

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE LA PAPILA APICAL  
EXPUESTAS A PASTA TRIANTIBIÓTICA Y ENDOSEQUENCE. ESTUDIO *EX VIVO*

KATHERINE DIOSA CRUZ  
XIMENA RAMÍREZ BALLESTEROS  
VERÓNICA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE ODONTÓLOGO GENERAL

ASESOR

CAMILO ANDRÉS ALFONSO RODRÍGUEZ

Odontólogo Especialista en Endodoncia

Máster en Biomedicina Regenerativa

Ph. D Biomedicina-Ingeniería Tisular

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

INGENIERIA TISULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

BOGOTÁ

2019

## Nota de Aceptación

El trabajo de grado titulado: Evaluación de la viabilidad de células de la papila apical expuestas a pasta triantibiótica y endosequence. Estudio ex vivo  
Elaborado por: Katherine Diosa Cruz, Ximena Ramírez Ballesteros, Verónica Sánchez Hernández, el cual ha sido aprobado como requisito parcial para optar el título de Odontología general.

---

Firma presidente del jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

Bogotá, D.C Noviembre del 2019

**Dedicatoria.**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la oportunidad de hacer parte de este equipo, a mis padres por ser los pilares más importantes y por demostrar siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias, al grupo de docentes que estuvieron apoyándome en este proceso.

**Katherine Diosa Cruz**

Dedico esta tesis primero a Dios, quien inspiró mi espíritu para la realización de este maravilloso estudio, por darme salud, sabiduría, ciencia y bendición para alcanzar mis metas como persona y como profesional. También dedico este trabajo en memoria de mi padre Rafael, 5 años de su fallecimiento, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, él siempre me apoyo en todos los proyectos que emprendí, y seguramente estaría muy feliz por este triunfo. A mi madre, aunque este en la distancia, siempre me ha apoyado incondicionalmente, me ha enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad, ni desfallecer en el intento, me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Gracias a mi madre por creer y confiar en mí.

**Verónica Sánchez Hernández**

La presente tesis está dedicada primeramente a Dios ya que he cumplido una meta más en mi vida, a mi familia por apoyarme en cada paso que doy y especialmente a mi hermana Ana Ramírez que me ha acompañado, me ha guiado y dado consejos tanto en lo académico como en lo personal.

**Agradecimientos**

Al Doctor Camilo Alfonso, nuestro director de tesis, que aportó sus conocimientos, su tiempo, su manera de trabajar, su persistencia y su paciencia, fue el, quien nos guió y motivó en este difícil proceso y no dejó que desfalleciéramos, siempre exigió que diéramos lo mejor, y se ve reflejado en el trabajo que se realizó.

## Directivas

Las directivas de la universidad Antonio Nariño, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento.

## Tabla de contenido

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
1.1 Pregunta de investigación.....	21
1.2 Justificación .....	21
OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
MARCO TEÓRICO .....	24
3.1. Antecedentes .....	24
3.2 Revascularización .....	26
3.3 Células madre.....	27
3.4 Células madre de la papila apical.....	28
3.5 Pasta triantibiotica de Hoshino .....	29
3.6 Material bioceramico Endosequence .....	31
3.8 Ensayo de exclusión de colorante vital Azul Tripán .....	33
3.9 Ensayo de proliferación metabólica WST-1 y viabilidad celular .....	34
3.1.1 Ensayo de viabilidad celular Live/Dead.....	34
3.1.2 Citotoxicidad .....	35
3.1.3 Cultivo Celular .....	35
Metodología.....	36
4.1 Tipo de estudio:.....	36
4.2 Población:.....	36
4.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	36

4.4 Obtención del cultivo celular .....	36
4.5. Técnica de Cultivo celular .....	36
4.6 Preparación de las concentraciones de la Pasta Triantibiótica y Endosequence .....	37
4.7 Análisis Morfológico.....	39
4.8 Ensayo de Viabilidad Azul Tripán .....	39
4.9 Ensayo de Viabilidad WST-1 .....	40
4.1.1 Ensayo de viabilidad celular LIVE-DEAD:.....	40
4.1.2. Operacionalización de las variables .....	41
<b>5. Resultados .....</b>	<b>44</b>
5.1 Morfología Celular .....	44
5.2 Ensayo de viabilidad celular Azul Tripán .....	48
5.3 Ensayo de viabilidad celular WST-1 .....	50
5.4 Ensayo de viabilidad celular LIVE-DEAD.....	53
<b>6. Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>65</b>

## **Lista de Tabla**

Tabla 1 criterios de inclusión y exclusión .....	36
Tabla 2 operacionalización de las variables .....	41



## Lista de Figuras

Imagen 1: Placa de Neubauer. ....	37
Imagen 2: objetivo 10x en placa de Neubauer.....	37
Imagen 3: ciprofloxacina de 500 mg, Imagen 4: Minociclina de 100 mg Imagen Metronidazol de 500 mg.....	38
Imagen 6: Endosequence BC Sealer 2g 1P.....	38
Imagen 7: Endosequence BC Sealer 2g 1P.....	38
Imagen 8 e Imagen 9: Diseño de concentración sobre pocillos, se agregan células en los pocillos y se dejan en incubadora. ....	41
Imagen 10 e Imagen 11: Adición del medio + antibiótico y endosequence .....	41
Imagen 12: Hoshino 1 día.....	45
Imagen 13: Hoshino 3 día.....	45
Imagen 14: Hoshino 5 días. ....	46
Imagen 15: Hoshino 7 días. ....	46
Imagen 16: Endosequence 1 día .....	47
Imagen 17: Endosequence 3 días.....	47
Imagen 18: Endosequence 5 días.....	48
Imagen 19: Endosequence 7 días.....	48
Imagen 20: Prueba con azul tripán. ....	50
Imagen 21,22: Proceso realizado para el ensayo WST-1 .....	52
Imagen 23,24 y 25: Proceso realizado para el ensayo WST-1 .....	53
Imagen 26: Hoshino 1 día.....	54
Imagen 27: Hoshino 3 días .....	54
Imagen 28: Hoshino 5 días .....	54

Imagen 29: Hoshino 7 días. ....	55
Imagen 30: Endosequence 1 día. ....	55
Imagen 31: Endosequence 3 días. ....	56
Imagen 32: Endosequence 5 días. ....	56
Imagen 33: Endosequence 7 días. ....	56

## **Lista de Gráficos**

Gráfico 1: Viabilidad celular con azul tripán de Pata triantibiotica. ....	49
Gráfico 2: Viabilidad celular con azul tripán de Endosequence.....	50
Gráfico 3: Viabilidad celular WST-1 de pasta triantibiotica. ....	51
Gráfico 4: Viabilidad celular WST-1 de Endosequence.....	52

## **GLOSARIO**

**AZUL TRIPAN:** colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas.

**CÉLULAS MADRE:** Es una célula totipotente/ pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de auto renovación, es decir, de producir más células madre.

**ENDOSEQUENCE:** Es un cemento biocerámico que presenta actividad antibacteriana y biocompatibilidad con los tejidos, tiene un pH alcalino, alto contenido de calcio, libera iones de calcio y radiopacidad adecuada.

**LIVE DEAD:** Este ensayo es basado en fluorescencia se pueden usar para citometría de flujo, microscopía o formatos de microplacas, permiten la fijación, lo que permite la tinción intracelular y la neutralización de los patógenos.

**PAPILA APICAL:** Tejido mesodérmico incluido en la invaginación del órgano epitelial del esmalte, que da lugar al surgimiento de la dentina y la pulpa.

**PASTA TRIANTIBIOTICA HOSHINO:** Es una mezcla de antibióticos (Metronidazol, Ciprofloxacina y Minociclina) utilizado para tratar piezas deciduas necróticas.

**PRUEBAS DE TOXICIDAD:** Conjunto de pruebas utilizadas para determinar la toxicidad de una sustancia en sistemas vivos

**TOXICIDAD:** Grado de efectividad de una sustancia tóxica.

**TRIPSINA:** Serina endopeptidasa que se forma del tripsinógeno en el páncreas. Es convertida a su forma activa por la entero peptidasa en el intestino delgado. Cataliza la hidrólisis del grupo carboxilo de la arginina o de la lisina.

**TRIPSINIZACIÓN:** Proceso utilizado en cultivos celulares para separar las células adherentes del sustrato de cultivo usando tripsina, una enzima proteolítica que degrada las proteínas de adhesión.

**WST-1:** ensayo colorimétrico, para la evaluación de la proliferación celular

## RESUMEN

**Introducción:** Desde el inicio de la ingeniería de tejidos a principios de la década de 1990, se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas en la odontología regenerativa basados en tratar dientes inmaduros con pulpa necrótica, la cual consiste en la estimulación de los tejidos que se encuentran en la raíz del diente, principalmente por la síntesis de materiales únicos que actúan como andamios para apoyar la unión celular, el crecimiento y la diferenciación, siendo posible lo anterior, un conducto estéril, debe estar acompañado de la combinación de la pasta triple antibiótica de Hoshino. También se han realizado estudios con nuevos materiales biocerámicos que ayudan a la regeneración y han sido como paso final de la revascularización pulpar. **Objetivo:** Evaluar la viabilidad de las células madre de la papila apical cuando son expuestas a la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence

**Métodos:** Estudio Ex Vivo, se utilizó una muestra de papila apical descongelada, se realizó cultivo celular hasta el cuarto pase, a cada pase se le hicieron pruebas de microscopía óptica identificando la morfología celular hasta observar proliferación celular, se definieron las concentraciones de 1mg, 0.5 mg, 0.25 mg, 0.125 mg y control + para la preparación del medicamento triple pasta antibiótica de Hoshino (minociclina, metronidazol y ciprofloxacina) y agregando máxima concentración para Endosequence con las mismas concentraciones descritas anteriormente. Luego se agregó el medicamento en el cultivo de células madres, se definieron los días, serían (1, 3, 5, 7) días por la cual los medicamentos permanecerían en el cultivo celular y a cada respectivo se le realizó prueba de viabilidad celular, se comenzó con azul tripán, después el ensayo metabólico wst-1 y por última prueba live dead.

**Resultados:** La pasta Triantibiótica de Hoshino en el día 1, 3, 5 y 7 no alteró la morfología de las células cuando fue sometida a las concentraciones de estudio. En las concentraciones

de 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,125 mg/ml se observó proliferación celular y la típica morfología fibroblastoide. Endosequence mostró alteración morfológica a la concentración recomendada por la casa comercial (máxima concentración) en los días 1, 3 5 y 7. Se observan células redondeadas, sin conexiones entre sí, incluso pierden adherencia a la superficie de cultivo. Por otro lado, las concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,125 mg/ml no presentaron alteración morfológica, se observa proliferación celular y conexiones entre células.

**Discusión:** las diferentes concentraciones de la mezcla triantibiótica de Hoshino utilizadas no alteraron la morfología celular ni la adherencia celular. Estos hallazgos están en desacuerdo con lo reportado por Panupat Phumpatrakom quien reportó en un modelo de células madre de la pulpa dental alteración morfológica a una concentración de 0,39 mg/ml. Sin embargo, los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Sorapong Chuensombat quién usando células madre de la pulpa dental y células madre de la papila apical usando concentraciones de 25.00, 6.25, 1.56, 0.39, 0.097, y 0.024  $\mu$ g/ml no encontró cambios en la morfología celular. **Conclusiones:** La Pasta Triantibiótica de Hoshino a concentraciones de 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml no afecta la viabilidad de las células madre de la papila apical. Por tanto, podría ser utilizada en protocolos de endodoncia regenerativa. La presentación comercial pura del material biocerámico Endosequence altera la estructura y metabolismo a nivel mitocondrial de las células de la papila apical. Por tanto, su viabilidad celular se ve seriamente afectada por tal motivo no se recomienda usarla en protocolos de endodoncia regenerativa. **Palabras claves:** Citotoxicidad, células madres, revascularización, pasta triantibiotica, Endosequence, ensayos de viabilidad celular.

## **Abstract**

**Introduction** Since the beginning of tissue engineering in the early 1990s, numerous investigations focused on regenerative dentistry based on treating immature teeth with necrotic pulp have been developed, which consists in stimulating the tissues found at the root of the tooth, mainly by the synthesis of unique materials that act as scaffolds to support cell union, growth and differentiation, being possible the above, a sterile duct, must be accompanied by the combination of the triple antibiotic paste of Hoshino. Studies have also been conducted with new bioceramic materials that help regeneration and have been the final step of pulpal revascularization. Since the beginning of tissue engineering in the early 1990s, numerous research focused on dentistry has been developed regenerative based on treating immature teeth with necrotic pulp, which consists in the stimulation of the tissues found in the root of the tooth, mainly by the synthesis of unique materials that act as scaffolds to support cell union, growth and differentiation , the foregoing being possible, a sterile duct, must be accompanied by the combination of the triple antibiotic paste of Hoshino. Studies have also been conducted with new bioceramic materials that help regeneration and have been the final step of pulpal revascularization.

