovic B, Prokic B, Vasilijic S, Dojcinovic B, Magic M, Jokanovic V, et al. Biocompatibility Investigation of New Endodontic Materials Based on Nanosynthesized Calcium Silicates Combined with Different Radiopacifiers. *J Endod.* 2017;43(3):425–32.
 129. Diao S, Yang DM, Dong R, Wang LP, Wang JS, Du J, et al. Enriched trimethylation of lysine 4 of histone H3 of WDR63 enhanced osteogenic differentiation potentials of

stem cells from apical papilla. *J Endod.* 2015;41(2):205–11.

130. Janes KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Sci Signal.* 2015;8(371):1–12.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mérida, Yucatán, México, a ___ de _____ del año _____

Título de proyecto: “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES DE LA PULPA DENTAL EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES CEMENTO PORTLAND Y NUSMILE NEOMTA®”

Dependencia o Institución de procedencia: Facultad de Odontología UADY

Nombre del investigador principal: C.D.E.E. América Portillo Recio

A quien corresponda:

Yo _____, declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado: “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES DE LA PULPA DENTAL EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES CEMENTO PORTLAND Y NUSMILE NEOMTA®”, cuyo responsable es la C.D.E.E. América Portillo Recio, alumna de la Maestría en Investigación en salud, bajo la dirección de la Dra. Elma M. Vega Lizama (Investigadora de la Facultad de Odontología de la UADY) y de la Dra. Eugenia Del S. Guzmán Marín (Investigadora del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi). El objetivo general de este trabajo es realizar una evaluación *in vitro* de células troncales provenientes de la pulpa dental, en presencia de cementos de silicato tricálcico hidráulicos, con la finalidad de ayudar a contribuir en la mejora de los tratamientos odontológicos, en especial en aquellos dirigidos a la reparación y regeneración la pulpa dental.

Estoy de acuerdo en contestar un cuestionario y acepto donar mis dientes que por motivos odontológicos ajenos a esta investigación sean extraídos de mi cavidad oral. Me han explicado que, en caso de aceptar participar en el estudio, mis dientes no serían desechados o desperdiciados, sino que serían llevados a un laboratorio, donde los investigadores los utilizarían para obtener sus células pulpares; posteriormente estas células obtenidas se pondrían en contacto con cementos tricálcicos y así realizar distintas evaluaciones *in vitro*, que permitirían contribuir a mejorar los tratamientos de pacientes cuya pulpa dental está comprometida.

Se me ha informado que no esase ningún riesgo o complicación al participar en este estudio, asi como tampoco me implica ningún costo ni remuneración económica.

Comunico que se me han informado los objetivos de la investigación, la justificación (propósito), los beneficios que se obtendrán de mi participación, y la descripción de los procedimientos a realizar.

Después de haber leído este documento manifiesto que la información presentada es clara para mí, por lo que estoy de acuerdo en ingresar y ser parte del estudio de investigación.

Manifiesto que es de mi conocimiento que estoy en libertad de retirarme del estudio en el momento en que yo así lo desee, sin menoscabo de la atención que recibo. Así como que la información será maneja con una estricta ética de confidencialidad y discreción de todos los datos personales.

Finalmente, hago mención de que estoy enterado(a) de que podré solicitar, en cualquier momento, información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio dirigiéndome a la C.D.E.E. América Portillo Recio al celular 9991293981, o al correo electrónico americaportillo@hotmail.com; para obtener la información o una cita para que esta sea ampliada.

Nombre _____

Firma _____

En caso de ser menor de Edad, Nombre y Firma del padre o tutor legal

Nombre testigo1: _____ Firma: _____

Nombre testigo 2: _____ Firma: _____

Las investigadoras se han comprometido a darme información oportuna sobre los procedimientos, así como a responder y aclarar dudas relacionadas con el proyecto. Para cualquier aclaración posterior o en caso de desear ser excluido del proyecto comunicarse con la C.D. América Portillo Recio al siguiente teléfono: 9991293931 o correo electrónico americaportillo@hotmail.com.

Yo, voluntariamente estoy de acuerdo en firmar este formulario y doy libremente mi consentimiento para participar en este estudio.

Firma o huella del paciente Firma del responsable

Firma o huella del testigo