**Objective:** To evaluate the viability of the apical papilla stem cells when they are exposed to the Hoshino and Endosequence triantibiotic paste. **Methods:** Ex Vivo Study, a sample of thawed apical papilla was used, cell culture was carried out until the fourth pass, each pass underwent optical microscopy tests identifying cell morphology until cell proliferation was observed, concentrations of 1mg, 0.5 mg were defined , 0.25 mg, 0.125 mg and control + for the preparation of the triple antibiotic drug Hoshino (minocycline, metronidazole and ciprofloxacin) and adding maximum concentration for Endosequence



with the same concentrations described above. Then the medicine was added in the stem cell culture, the days were defined, it would be (1, 3, 5, 7) days for which the drugs would remain in the cell culture and each cell was tested for cell viability, it started with trypan blue, then the wst-1 metabolic test and finally live dead test. **Results:** Hoshino Triantibiotic paste on day 1, 3, 5 and 7 did not alter the morphology of the cells when it sometimes went to the study cells. In the concentrations of 0.5 mg / ml, 0.25 mg / ml and 0.125 mg / ml, cell proliferation and the typical fibroblastoid morphology were observed. Sequence detected morphological alteration at the concentration recommended by the commercial house (maximum concentration) on days 1, 3, 5 and 7. Rounded cells are observed, without connections to each other, even lose adherence to the crop surface. On the other hand, the concentrations of 1 mg / ml, 0.5 mg / ml, 0.25 mg / ml and 0.125 mg / ml without morphological alteration, observation of cell proliferation and connections between cells. **Discussion:** The different concentrations of the Hoshino triantibiotic mixture used did not alter cell morphology or cell adhesion. These findings disagree with what was reported by Panupat Phumpatrakom who reported morphological alteration in a pulp stem cell model at a concentration of 0.39 mg / ml. However, the results of this study are consistent with those reported by Sorapong Chuensombat who using dental pulp stem cells and apical papilla stem cells using concentrations of 25.00, 6.25, 1.56, 0.39, 0.097, and 0.024  $\mu\text{g}$  / ml did not find Changes in cell morphology. **Conclusions:** Hoshino Triantibiotic Paste at concentrations of 1mg / ml, 0.5 mg / ml, 0.250 mg / ml and 0.125 mg / ml does not affect the viability of the stem cells of the apical papilla. Therefore, it could be used in regenerative endodontic protocols. The pure commercial presentation of the bioceramic material Endosequence alters the structure and metabolism at the mitochondrial level of the cells of the apical papilla. Therefore, its cell viability is

seriously affected for this reason it is not recommended to use it in regenerative endodontics protocols.

**Key words:** Cytotoxicity, stem cells, revascularization, triantibiotic paste, Endosequence, cell viability assay

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El tratamiento del diente necrótico con ápice abierto se ha convertido en un reto para la endodoncia regenerativa. La endodoncia regenerativa es un campo emergente de la odontología el cual utiliza células madre, biomoléculas y andamios para lograr regenerar el complejo pulpo dentinal. En este contexto, surge la revascularización con el principio de descontaminar adecuadamente el conducto radicular usando diferentes antibióticos (Banchs & Trope, 2009; Takushige, Cruz, Asgor Moral, & Hoshino, 2004), una vez descontaminado el conducto radicular se induce a la formación de un andamio natural de fibrina estimulado por un coágulo de sangre, a su vez se aprovechan las células y moléculas de señalización producto de este coágulo para promover la formación de nuevo tejido dentopulpar.(Albuquerque, Valera, Nakashima, Nör, & Bottino, 2014)

En este contexto, el conocimiento sobre los medicamentos y materiales intraconducto utilizados en revascularización son de suma importancia y han sido objeto de investigación. Vale la pena mencionar la pasta triantibiótica de Hoshino compuesta por minociclina, ciprofloxacina y metronidazol la cual se ha utilizado para asegurar la descontaminación del conducto radicular y proveer el ambiente adecuado para la revascularización pulpar. Sin embargo, varios estudios han reportado que esta pasta mancha el diente tratado debido al efecto pigmentante de la minociclina (Thomas, 2014). Además, varios estudios han reportado el efecto citotóxico del combinado triantibiótico sobre fibroblastos, células madre del ligamento periodontal, de la pulpa dental y la papila apical (Thomas, 2014) Por otro lado, vale la pena mencionar otros materiales que se han utilizado en esta terapéutica tales como el MTA, Biodentine, BioAgreggate, iRoot y endosequence, los cuales han estudiado su efecto

regenerativo pero pocos de ellos han estudiado el efecto citotóxico en modelos celulares lo cual se hace necesario investigar el efecto de estos materiales sobre la viabilidad celular. (Damas, Wheeler, Bringas, & Hoen, 2011; Öncel Torun et al., 2015)

Endosequence actualmente se utiliza en procedimientos de regeneración pulpar, se ha desarrollado como un material biocerámico novedoso, el manejo a base de silicato de calcio, ha presentado buenas características de biocompatibilidad, sellado y gran potencial antimicrobiano y varios reportes han evidenciado que este material biocerámico logra potencializar la biodisponibilidad de los factores de crecimiento de las células madre. Sin embargo, hasta la fecha no existe un reporte donde se evalúe la citotoxicidad de este biomaterial sobre células madre de la papila apical ni tampoco existe un estudio donde se compare los efectos de la pasta tradicional de Hoshino versus Endosequence (Miller, Takimoto, Wealleans, & Diogenes, 2018)

Se han seleccionado las células de la papila apical como modelo celular para evaluar la citotoxicidad debido a que científicamente se ha demostrado que las células de la papila apical sobreviven a las infecciones dentales ya que cuenta con una ubicación anatómica favorable y un gran número de células madre, lo cual permite que durante los procedimientos de endodoncia regenerativa (REP), participen en la regeneración del complejo pulpo dentinal. Son las responsables de la formación radicular, ya que participan activamente en la formación apical del diente. Sin embargo, existen pocos reportes que investiguen los efectos citotóxicos de los diferentes medicamentos y materiales expuestos anteriormente sobre este tipo celular las cuales son las responsables de la formación de la pulpa y la raíz dental. (Miller et al., 2018)

Por estas razones el grupo de trabajo plantea la siguiente pregunta de investigación:

## **1.1 Pregunta de investigación**

¿Cómo afecta la viabilidad de las células madre de la papila apical la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence?

## **1.2 Justificación**

Actualmente la endodoncia regenerativa se puede lograr a través de la actividad de las células de la pulpa, periodonto y el sistema inmunológico; es una de las terapias más importantes e innovadoras en la odontología que permiten la función adecuada del diente para mantener la estructura dental en la cavidad oral.

En este tipo de tratamientos es necesario realizar una revascularización pulpar, por consiguiente se realiza una instrumentación para la formación de un coágulo de sangre intracanal, estimulando las células madre en el espacio radicular en combinación con medicamentos que reducen la infección para promover el desarrollo de la raíz, reparación de tejidos y posterior curación, este se efectúa en dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica y periodontitis apical. (García-Godoy & Murray, 2012) (Wigler et al., 2013)

Existen diversos materiales que son parte fundamental para el éxito del tratamiento, teniendo en cuenta que se encuentran en contacto con el tejido pulpar o perirradicular, es de gran importancia evaluar y analizar el grado de citotoxicidad. Los materiales que se estudiarán en la presente investigación serán la pasta triantibiótica de Hoshino y el endosequence(r) (Wigler et al., 2013).

La investigación se enfocará en el estudio y análisis de la viabilidad celular de células madres de la papila apical expuestas a la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence, el cual, permitirá ser utilizada en varias concentraciones para verificar, observar e identificar cada uno de los factores que pueden intervenir durante el procedimiento como: la mortalidad u/o

proliferación de las células de la papila apical, como también se podrían llegar a evidenciar otros cambios o daños estructurales causados por la composición de estos medicamentos; con esta se aportará información sobre cómo actúa la pasta triantibiótica de hoshino y endosequence a nivel celular en la papila apical, con mencionados medicamentos se logrará evidenciar el nivel de citotoxicidad en las células de la papila apical, permitiendo profundizar los conocimientos teóricos y científicos basados en la evidencia.

Con este proyecto se busca disminuir la cantidad de tratamientos tradicionales de endodoncia lo cual genera que no se realice un correcto selle apical, lo ideal es que el paciente mantenga vitalidad pulpar por medio de la revascularización y no un diente no vital que pueda ocasionar mayores costos en el momento de realizar una rehabilitación por pérdida de este diente.

En este orden de ideas, existe la necesidad de investigar la compleja interacción de los materiales basados en silicato de calcio con las células madre como también cambiar el enfoque clínico, a través de cada uno de los resultados que se obtengan en cada una de las etapas de esta investigación, y pueda ser utilizado como una contribución para fortalecer la línea de investigación de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa y aportar en este emergente campo de la endodoncia regenerativa

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la viabilidad de las células madre de la papila apical cuando son expuestas a la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo metabólico WST-1.

Evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo de integridad de membrana celular.

#### **Azul Tripán y LIVE-DEAD**

Identificar qué medicamentos presentan mayor alteración sobre la viabilidad de las células madre de la papila apical.

## MARCO TEÓRICO

### 3.1. Antecedentes

Desde el inicio de la ingeniería de tejidos a principios de la década de 1990 (Langer y Vacanti, 1993), se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas en la odontología regenerativa basados en tratar dientes inmaduros con pulpa necrótica, la cual consiste en la estimulación de los tejidos que se encuentran en la raíz del diente, principalmente por la síntesis de materiales únicos que actúan como andamios para apoyar la unión celular, el crecimiento y la diferenciación (Li et al., 2005), así como la identificación de fuentes novedosas de células madre (Nakashima e Iohara, 2011) y moléculas bioactivas (Lu y Atala, 2013) se han dirigido a la regeneración de tejidos y órganos perdidos debido a traumas y / o enfermedades (Langer y Vacanti, 1993).

La revascularización pulpar se remonta a décadas pasadas, fue descrito por Nygaard-Ostby y Hjortdal en 1961, la cual es un procedimiento diseñado para estimular la regeneración de los tejidos apicales para reemplazar fisiológicamente una estructura dañada, incluyendo dentina, raíz y complejo dentino-pulpar. Actualmente se lleva a cabo en dientes permanentes inmaduros con infección o pulpa necrótica. Sin embargo, la revascularización se basa en la existencia de una matriz de tejido estéril la cual proporcionan nuevas células, se basa en la preservación del potencial de las células madre pulpares y células mesenquimáticas de la papila apical contribuyendo a la revascularización. Myers et al. Y Nevins et al. Demostraron la efectividad de revascularización mediante la formación del coágulo intraconducto, lo que potenció el desarrollo de la raíz en diversos estudios clínicos. (Baranwal, 2015).



La revascularización, ha sido introducido desde 1961 Nygaard-Ostby et al., el cual planteo la hipótesis de que laceración de los tejidos apicales, podría promover el sangrado y la formación de un coágulo que sirviera como andamio, apoyando el nuevo crecimiento de tejido pulpar en el conducto radicular, por estimulación de las células de la papila apical (Martin G, 2013), que conllevaba a un mayor desarrollo de la raíz (Petrino JA, 2010). Möller et al. Mostraron que el tejido pulpar necrótico infectado provoca fuertes reacciones inflamatorias en los tejidos apicales. Myers et al. y Nevins et al. Demostraron la efectividad de la revascularización mediante la formación del coágulo intraconducto, lo que potenció el desarrollo de la raíz en diversos estudios clínicos. Este tratamiento o proceso es totalmente diferente a una terapia endodóntica convencional, ya que tiene el potencial de reemplazar un tejido pulpar necrótico por uno sano.

Sato T, Hoshino E., Uematsu H. y Cols. (1993) En Japón, realizaron un estudio para establecer y aclarar la eficacia de una mezcla de medicamentos compuesta por Ciprofloxacina, Metronidazol más un tercer antibiótico: Amoxicilina, Cefaclor, Cefroxadine, Fosfomicin o Rokitamycin en bacterias de lesiones cariosas y endodónticas de dientes deciduos humanos extraídos, in vitro. Concluyendo que las lesiones cariosas y endodónticas pueden ser esterilizadas por la mezcla de los medicamentos anteriormente dicho.

Sato J. y Cols. (1996). En Japón. Observaron el potencial antibacteriano de una mezcla de Ciprofloxacina, Metronidazol y Minociclina en los túbulos dentinarios de la dentina radicular infectada. La penetración y la eficacia bactericida se calcularon a través de periodos de observación y mediante varios procedimientos (recuento de bacterias y medición de zonas de inhibición), de tal manera que al final no se recuperó ninguna bacteria de la dentina radicular, excepto en un caso en el cual se recuperaron unas pocas

bacterias comprobando el efecto antibacteriano de la combinación de estos tres medicamentos en las paredes de conductos infectados.

Hoshino E. y Cols. (1996) En Japón. Realizaron este estudio a fin de establecer el efecto antibacteriano de una mezcla de Ciprofloxacina, Metronidazol y Minociclina, con la adición de Rifampicina y sin ella, en bacterias tomadas de dentina radicular infectada, así como de dentina cariada y tejido pulpar infectado. No se recuperaron ninguna de las muestras en presencia de la combinación de los medicamentos, lo que indica la potencia y eficacia bactericida de las 9 drogas contra los microorganismos presentes en los conductos radiculares infectados o dentina cariada.

Se han realizado estudios con nuevos materiales biocerámicos que ayudan a la regeneración y han sido como paso final de la revascularización pulpar. Estos materiales biocerámicos se introdujeron en endodoncia en la década de 1990, primero como materiales de obturación retrógrada y después como cementos para reparación, selladores de conductos que ayudan a la regeneración y han sido como paso final de la revascularización pulpar, Las ventajas potenciales de los materiales biocerámicos en endodoncia están relacionadas con sus propiedades biológicas y físico-químicas. (Alobaid et al., 2014)

### **3.2 Revascularización**

En los últimos años, el campo de la endodoncia regenerativa ha presentado nuevas posibilidades para el tratamiento de dientes permanentes inmaduros necróticos mediante el desarrollo de nuevo tejido pulpar basado en la combinación meticulosa y la interacción de 3 elementos clave para la regeneración de tejidos, a saber, células madre, moléculas bioactivas ( p. ej. , factores de crecimiento) y andamios (Diogenes et al ., 2013 )

El enfoque de revascularización demuestra cuantitativamente el engrosamiento de la pared dentinaria, el cierre apical y el aumento de la longitud de la raíz, en base a una fuerte evidencia radiográfica ( Banchs y Trope, 2004 )

La perspectiva clínica de la necesidad de un andamio proviene principalmente de la formación de una matriz basada en fibrina derivada de un coágulo de sangre en un sistema de conducto radicular previamente descontaminado, mínimo o no instrumentado a través de la laceración intencional de los tejidos periapicales (es decir, revascularización ) En resumen, el coágulo de sangre actúa como un andamio natural que, junto con factores de crecimiento y células madre producidos endógenamente de las papilas apicales (SCAP), puebla el andamio, induciendo el engrosamiento de la pared dentinal, la maduración de la raíz y, en algunos casos la formación de tejido reparador similar al cemento (Diógenes et al , 2013)

### **3.3 Células madre**

Las células madre constituyen la unidad natural de generación durante la embriogénesis y regeneración en la vida adulta. (Gamboa, Calderón, Menéndez, & Carballo, 2012)

Las células madre presentan una serie de propiedades que las distinguen del resto de las células y les confieren las características óptimas para su uso en medicina regenerativa, entre las cuales figuran: la alta tasa de proliferación y regeneración clonal mediante divisiones simétricas (autorrenovación) y su alto grado de potencialidad para diferenciarse en distintos tipos celulares a través de divisiones asimétricas (diferenciación). (Dra. Lidyce Quesada Leyva, 2017)

Las células madre se clasifican según su potencial y nivel de diferenciación, entre las cuales encontramos: totipotenciales: únicamente el cigoto y las descendientes de las 2

primeras divisiones son células totipotenciales, ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta, pluripotenciales: a los 4 días las células totipotenciales empiezan a diferenciarse y forman el blastocisto y la masa celular interna. Las células de esta última son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las 3 líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar la placenta. Encontramos las multipotenciales: son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo con su localización, por ejemplo, las del sistema nervioso central tienen el potencial de generar 3 tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, las unipotenciales: son células capaces de generar un solo tipo de célula específica; por ejemplo, las de la membrana basal de la epidermis interfoliolar, que producen únicamente escamas queratinizadas. (Dra. Lidycé Quesada Leyva, 2017)

### **3.4 Células madre de la papila apical**

Las células madre de la papila apical (SCAP) son principalmente fuente de odontoblastos primarios responsables de continuar con el desarrollo radicular y debido a su cercanía con el suplemento sanguíneo periodontal pueden sobrevivir frente a la necrosis pulpar. (Alobaid et al., 2014)

Las células madre de la papila apical (SCAP) han sido usadas con resultados sorprendentes en la regeneración endodóntica de dientes inmaduros con necrosis pulpar. Este procedimiento incluye la desinfección del canal radicular y la inducción del sangrado intracanal, el cual introduce células madre originadas en la papila apical, para que produzcan un coágulo sanguíneo y formen una matriz de tejido estéril, a la que se aportan nuevas células capaces de crecer y diferenciarse. (Alobaid et al., 2014)

Dentro de sus características, encontramos que su formación es en forma de colonias, presentan diferenciación adipogénica, osteogénica, y neurogénica. La mayoría de los SCAP conservan forma de fibroblastos (Sijia Na1, 2013)

De igual manera, se han seleccionado las células de la papila apical como modelo celular para evaluar la citotoxicidad debido a que científicamente se ha demostrado que las células de la papila apical sobreviven a las infecciones dentales ya que cuenta con una ubicación anatómica favorable y un gran número de células madre, lo cual permite que durante los procedimientos de endodoncia regenerativa (REP), participen en la regeneración del complejo pulpo dentinal sin embargo, existen pocos reportes que investiguen los efectos citotóxicos de los diferentes medicamentos y materiales expuestos anteriormente sobre este tipo celular las cuales son las responsables de la formación de la pulpa y la raíz dental. (Miller et al., 2018)

### **3.5 Triple Pasta antibiótica de Hoshino**

Varios informes de casos exitosos utilizaron triple pasta antibiótica (ciprofloxacina, metronidazol y minociclina) en el sistema del conducto radicular durante varias semanas antes del reclutamiento de células madre en el canal a través del sangrado inducido. El TAP es un agente antimicrobiano efectivo que crea condiciones adecuadas para la revascularización del tejido, según (Julie A. Berkhoff, 2014) se ha demostrado que la concentración de TAP utilizada clínicamente es citotóxica para las células madre de la papila apical (Gucciardino F, 2015)

Ha sido introducido por Hoshino et al. 44. Varios estudios informaron resultados prometedores cuando se usó TAP en dientes necróticos con formación radicular incompleta. Ciertos autores hablan sobre la concentración del TAP utilizada porque el uso clínico de TAP ha sido empírico. Aplicación local de 3Mix usando una concentración excesiva La acción

podría afectar el tejido del huésped, causando la muerte celular, lo que limita la regeneración del tejido. Por lo tanto, los propósitos de este estudio fueron determinar los efectos citotóxicos del TAP y cada componente antibiótico individual de TAP en células madre de la papila apical

Dentro del sistema de conductos se encuentran microorganismos que son capaces de sobrevivir y multiplicarse provocando infecciones puesto que se han encontrado que la mayoría de las bacterias encontradas en el conducto son anaerobios estrictos. Por lo tanto, el metronidazol se convierte en el medicamento de mejor elección, también el ciprofloxacino, que es un inhibidor del ADN girasa, por lo tanto, la desinfección se ha considerado un paso importante en la terapia regenerativa. (Alobaid et al., 2014) Sato J, et al (1996) determinó la efectividad antibacteriana de una pasta antibiótica a base de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina conocida como pasta triantibiótica de Hoshino mezclada con agua destilada dentro de conducto radiculares infectados, lo cual se tuvo en cuenta que la minociclina tiene efectos adversos como la pigmentación del diente. Se habla del hidróxido de calcio como un agente antibacteriano, ha sido demostrado en varios estudios que no presenta toxicidad en las células madre lo cual es de gran importancia ya que permite que la proliferación de las células para completar con el proceso de revascularización

Windley W. y Cols. (2005) En Estados Unidos. Estudiaron la capacidad de una pasta antibiótica triple consistente de 3 Metronidazol, Ciprofloxacina y Minociclina para la desinfección de dientes inmaduros de perros con periodontitis apical. Los resultados indicaron la efectividad de la pasta antibiótica triple en la desinfección de dientes inmaduros con lesión periapical.

Igualmente, Nakahara H., Takushige T., Hoshino E. (2005) En Japón. Evaluaron clínicamente el tratamiento endodóntico 3Mix-MP usando una combinación de

medicamentos antibacterianos en 991 piezas permanentes. Se agrandaron los orificios de las entradas de los conductos para crear una cavidad donde alojar la medicación (3Mix-MP) para luego sellar el conducto con cemento de ionómero de vidrio. Los resultados obtenidos fueron exitosos en la mayoría de los casos (97,8%) debido a la desaparición de los síntomas y signos clínicos como fístulas, formación de abscesos, exudado purulento, inflamación o dolor a la masticación; así como la recuperación 12 parcial o total de las lesiones periapicales

### **3.6 Material biocerámico Endosequence**

Estos materiales biocerámicos están compuestos por óxido de aluminio y óxido de circonio, vidrio bioactivo, recubrimientos y materiales compuestos, hidroxiapatita y fosfatos reabsorbibles. Los materiales biocerámicos se clasifican en Bioinerte, estos no son interactivos con los sistemas biológicos. Bioactivos, son durable en los tejidos que pueden sufrir interacciones interfaciales con el tejido circundante. Biodegradable, son soluble o reabsorbible. (Alobaid et al., 2014.)

Entre estos materiales encontramos el EndoSequence® ((Brasseler EE.UU., Savannah, GA) tiene propiedades de un sellador ideal en las cuales es resistente a la actividad antimicrobiana, proporcionando buena adherencia a la dentina intrarradicular después del fraguado, fue desarrollado principalmente para perforaciones y se considera un material insoluble y radiopaco. (Alobaid et al., 2014).

En cuanto a revascularización, se evidencia en la literatura, el uso del material Endosequence después de provocar un coágulo de sangre que se indujo usando una lima K # 10 para lacerar los tejidos apicales. Después de que se formó el coágulo de sangre, EndoSequence Masilla biocerámica se colocó debajo de la unión cemento-esmalte y sobre el coágulo directamente. Basado en el juicio del clínico. La mayoría del período de seguimiento osciló entre 7 y 31 meses. El resultado se evaluó mediante la curación radiográfica de la periodontitis apical, los

signos y síntomas clínicos, y el desarrollo de continuidad de raíz. En cuanto a los resultados, 21 de 28 casos (75%) sanaron por completo; 3 casos (10.7%) fallaron durante el período de observación y fueron necesarios tratamiento adicional; y otros 4 casos (14%) mostraron incompleta curación, que se reprogramaron para la próxima visita de seguimiento (Sarah Bukhari, 2016).

### **3.7 Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, la proliferación de células es un indicador vital para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes, proteínas y vías involucradas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. En general, los métodos utilizados para determinar la viabilidad también son comunes para la detección de la proliferación celular. Los ensayos de citotoxicidad y proliferación celular se usan generalmente para la detección de fármacos, para detectar si las moléculas de prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos. Independientemente del tipo de célula basado en el ensayo utilizado, es importante saber cuántas células viables quedan al final del experimento. (Aysun Adan, 2016)

Hay una variedad de métodos de ensayo basados en diversas funciones celulares como: la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de absorción de nucleótidos. Estos métodos podrían clasificarse básicamente en diferentes categorías: (I) métodos de exclusión de colorantes como el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano, (II) métodos basados en la actividad metabólica, (III) ensayo de ATP, (IV) ensayo de sulforhodamina B, (V) proteasa ensayo de marcador de viabilidad, (VI) ensayo de



supervivencia de células clonogénicas, (VII) ensayos de proliferación celular de síntesis de ADN y (V) microespectroscopía raman. (Aysun Adan, 2016)

### **3.8 Ensayo de exclusión de colorante vital Azul Tripán**

El azul tripán (azul diamina, azul niagara, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas (Ehrlich, 1904). Su nombre se deriva de su capacidad para matar a los tripanosomas, parásitos causales la enfermedad de Chagas en América, enfermedad del sueño en África y Leishmaniasis). Este colorante es uno de varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. (commons, 2008)

El azul tripán no es necesario para realizar conteos simples de células, pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras. En este procedimiento, una suspensión de células mononucleares (CMN) es mezclada con una solución al 0.4% de azul tripán antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de un hemo citómetro de Neubauer. A pesar de que el protocolo original estipulaba el uso de una mezcla isovolumétrica de azul tripán y suspensión celular (digamos, 10  $\mu$ L de suspensión celular y 10  $\mu$ L de azul tripán), también se puede hacer uso de otros tipos de diluciones (especialmente para suspensiones celulares muy concentradas), siempre y cuando se considere el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales. (commons, 2008)

El hemo-citómetro es un portaobjetos especializado en el cual una retícula es grabada con láser. Su construcción permite conocer el volumen de cualquier líquido colocado sobre él y por debajo de su cubreobjetos. La retícula se encuentra compuesta por nueve cuadros de 1 mm<sup>2</sup> cada uno. (commons, 2008)

### **3.9 Ensayo de proliferación metabólica WST-1 y viabilidad celular**

Este ensayo consiste en determinar la actividad metabólica mitocondrial y la proliferación celular, se utiliza este método durante 4 horas a 37 ° C. Cada muestra se analiza utilizando un lector de microplacas (Miguel Angel Martin-Piedra, 2014). WST-1 es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5- tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) la cual es transformada en formazán mediante un complejo de sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables.

#### **3.1.1 Ensayo de viabilidad celular Live/Dead**

Este ensayo proporciona información sobre el estado funcional de la célula mediante la detección de la actividad de esterasa citoplasmática. El kit consta de dos colorantes fluorescentes. Calcein AM pasa a través de la membrana celular, cuando se hidroliza por esterasa citoplasmática (células vivas), la calceína AM muestra fluorescencia en una longitud de onda de emisión de 515 nm. El homodímero de etidio muestra fluorescencia (longitud de onda de emisión de 617 nm) solo después de unirse al ADN. La fluorescencia roja aparece solo en las células en las que la membrana celular está alterada (células muertas). (Miguel Angel Martin-Piedra, 2014)

### **3.1.2 Citotoxicidad**

La toxicidad se puede definir como todos los efectos perjudiciales que causan daño a un cuerpo. La toxicología es la ciencia que estudia las relaciones entre la cantidad de un agente químico que entra a un organismo y el efecto biológico que este produce después de penetrar. En estas se pueden observar diferentes características tanto cualitativas como cuantitativas. Todo esto se da cuando una sustancia entra en contacto con un cuerpo.

### **3.1.3 Cultivo Celular**

Obtención de células, tejidos y órganos de animales o plantas y su posterior colocación en un ambiente artificial que permite su supervivencia y/o proliferación. Los requerimientos básicos para que las células crezcan óptimamente son: temperatura controlada, substrato para la adhesión celular, y medio de cultivo apropiado e incubador que mantenga un pH y una osmolalidad correctos. El paso más importante y crucial en el cultivo celular es la selección del medio de cultivo apropiado para el cultivo in vitro. El medio de cultivo es un líquido o un gel diseñado para favorecer el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas. Los medios de cultivo celular generalmente contienen una fuente apropiada de energía y compuestos que regulan el ciclo celular. Un medio de cultivo típico está compuesto de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y factores de adhesión. Además de nutrientes, el medio también colabora en mantener el pH y la osmolalidad. Las células animales pueden cultivarse utilizando un medio completamente natural o artificial/sintético (Arora, 2018)

## Metodología

**4.1 Tipo de estudio:** Experimental *Ex Vivo*

**4.2 Población:** Células madre mesenquimales de la papila apical

**4.3** Criterios de inclusión y exclusión

*Tabla 1 criterios de inclusión y exclusión*

<i>Criterios de Inclusión</i>	<i>Criterios de Exclusión</i>
<i>Células del pase 4 que presenten alta viabilidad celular</i>	Cultivos celulares que presenten porcentaje de viabilidad celular menor al 60%

### **4.4 Obtención del cultivo celular**

Las células fueron donadas por la línea de investigación de ingeniería tisular y medicina regenerativa de la facultad de odontología de la Universidad Antonio Nariño las cuales ya están caracterizadas y se encuentran congeladas. Las células se descongelaron y los experimentos se realizaron con células del pase 4.

### **4.5. Técnica de Cultivo celular**

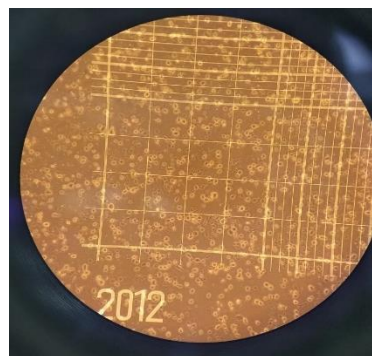
Las células fueron descongeladas y pasadas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup>, se adicionó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Lonza) y 1% de antibiótico (Sigma) y 1% de glutamina (Sigma). Las muestras fueron incubadas a 37°C a 5 atm de CO<sub>2</sub> haciendo control microscópico diario hasta observar proliferación celular. Una vez detectada la proliferación se realizó cambio de medio de cultivo cada 2 días. Los cultivos se observaron bajo microscopio invertido hasta obtener una confluencia del 70% para realizar el siguiente pasaje. Las células que se utilizaron para la experimentación fueron las del pase 4. En cada pasaje se realizó un control

de los cultivos celulares mediante microscopía óptica para verificar la confluencia de más del 70%.

Se tomó 10µl de medio de cultivo y se colocó en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular y cuantificar su proliferación. (Imagen 1 y 2)



*Imagen 1: Placa de Neubauer.*



*Imagen 2: objetivo 10x en placa de Neubauer*

#### **4.6 Preparación de las concentraciones de la Pasta Triantibiótica y Endosequence**

En un matraz se trituraron los antibióticos de una forma independiente; metronidazol, ciprofloxacina y minociclina. Posteriormente, se mezclaron en proporción 1:1:1 hasta obtener una mezcla homogénea. (imagen 3,4,5)

Una vez homogenizados los antibióticos se procedió a preparar las diferentes concentraciones a utilizar siguiendo el protocolo de (Chuensombat S, 2013). Se prepararon concentraciones de 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125mg/ml. Los antibióticos se diluyeron en 1 ml de medio de cultivo mencionado anteriormente.



*Imagen 3: ciprofloxacina de 500 mg*

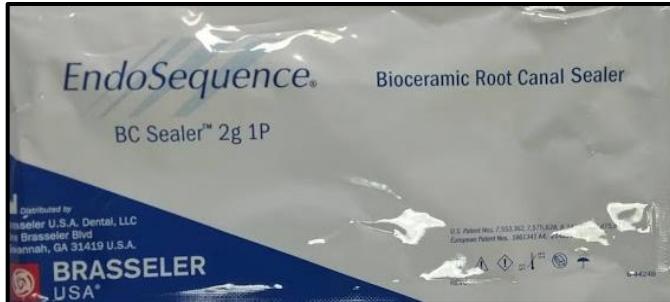


*Imagen 4: Minociclina de 100 mg*



*Imagen 5: Metronidazol de 500 mg*

Así que, se utilizó una concentración pura de Endosequence (Brasseler USA) tal como lo recomienda la casa comercial. Adicionalmente, se hicieron diluciones a 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125mg/ml. El material biocerámico fue diluido en 1 ml de medio de cultivo mencionado anteriormente.



*Imagen 6: Endosequence BC Sealer 2g 1P*



*Imagen 7: Endosequence BC Sealer 2g 1P*

Todas las muestras fueron preparadas a temperatura ambiente y descontaminadas con técnica de filtración doble usando un filtro de papel de tamaño de poro de 2.00  $\mu\text{m}$  y un microfiltro (Corning, Oneonta, NY) de un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

#### **4.7 Análisis Morfológico**

Para analizar cómo afectan los materiales de estudio en la morfología celular se utilizó un microscopio invertido para hacer la descripción detallada.

#### **4.8 Ensayo de Viabilidad Azul Tripán**

En una placa de 6 pozos se cultivaron 20.000 células por pozo durante 48 horas. Una vez verificada su adherencia se procedió a poner en contacto directo con las diluciones de los materiales propuestos en esta investigación: Pasta de Hoshino 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125mg/ml. Endosequence concentración máxima y 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125mg/ml. Los cultivos fueron analizados al día 1, 3, 5 y 7. Vale la pena mencionar que se utilizó un grupo control positivo el cual eran células sin ser sometidas a ninguno de los medicamentos, solamente se les adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino, antibiótico y Glutamina.

Posteriormente, se realizó el ensayo de Azul Tripán tripsinizando las células de cada pozo, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de células y se pusieron en contacto con 10  $\mu\text{l}$  de Azul Tripán (Panreac) durante 5 minutos. En seguida se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla y se pusieron en una cámara de Neubauer. Finalmente, se realizó en conteo celular bajo microscopio invertido. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de viabilidad celular:

% de viabilidad celular = Número de células vivas / Número total de células \* 100

#### **4.9 Ensayo de Viabilidad WST-1**

Para este ensayo se cultivaron 20.000 células por pozo en cajas de 12 pozos. Pasadas 48 horas se verificó su adherencia mediante microscopía. Posteriormente, se colocaron en contacto con las concentraciones de materiales evaluados en este estudio. Los tiempos para el análisis fueron de 1, 3, 5 y 7 días. Se siguió el protocolo propuesto por la casa comercial en los días propuestos. Finalmente, se tomaron los sobrenadantes y se pasaron a cajas de 96 pozos para realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda comprendida entre 490 y 620 nm.

Se utilizó un grupo control positivo el cual eran células cultivadas que solamente tenían medio de cultivo suplementado. No estaba expuestas a los materiales a estudiar. También se usó un control negativo el cual consistió en adicionar Tritón x-100 (Sigma) el cual tiene la capacidad de matar a las células. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

##### **4.1.1 Ensayo de viabilidad celular LIVE-DEAD:**

En unos dispositivos especiales para cultivo celular Chamber (Corning), se cultivaron 20 células en cada pozo. A las 48 horas se verificó mediante microscopía su adherencia. Adicionalmente, se las células se pusieron en contacto con las diferentes concentraciones de los materiales a estudiar. Los tiempos utilizados para su evaluación fueron de 1, 3, 5 y 7 días. Se siguió el protocolo propuesto por la casa comercial ( Molecular Probes™ ). Finalmente, las células fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia para detectar las células vivas en color verde y las células rojas indicaba que estas estaban muertas. Se tomaron 5 fotografías por cada condición, se contaron las células vivas y muertas.

Diseño de concentración sobre pocillos, se agregan células en los pocillos y se dejan en incubadora



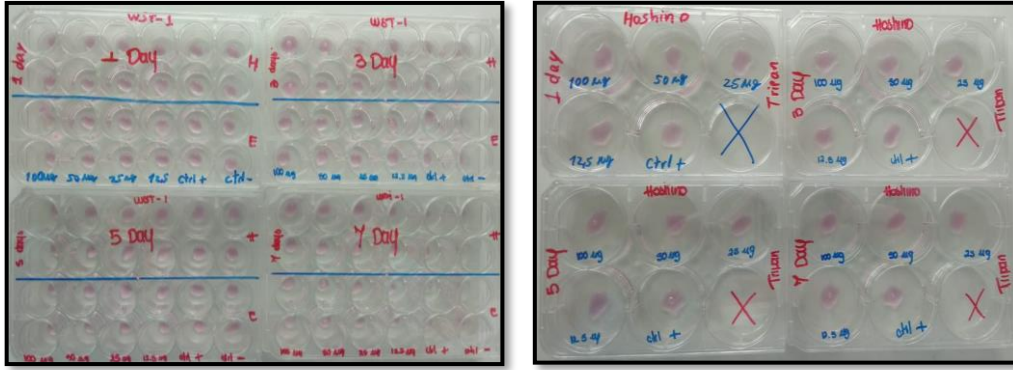


Imagen 8 e Imagen 9: Diseño de concentración sobre pocillos, se agregan células en los pocillos y se dejan en incubadora.

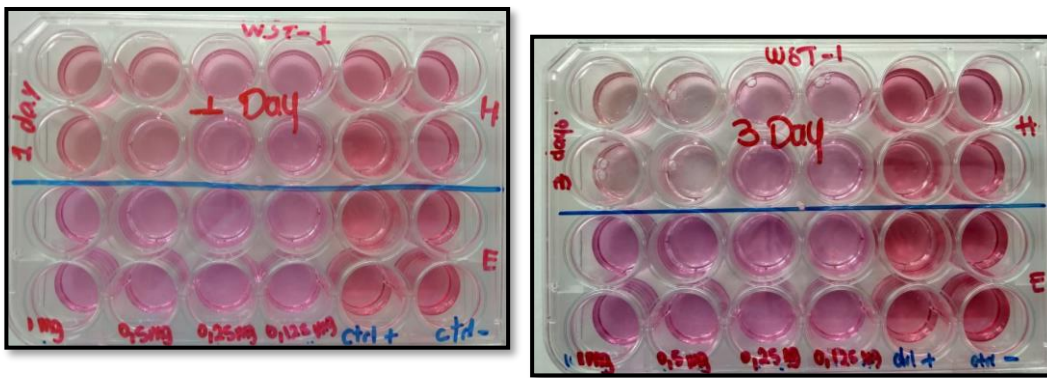


Imagen 10 e Imagen 11: Adición del medio + antibiótico y endosequence

#### 4.1.2. Operacionalización de las variables

Tabla 2 operacionalización de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Citotoxicidad	cualidad de algunas células para ser tóxicas frente a otras que están alteradas o expuestas a sustancias	Cuantitativa	Longitud de onda expresada en nanómetros mediante espectrofotómetro

Tiempo	Día 1 Día 3 Día 5 Día 7	Cuantitativa	En horas
Ensayos de viabilidad celular	<p><b>WST-1:</b> Permite medir la proliferación celular y la viabilidad celular con un ensayo colorimétrico, basado en la escisión de sales de tetrazolio por la deshidrogenasa mitocondrial en células viables.</p> <p><b>Azul Tripán:</b> Es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas.</p> <p><b>Live/Dead:</b> Este ensayo proporciona información sobre el estado funcional de la célula mediante la</p>	Cuantitativa	<p><b>WST-1:</b> Espectro fotómetro de una longitud de onda comprendida entre 490 y 620 nanómetros, todas las lecturas se realizaron por triplicado.</p> <p><b>Azul Tripán:</b> Método de tinción por exclusión se realiza el conteo por medio de una cámara de Neubauer.</p> <p><b>Live/Dead:</b> Longitud de onda de emisión de 515 nm. El homodímero de etidio muestra fluorescencia (longitud de onda</p>

	<p>detección de la actividad de esterasa citoplasmática.</p>		<p>de emisión de 617 nm) solo después de unirse al ADN. La fluorescencia roja aparece solo en las células en las que la membrana celular está alterada (células muertas).</p>
<p>Medicamentos</p>	<p>Triple pasta antibiótica (TAP). Es un agente antimicrobiano efectivo que crea condiciones adecuadas para la revascularización del tejido, usando los siguientes antibióticos, ciprofloxacina, metronidazol y minociclina.</p> <p>Endosequence: es un material biocerámico, está</p>	<p>Cuantitativo</p>	<p>Por medio de los ensayos de viabilidad celular.</p>

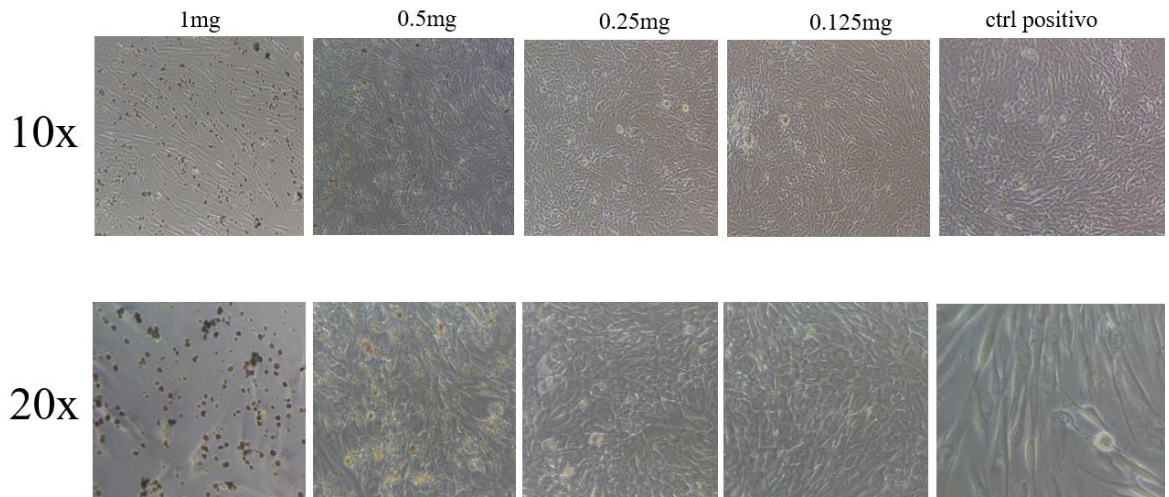
	compuesto por óxido de aluminio y óxido de circonio, vidrio bioactivo, recubrimientos y materiales compuestos, hidroxiapatita y fosfatos reabsorbibles.		
Morfología celular	Es el estudio de las estructuras internas de las células que nos permite, delimitar, definir y clasificar.	Cualitativo	Microscopio óptico

## 5. Resultados

### 5.1 Morfología Celular

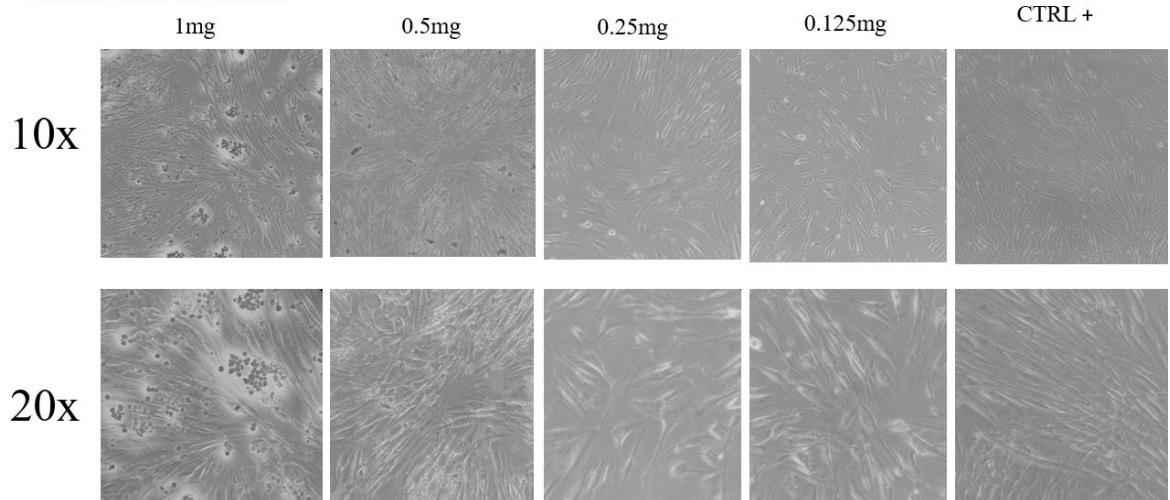
Los resultados encontrados en este estudio demostraron que la pasta Triantibiótica de Hoshino en el día 1, 3, 5 y 7 no alteró la morfología de las células cuando fue sometida a las concentraciones de estudio. En las concentraciones de 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,125 mg/ml se observó proliferación celular y la típica morfología fibroblastoide.

## HOSHINO 1 DIA



*Imagen 12: células madre sometidas a diferentes concentraciones de la pasta triantibiotica de Hoshino, vistas en objetivo 10x y 20x, observando que hay mayor proliferación de células en la concentración 0.125mg/ml y menor proliferación en la concentración de 1 mg/ml en su primer día de exposición, con morfología elongada típica de fibroblasto*

## HOSHINO 3 DIAS



*Imagen 13: células madre sometidas a diferentes concentraciones de la pasta triantibiotica de Hoshino, vistas en objetivo 10x y 20x, observando proliferación de células en todas sus concentraciones en su tercer día e exposición*

### Hoshino 5 Días

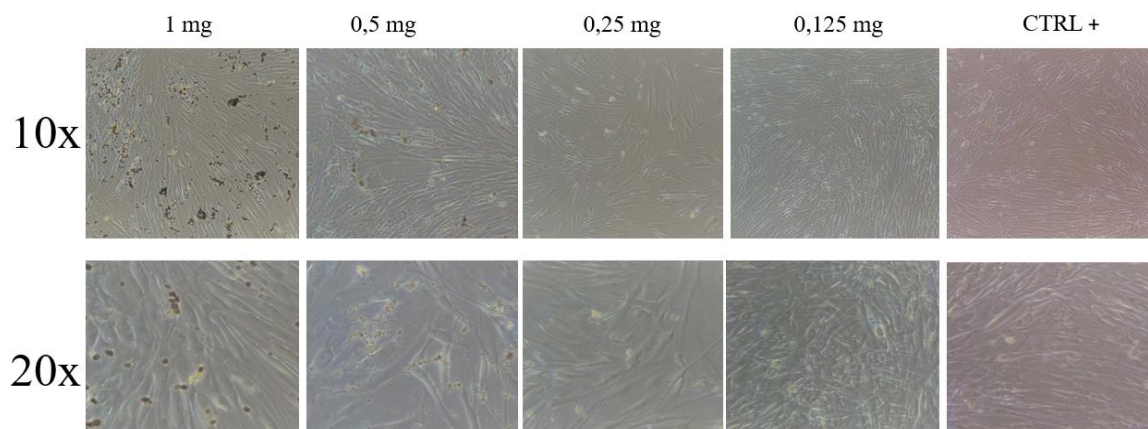


Imagen 14: células madre sometidas a diferentes concentraciones de la pasta triantibiotica de Hoshino, vistas en objetivo 10x y 20x, observando mayor proliferación de células en la concentración 0.125mg/ en su quinto día de exposición.

### HOSHINO 7 DIA

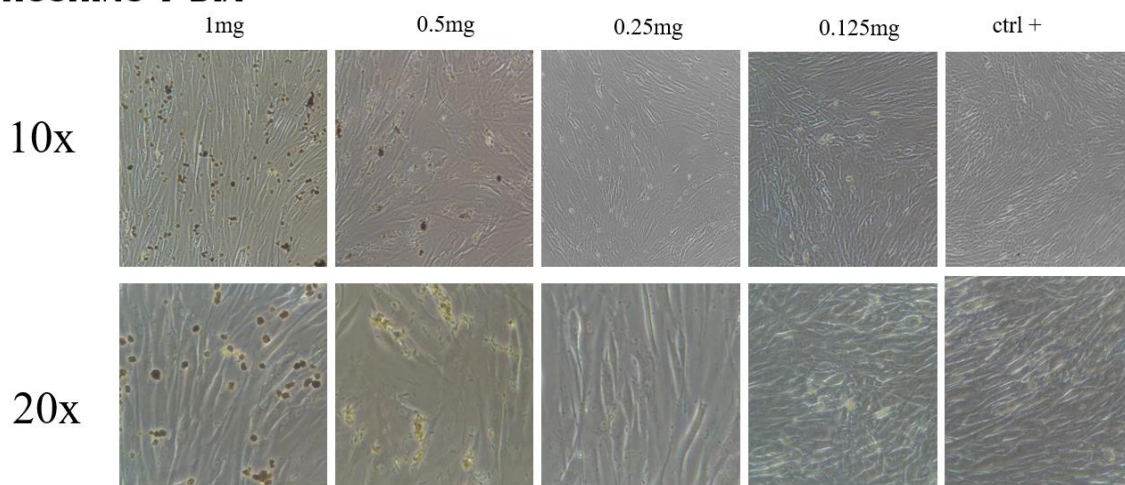


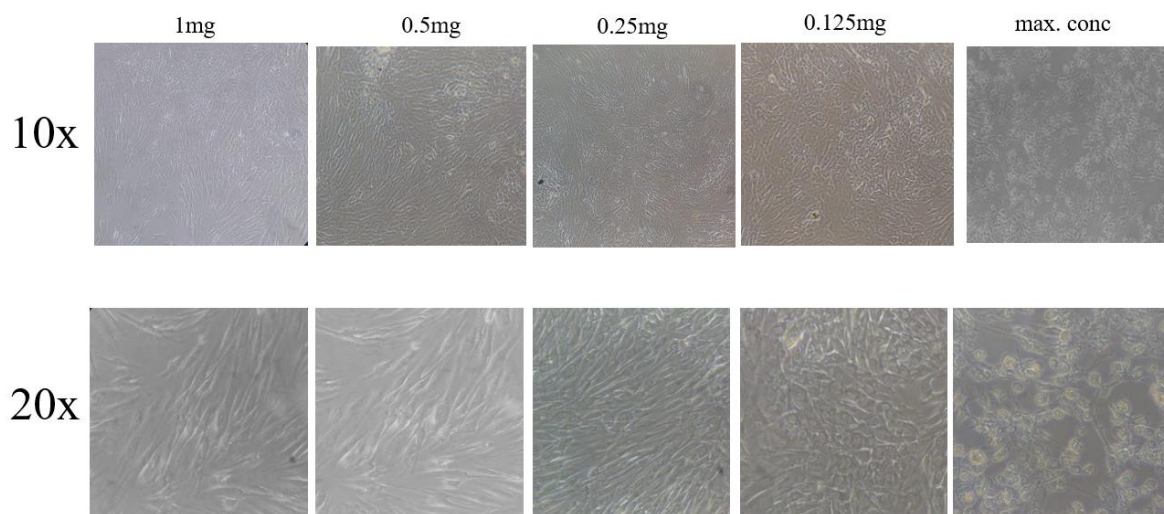
Imagen 15: células madre sometidas a diferentes concentraciones de la pasta triantibiotica de Hoshino, vistas en objetivo 10x y 20x, observando mayor proliferación celular en la concentración 0.125mg/ml y que mantienen su típica morfología fibroblastoide en su séptimo día de exposición.

Comparando al otro material, Endosequence, mostró alteración morfológica a la concentración recomendada por la casa comercial (máxima concentración) en los días 1, 3 5 y 7. Se observan células redondeadas, sin conexiones entre sí, incluso pierden adherencia a la superficie de cultivo. Por otro lado, las concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml



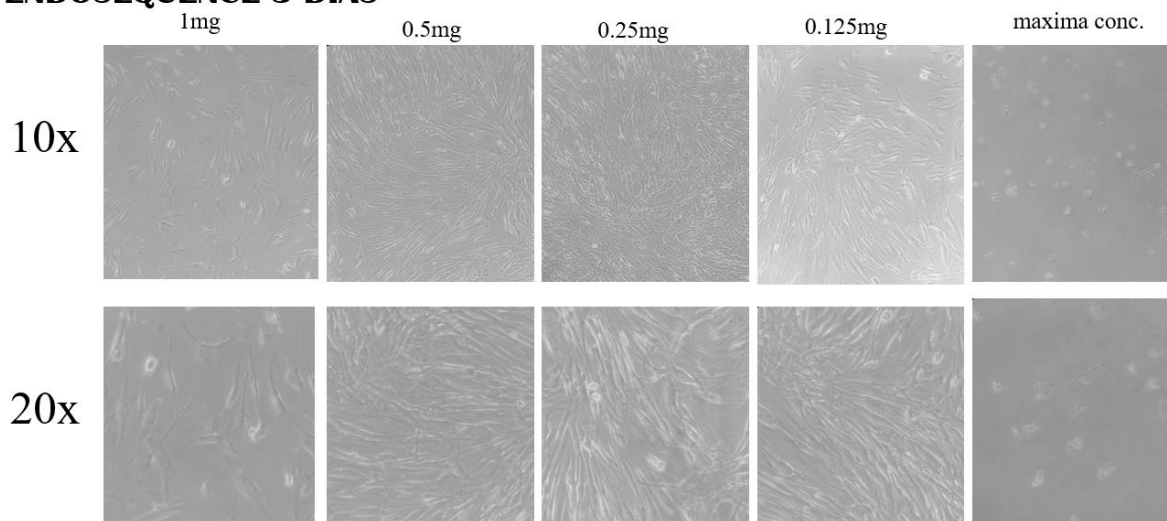
y 0,125 mg/ml no presentaron alteración morfológica, se observa proliferación celular y conexiones entre células.

### ENDOSEQUENCE 1 DIA



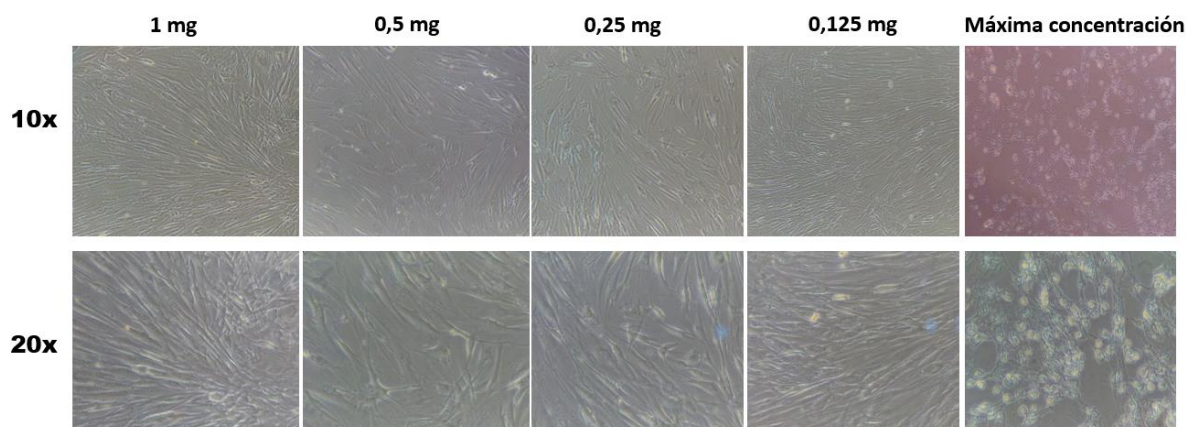
*Imagen 16: células madre sometidas a diferentes concentraciones de endosequence vistas en objetivo 10x y 20x, observando que hay mayor proliferación de células en la concentración 0.125mg/ml y menor proliferación en la concentración de 1 mg/ml en su primer día de exposición.*

### ENDOSEQUENCE 3 DIAS



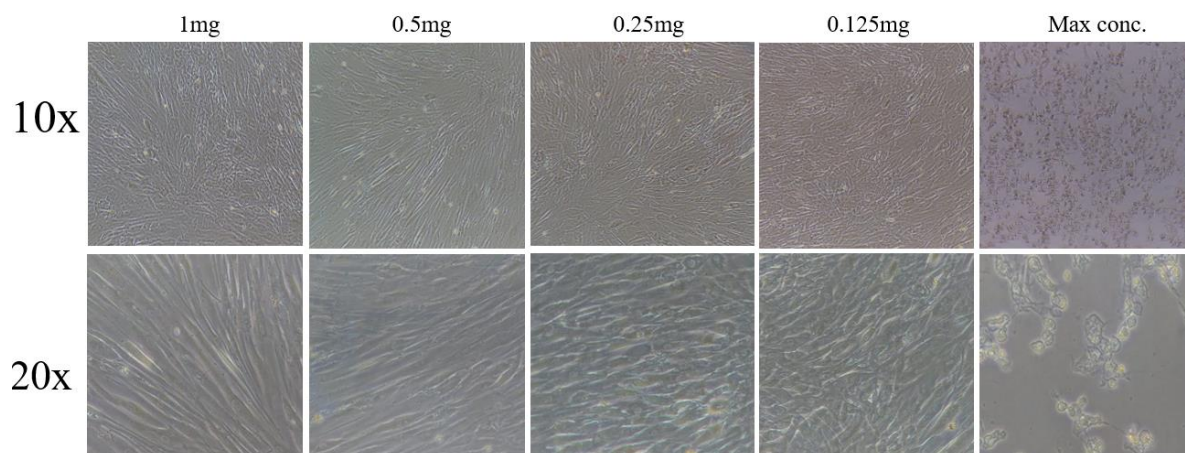
*Imagen 17: células madre sometidas a diferentes concentraciones de endosequence vistas en objetivo 10x y 20x, observando que hay mayor proliferación de células en la concentración 0.5 mg/ml, 0.25mg/ml y 0.125mg/ml y menor proliferación celular en la concentración de 1 mg/ml y en su máxima concentración un cambio de morfología de forma redondeada en su tercer día de exposición*

## Endosequence 5 Días



*Imagen 18: células madre sometidas a diferentes concentraciones de endosequence vistas en objetivo 10x y 20x, observando proliferación de células en la concentración 1 mg/ml, y en su máxima concentración un cambio de morfología en su quinto día de exposición*

## ENDOSEQUENCE 7 DIAS



*Imagen 19: células madre sometidas a diferentes concentraciones de endosequence vistas en objetivo 10x y 20x, observando que hay mayor proliferación de células en todas sus concentraciones y en su máxima concentración persiste el cambio de morfología en forma redondeada en su séptimo día de exposición*

### 5.2 Ensayo de viabilidad celular Azul Tripán

Los resultados de este estudio mostraron que la pasta de Hoshino a concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,250 mg/ml tienen un comportamiento diferente en la viabilidad celular en los días 1, 3, 5 y 7 mostrando porcentajes de viabilidad celular de menos del 90% con una



tendencia a la disminución de viabilidad al paso de los días. Por otro lado, la concentración de 0,125 muestra un porcentaje de viabilidad celular del 93% en el primer día de cultivo y una tendencia de comportamiento similar en el día 7.

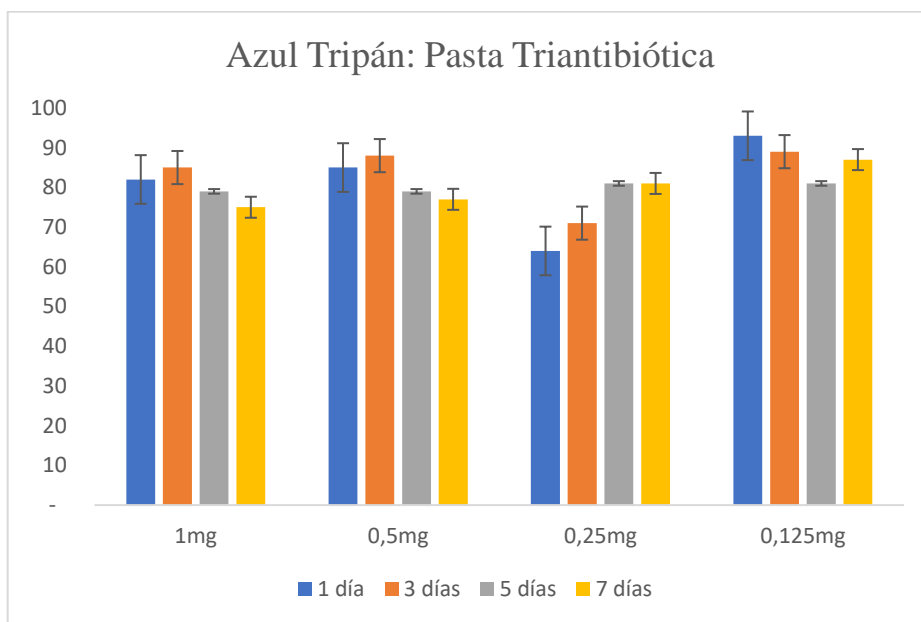


Gráfico 1: Viabilidad celular con azul tripán de Pasta triantibiótica.

Por otro lado, Endosequence a su máxima concentración presentó alteración de la viabilidad celular en todos los días 1, 3, 5 y 7 presentando porcentajes de viabilidad menores al 67%. Las concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml tuvieron comportamiento similar en los diferentes días, presentando porcentajes de viabilidad celular mayores al 80%.

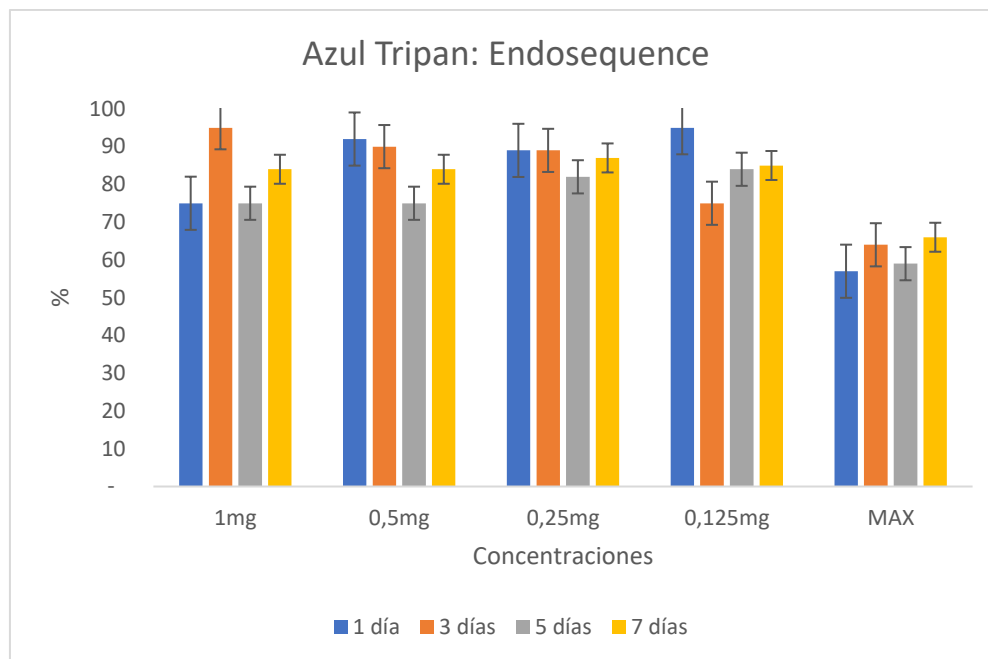


Gráfico 2: Viabilidad celular con azul tripán de Endosequence

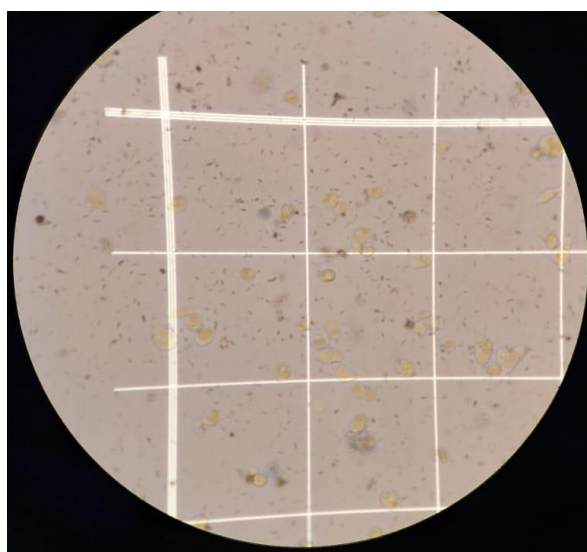


Imagen 20: imagen en objetivó 20x, observando muerte celular, las que se encuentran teñidas con azul

### 5.3 Ensayo de viabilidad celular WST-1

En cuanto a los resultados encontrados de WST-1 se observó que la concentración de 1 mg de la pasta de Hoshino en los días 1, 3, 5 y 7 presenta un porcentaje de viabilidad celular de menos del 50%. Sin embargo, la concentración de 0,5 mg/ml en los días 1 y 3

tuvieron un porcentaje bajo de viabilidad celular menor al 56%. En cambio, se observó un aumento de viabilidad celular en los días 5 y 7 con un 89 y 88% respectivamente. En cuanto a la concentración de 0,250 mg/ml se pudo observar una disminución de viabilidad celular en los días 1 y 3 presentando un porcentaje de viabilidad celular de menos del 64%. En los días 5 y 7 se vio la tendencia de incrementar el perfil de viabilidad a valores del 94% y 91%. Finalmente, la concentración de 0,125 mg/ml presentó en el día 1 un 27% de viabilidad celular mientras que en los días 3, 5 y 7 hubo un aumento de 86%, 97% y 91%.

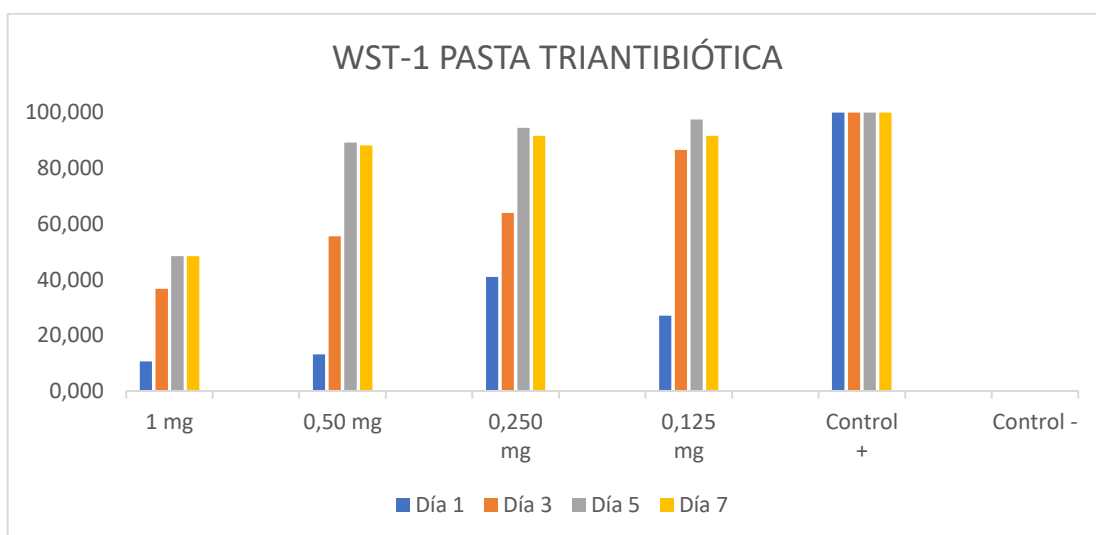


Gráfico 3: Viabilidad celular WST-1 de pasta triantibiótica.

Por otro lado, los resultados arrojados en este estudio en cuanto a la viabilidad celular el material Endosequence a su máxima concentración presento un porcentaje de viabilidad celular menor al 10% en los días 1, 3, 5 y 7. Sin embargo, las concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,125 mg/ml mostraron porcentaje de viabilidad celular menores al 59% en los días 1, 3, 5 y 7.

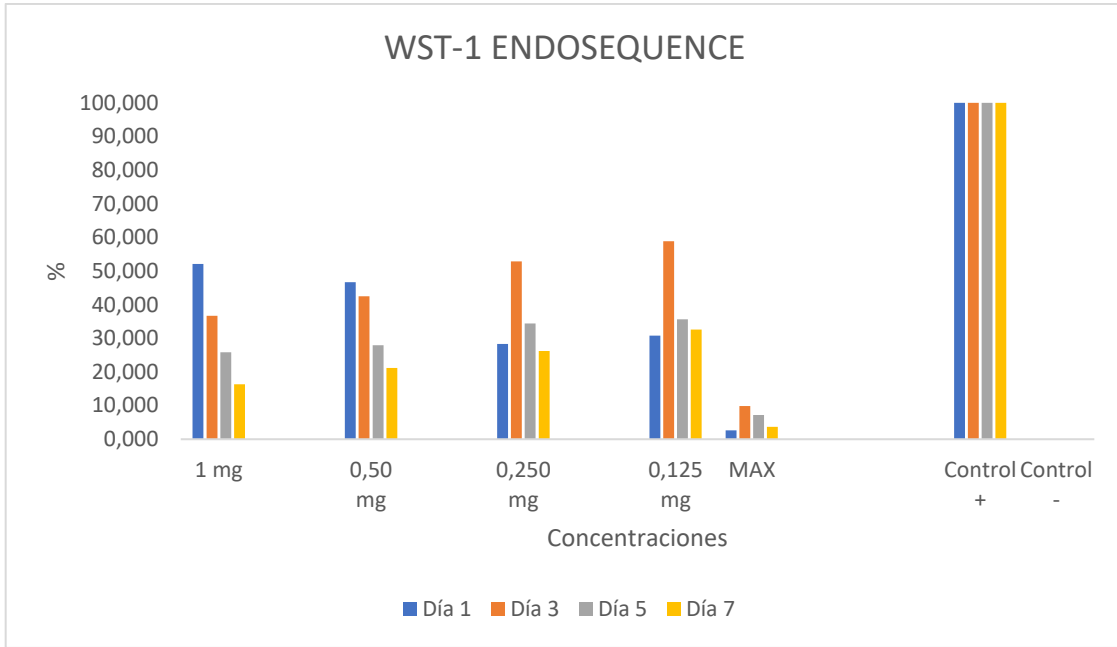


Gráfico 4: Viabilidad celular WST-1 de Endosequence

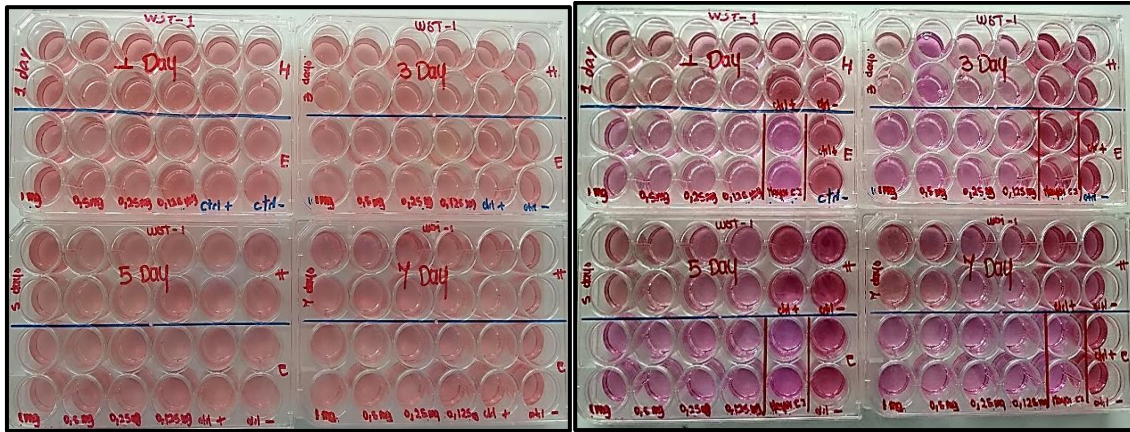


Imagen 21

Imagen 22

Se realiza diseño de concentraciones sobre pocillos, se agregan células en los pocillos, se deja en incubadora, se agrega el medio y luego se adiciona pasta triantibiotica y endosequence a diferentes concentraciones.

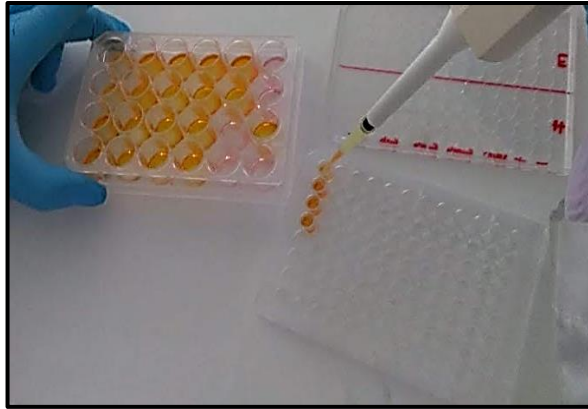


Imagen 23



Imagen 24



Imagen 25

*Imagen 22,23,23,24,25: Proceso realizado para el ensayo WST-1 determinando la capacidad proliferativa y funcionalidad mitocondrial de las células madre de la papila apical*

#### **5.4 Ensayo de viabilidad celular LIVE-DEAD**

El ensayo de viabilidad celular en esta investigación arrojó que la pasta de Hoshino tuvo un comportamiento similar en cuanto a viabilidad celular en los diferentes días de evaluación. Se observó porcentajes de viabilidad celular mayores al 68% en las concentraciones de 1

mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,250 mg/ml. La concentración de 0,125 mg/ml presentó un porcentaje de viabilidad comprendido entre un 75% y un 87% en los diferentes días analizados.

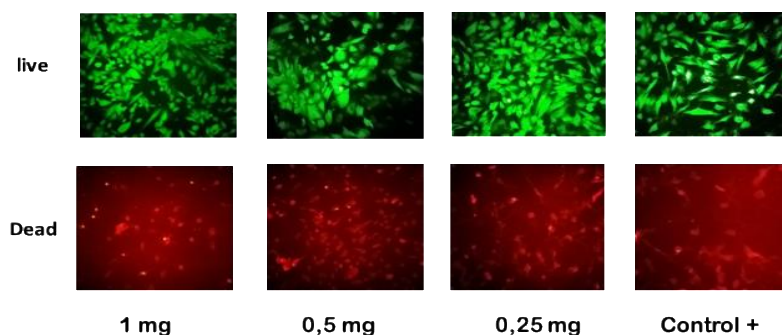


Imagen 26: Hoshino 1 día.: microfotografías con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, en verde observamos las células vivas y en rojo marcados los núcleos de las células muertas y con membranas alteradas.

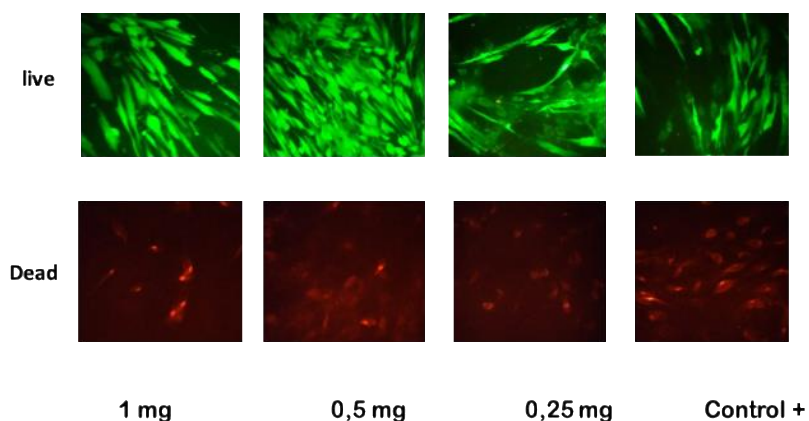


Imagen 27: Hoshino 3 días, microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando viabilidad celular y menor cantidad de células muertas.

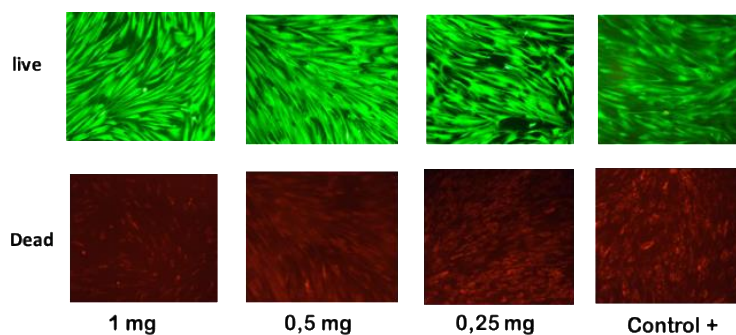
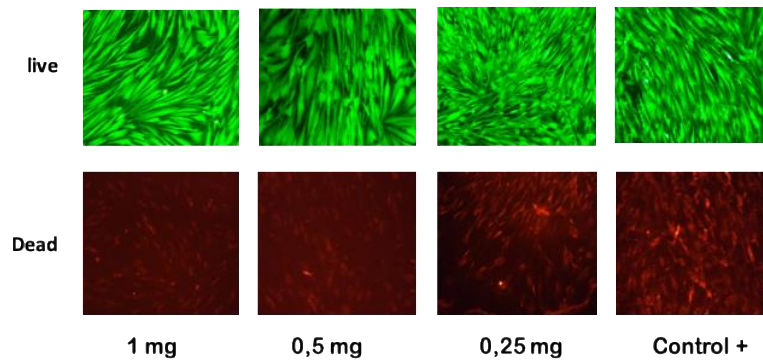


Imagen 28: Hoshino 5 días, microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando gran cantidad de células vivas en todas sus concentraciones, así como gran cantidad de células muertas.

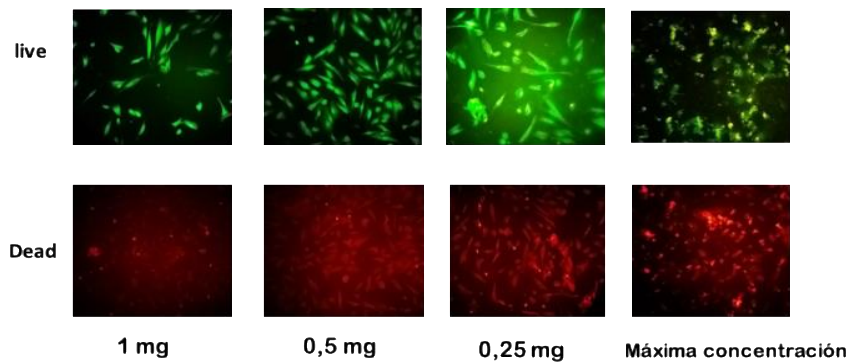




*Imagen 29: Hoshino 7 días, microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando gran cantidad de células madre vivas en sus diferentes concentraciones y menor cantidad de células muertas.*

Así que, la concentración máxima de Endosequence mostró un porcentaje bajo de viabilidad celular de menos del 43% en los diferentes días evaluados. Las concentraciones de 1mg/, 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml y 0,125 mg/ml presentaron porcentaje bajo de viabilidad celular entre un 47% y 62%.

En este ensayo se pudo observar alteración de la morfología cuando las células fueron puestas en contacto con la concentración máxima de Endosequence. Se observaron células redondeadas, teñidas de color verde sin evidencia de interacción celular. Además, se observó un gran porcentaje de células muertas teñidas de color rojo.



*Imagen 30: Endosequence 1 día, microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, en verde observamos las células vivas y en rojo marcados los núcleos de las células muertas y con membranas alteradas, observando gran cantidad de muerte celular.*

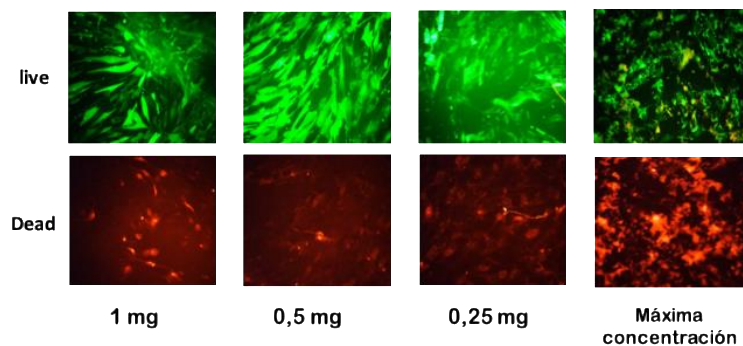


Imagen 31: Endosequence 3 días. microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando mayor cantidad de células vivas en comparación al primer día, y menor cantidad de muerte celular en la concentración de 1mg/ml.

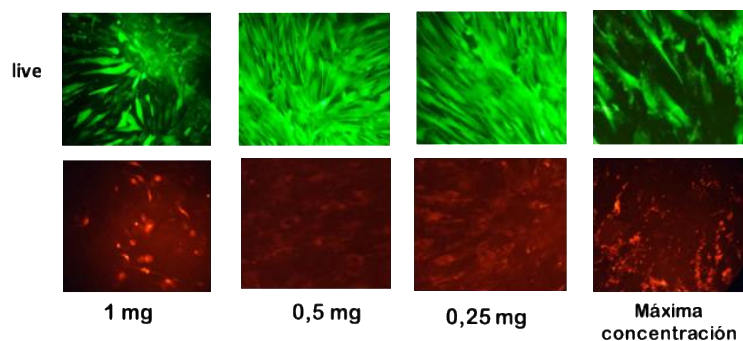


Imagen 32: Endosequence 5 días, microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando mayor cantidad de células vivas en comparación a los anteriores días, pero aun persiste la muerte de gran cantidad de células.

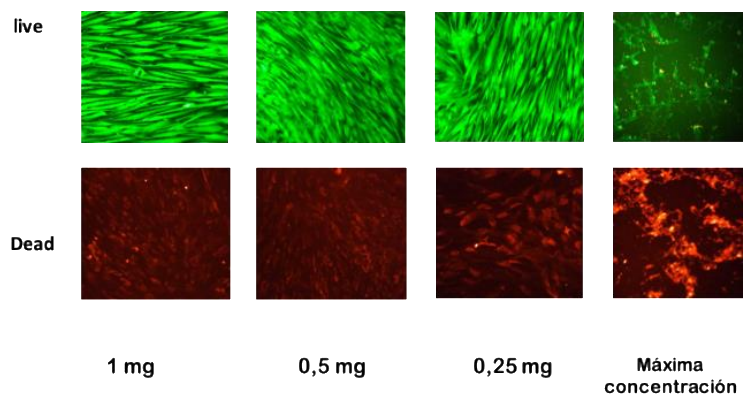


Imagen 33: Endosequence 7 días. microfotografía con microscopio óptico invertido de células madre de la papila apical, observando cambio de morfología en forma redondeada sin interacción celular en su máxima concentración igual que los anteriores días .



## 6. Discusión

Actualmente se han venido incrementando el número de publicaciones en el ámbito de la endodoncia regenerativa. Publicaciones relacionadas con reportes de casos clínicos, pruebas in vivo han tratado de evaluar los diferentes medicamentos y materiales utilizados en este procedimiento regenerativo (Kottoor J, 2013) (Nikita B. Ruparel, 2012) (Stambolsky C, 2016). Sin embargo, no hay un protocolo general establecido que indique el uso de antibióticos y materiales para llevar a cabo este tipo de procedimientos.

Muchos de los trabajos reportados se han focalizado en testear los efectos citotóxicos de las diferentes combinaciones de antibióticos para contrarrestar la infección de un diente necrótico que cumpla con las características para un tratamiento regenerativo (Phumpatrakom P, 2014) (Chuensombat S K. S., 2013) (Labban N, 2014) . Adicional a esto, la nueva generación de biomateriales cerámicos también está siendo considerada para lograr estos objetivos regenerativos. (Jitaru S, 2016) (Öncel Torun Z, 2015) (Dom Y, 2017)

Distintas metodologías ex vivo se han propuesto para evaluar los efectos citotóxicos de los antibióticos y materiales utilizados en proceso endodónticos regenerativos. Hasta la fecha no hay un reporte donde utilicen diferentes pruebas metabólicas La mayoría de los estudios se basan en el uso de un solo ensayo metabólico y un modelo celular de fibroblastos orales para determinar ese efecto citotóxico (Labban N, 2014) (Willershausen I, 2011) (Alanezi AZ, 2010)

En este estudio, proponemos evaluar la citotoxicidad celular usando una batería de pruebas metabólicas más completa que otros estudios, analizando no solo la actividad mitocondrial con la prueba WST-1, sino la integridad de membrana y la morfología celular mediante la prueba de Azul Tripán y Live Dead. Adicional a esto, proponemos células madre de la papila

apical como modelo celular debido a que este tipo de células están directamente relacionadas con la formación del complejo pulpo dentinal cuando un diente está en desarrollo. (Miguel Ángel Martín Piedra, 2012) (Sonoyama W, 2008)

Este estudio mostró que las diferentes concentraciones de la mezcla triantibiótica de Hoshino utilizadas no alteraron la morfología celular ni la adherencia celular. Estos hallazgos están en desacuerdo con lo reportado por Panupat Phumpatrakom (Panupat Phumpatrakom, 2014) quien reportó en un modelo de células madre de la pulpa dental alteración morfológica a una concentración de 0,39 mg/ml. Sin embargo, los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Sorapong Chuensombat (Sorapong Chuensombat, 2013) quién usando células madre de la pulpa dental y células madre de la papila apical usando concentraciones de 25.00, 6.25, 1.56, 0.39, 0.097, y 0.024  $\mu\text{g/ml}$  no encontró cambios en la morfología celular.

Por otro lado, la concentración máxima del material biocerámico Endosequence altera de una forma rápida la morfología celular, observando una forma redondeada con clara evidencia de pérdida de conexión celular y falta de adherencia a la superficie de cultivo. Esto puede deberse a que algunos componentes del Endosequence interactúan negativamente sobre la membrana celular o sobre la actividad metabólica de la célula lo cual hace que haya una modificación morfológica. No se puede determinar en este apartado que haya una muerte celular o un estado apoptótico, para ello es necesario corroborar con otros ensayos.

Estos resultados están en desacuerdo con lo reportado por Inés Willershausen (Willershausen, 2014)) quien usando un modelo de células de fibroblastos de ligamento periodontal y 4 materiales utilizados en endodoncia regenerativa incluido en endosequence no analiza en su publicación la morfología celular. De igual forma, AlAnezi usando un modelo de fibroblastos de ratón L929, y usando la concentración pura según las instrucciones de la casa comercial no hace un análisis de la morfología celular. (Amer Z. AlAnezi, 2010)

En este estudio se utilizó el ensayo metabólico WST-1 por ser una versión mejorada del ensayo convencional MTT que utiliza la mayoría de los investigadores. Este ensayo brinda mejor predictibilidad por ser más sensible y se realiza en menos tiempo. (Miguel Ángel Martín Piedra, 2012)

Se pudo observar que la pasta triantibiótica de Hoshino a una concentración de 1 mg/ml y 0,5 mg/ mililitro en los días 1 y 3 es más citotóxica presentando porcentajes de viabilidad celular bajos. Mientras que las concentraciones de 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml incrementaron el porcentaje de viabilidad celular. Esto podría explicarse que a las células en los días iniciales le afecta el medicamento levemente, pero a medida que pasa el tiempo regula su actividad metabólica promoviendo una estabilidad celular. También se relaciona el dato que una concentración menor favorece la viabilidad celular.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sorapong Chuensombat (Chuensombat S1, 2013) quien analizando con ensayo MTT en 1, 3, 5 y 7 días y usando concentraciones de 25.00, 6.25, 1.56, 0.39, 0.097, and 0.024  $\mu\text{g/ml}$  encontró un porcentaje de viabilidad celular de más del 90% cuando utilizó concentraciones bajas.

Por otro lado, Yadlapati usando el ensayo metabólico XTT reportó que la pasta triantibiótica de Hoshino fue verdaderamente tóxica cuando fue puesta en contacto con células del ligamento periodontal. Observó una viabilidad celular de menos del 30%. Vale la pena mencionar que utilizó concentración de 1g/ml de medicamento en proporción 1:1:1 y se evaluó a 24, 48 y 72 horas. (Yadlapati M1, 2013)

Resultados similares a nuestro estudio fue reportado por Panupat Phumpatrakom reportó utilizando el ensayo metabólico MTT que concentraciones bajas de pasta triantibiótica de Hoshino (0,39 $\mu\text{g/ml}$ ) son favorables para preservar la viabilidad celular. (Panupat Phumpatrakom, 2014)

Amer Z. AlAnezi, encontró que el material biocerámico Endosequence resultó tener buenas propiedades de viabilidad celular en más de un 90% cuando se realizaron diluciones del material en 300µl, 600 µl y 1000 µl en un periodo de evaluación en 24, 48 y 72 horas. Estos resultados fueron obtenidos mediante el ensayo metabólico de MTT. (Amer Z. AlAnezi, 2010).

Estos resultados están en concordancia con nuestros hallazgos donde ampliando el rango de evaluación en días 1, 3, 5 y 7 días usando el ensayo WST-1 se encontró que el material Endosequence a su máxima concentración tal como lo propone la casa comercial es extremadamente tóxico para las células disminuyendo su viabilidad celular en menos de un 30%, Sin embargo, cuando se hacen las diluciones reportadas en este trabajo la viabilidad celular incrementa a más de un 70%. Estos hallazgos sugieren que la célula se ve afectada metabólicamente por este material alterando la actividad mitocondrial.

De igual manera, los resultados reportados en este estudio son similares a lo reportado por Inés Willershausen quien encontró alta tasa de toxicidad celular cuando el material Endosequence en presentación pura fue expuesto a las células del ligamento periodontal en periodos de 24, 48, 72 y 96 horas. (Willershausen II, 2011)

Los hallazgos encontrados en esta investigación utilizando el ensayo de viabilidad celular LIVE-DEAD demostraron que la pasta Triantibiótica de Hoshino a las concentraciones bajas propuestas en este trabajo presentaron una buena adecuada viabilidad celular siendo la más relevante la concentración de 0,125 mg/ml con un porcentaje del 87 % de viabilidad celular. Hasta la fecha no existe ninguna publicación donde utilicen esta técnica para evaluar la citotoxicidad de la pasta triantibiótica.

En contraste con estos resultados, cuando se evaluó el material Endosequence en estado puro propuesto por la casa comercial usando el ensayo de LIVE-DEAD se pudo comprobar que la

viabilidad celular disminuye drásticamente alcanzando niveles menores al 43%. Sin embargo, las concentraciones propuestas para este material, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml también presentaron una tasa de viabilidad celular baja por medio de esta técnica mostrando porcentajes hasta de un 67%. Esta disminución de la viabilidad celular se puede explicar debido a que el material Endosequence presenta algún componente que altera la membrana celular. Sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos que puedan identificar el mecanismo de acción de este material.

Otro hallazgo importante que brinda esta técnica LIVE-DEAD debido a la fluorescencia que puede ser detectada con un microscopio de fluorescencia es la alteración en la morfología celular. Se observa que las células pierden la morfología típica fibroblastoide de una célula madre mesenquimal de la papila apical y se pierden la interacción celular incluso se podría sugerir que las células pierden su capacidad de adherencia. Sin embargo, estudios más específicos deben ser realizados para identificar si las células se encuentran en estado de apoptosis.

Similares resultados fueron encontrados por Inés Willershausen (Willershausen II, 2011) quien utilizando células del ligamento periodontal observo cambios morfológicos y disminución de la viabilidad celular por medio del ensayo LIVE-DEAD. El ensayo de Azul Tripán es uno de los más comunes para evaluar el porcentaje de viabilidad celular sin embargo por sí solo no logra dar resultados significativos. En un estudio realizado por Nikita Ruparel utilizaron células madre de la papila apical para evaluar los efectos citotóxicos de la pasta Triantibiótica de Hoshino a una concentración de 100 mg/ml hasta 0,01mg/ml en un solo periodo de tiempo de 3 días. Utilizaron el ensayo de Azul Tripán y encontraron que las concentraciones de 1mg/ml, 10 mg/ml y 100 mg/ml resultan ser tóxicas para la célula disminuyendo su viabilidad celular hasta en un 58%. (Ruparel NB 1, 2012)

Resultados similares encontramos en este estudio donde se propusieron diferentes concentraciones partiendo de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml. Se observó que la concentración de 1 mg/ml y 0,5 mg/ml disminuyen la viabilidad celular en una poca proporción. Por otro lado, la baja concentración de 0,125 mg/ml mantuvo constante la viabilidad celular hasta un 93% en los diferentes periodos de tiempo evaluados.

En cuanto a la evaluación de Endosequence por medio de este ensayo se observó que la concentración máxima del material disminuye la viabilidad celular súbitamente (menos de un 67%). De igual manera las concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml presentaron disminución de la viabilidad celular mayor a un 80%. Estos valores altos de viabilidad celular pueden ser explicados por el hecho que este tipo de ensayo no es un método preciso para evaluar la viabilidad celular. En este sentido, se recomienda realizar una batería de diferentes ensayos para mejorar la predicción de los resultados.

En la literatura científica actual no se encontraron referencias donde evalúen la viabilidad celular con este tipo de material.

Los resultados encontrados en esta investigación resultan de vital importancia para el odontólogo que está involucrado en realizar procedimientos endodónticos regenerativos. El hecho de utilizar diferentes pruebas para analizar la viabilidad y como inciden los antibióticos de uso tradicional y los materiales biocerámicos más modernos, permite abordar el análisis desde diferentes ópticas ese comportamiento celular: En primer lugar, se hacen análisis de la integridad de la membrana y en segundo lugar se evalúan los procesos metabólicos a nivel mitocondrial. La mayoría de los estudios reportados en la literatura se limitan a utilizar un solo ensayo.

Estos hallazgos sugieren que la pasta triantibiótica de Hoshino a las bajas concentraciones propuestas en este estudio pueden ser utilizadas en procedimientos endodónticos regenerativos sin alterar drásticamente la viabilidad celular.

Por otro lado, no se debe usar en concentración pura el material biocerámico Endosequence debido a que altera estructural y metabólicamente a las células madre de la papila apical. Células importantes en la formación del complejo pulpo dentinal.

Sin embargo, según estos resultados es recomendable realizar diferentes concentraciones diluyendo la presentación pura del material.

Por otro lado, dentro las limitaciones de esta investigación no se realizaron estudios, que comprueben la efectividad de estas concentraciones en la formación de procesos regenerativos, es decir, identificar proteínas típicas involucradas en proceso regenerativos.

Además, no se realizó un análisis si las concentraciones de la Pasta Triantibiótica de Hoshino y Endosequence ejercen adecuada actividad antibacterial.

Finalmente, el odontólogo debe estar actualizado en el desarrollo de las técnicas regenerativas basándose en la evidencia científica reportada den revistas de alto impacto.

## **7. Conclusiones**

La Pasta Triantibiótica de Hoshino a concentraciones de 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml y 0,125 mg/ml no afecta la viabilidad de las células madre de la papila apical. Por tanto, podría ser utilizada en protocolos de endodoncia regenerativa.

La presentación comercial pura del material biocerámico Endosequence altera la estructura y metabolismo a nivel mitocondrial de las células de la papila apical. Por tanto, su viabilidad celular se ve seriamente afectada por tal motivo no se recomienda usarla en protocolos de endodoncia regenerativa.

El material biocerámico Endosequence, aunque a concentración baja de 0,125 mg/ml presenta considerable disminución de la viabilidad celular podría ser utilizado en protocolos de endodoncia regenerativa con precaución haciendo un control clínico y radiográfico más exhaustivo del paciente.

El uso de varias técnicas simultáneas para evaluar la viabilidad celular permite analizar estructuras y metabolismo celular al mismo tiempo, que cuando se usa una sola técnica. De esta forma se obtienen detalles más exactos lo cual podría facilitar la toma de decisiones para elegir el material de elección para un procedimiento clínico endodóntico regenerativo.

El modelo de células madre de la apical permite obtener resultados más fiables debido a la relación directa que tienen en los procesos de formación del complejo pulpo dentinal.

## **8. Recomendaciones**

Realizar estudios para verificar el potencial antibacteriano de las diferentes concentraciones propuestas en este estudio tanto de la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence.

Realizar estudios sobre si las concentraciones propuestas en este estudio de la pasta triantibiótica de Hoshino y Endosequence intervienen en las propiedades regenerativas de las células de papila apical.

Realizar pruebas de ADN y expresión génica cuando las células sean expuestas a estos materiales.

Realizar estudios con otros materiales que están surgiendo como el Biodentine.



## **Bibliografía**

- Alanezi AZ, J. J. (2010). Evaluación de citotoxicidad del material de reparación de raíz de endosecuencia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* .
- Albuquerque MT, V. M. (2014). Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res.*
- Alobaid, A. S., Cortes, L. M., Lo, J., Nguyen, T. T., Albert, J., Abu-Melha, A. S., ... Gibbs, J. L. (2014). Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: A pilot retrospective cohort study. *Journal of Endodontics*
- Bharadwaj S, L. G. (2013). Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells.*
- Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004
- Chuensombat S, K. S. (2013). Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.* .
- Chuensombat S, K. S. (2013). Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.* .
- commons, c. (2008). Conteo celular y evaluación de viabilidad. *Laboratorio de Genómica Viral y Humana*, 5.
- Damas BA, W. M. (2011). Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod.*
- Dom Y, L. T. (2017). Effect of iRoot Fast Set root repair material on the proliferation, migration and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *PLoS One.*

- Dra. Lidyce Quesada Leyva, D. C. (2017). Stem cells: a revolution in regenerative medicine. *MEDISASN*, 8.
- Gamboa, D. K., Calderón, D. J., Menéndez, L. J., & Carballo, D. N. (2012). Uso de células madre en el complejo bucofacial. *scielo*, 7.
- Gamboa, K. B., Calderón, D. J., Menéndez, L. J., & Carballo, D. N. (2012). Use of stem cells in the orofacial complex. *Revista Archivo Médico de Camagüey*.
- Garcia-Godoy F, M. P. (2012). Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol*.
- Gucciardino F, M. H. (2015). Revascularización con pasta tri-antibiótica. Revisión bibliográfica. *cient dent* .
- Hargreaves, A. D. (2013). An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic topics*.
- Jitaru S, H. I. (2016). The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med*.
- JP., L. R. (1993). Tissue engineering. *Science*.
- Julie A. Berkhoff, P. B. (2014). Evaluation of Triple Antibiotic Paste Removal by Different Irrigation Procedures. *journal of endodontics*.
- Kottoor J, V. N. (2013). Revascularization for a necrotic immature permanent lateral incisor: a case report and literature review. *Int J Paediatr Dent*.
- Labban N, Y. G. (2014). The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol*.
- Martin G, R. D. (2013). Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*.
- Miguel Ángel Martín Piedra, I. G.-Q. (2012). Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp. *Actualidad médica*.

- Miguel Angel Martin-Piedra, I. G.-R. (2014). Viabilidad celular y capacidad de proliferación de cultivos de células madre de pulpa dental humana a largo plazo. *International society ISCT cell & Gene Therapy*, 12.
- Miller, A. A., Takimoto, K., Wealleans, J., & Diogenes, A. (2018). Effect of 3 Bioceramic Materials on Stem Cells of the Apical Papilla Proliferation and Differentiation Using a Dentin Disk Model. *Journal of Endodontics*
- Nakashima M, I. K. (2011). Regeneración de pulpa dental por células madre. *Adv Dent Res*.
- Nikita B. Ruparel, D. M. (2012). Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem. *Basic Research—Technology*.
- Öncel Torun Z, T. D. (2015). Effects of iRoot BP and white mineral trioxide aggregate on cell viability and the expression of genes associated with mineralization. *Int Endod J*.
- Petrino JA, B. K. (2010). Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod*.
- Phumpatrakom P, S. T. (2014). Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3-antibiotic mixture. *J Endod*.
- Sijia Na1, H. Z. (2013). Regeneration of dental pulp/dentine complex with. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, 10.
- Sonoyama W, L. Y. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*.
- Stambolsky C, R.-B. S.-P.-L.-G.-E. (2016). Histologic characterization of regenerated tissues after pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis using tri-antibiotic paste and platelet-rich plasma. *Arch Oral Biol*.
- Takushige T1, C. E. (2004). Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J*.

Wigler R, K. A.-M. (2013). Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod.* .

Willershausen I, C. A. (2011). In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.*