



**Evaluación de la viabilidad celular de las células madre de la papila apical expuestas al biocerámico MTA (Mineral Trióxido Agregado). Estudio ex vivo**

**Leidy Katherine Pinzón Chacón**

Código 10571624771

**Santiago Hernández Morales**

Código 10571614763

**Universidad Antonio Nariño**

Programa de odontología

Facultad de Odontología

Bogotá, Colombia

2021

**Evaluación de la viabilidad celular de las células madre de la papila apical expuestas  
al biocerámico MTA (Mineral Trióxido Agregado). Estudio ex vivo**

**Leidy Katherine Pinzón y Santiago Hernández**

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Odontólogo General**

Director (a):

PhD Biomedicina-Ingeniería Tisular, Camilo Andrés Alfonso Rodríguez

Codirector (a):

Odontóloga - Magíster en Salud Pública, Yeily Isabel Thomas Alvarado

Línea de Investigación:

Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa

Grupo de Investigación:

Salud Oral

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Pregrado

Facultad de Odontología

Bogotá, Colombia

2021

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

El trabajo de grado titulado “Evaluación de la viabilidad celular de las células madre de la papila apical expuestas al material biocerámico MTA (Mineral Trióxido Agregado).

Estudio ex vivo”, elaborado por Katherine Pinzón y Santiago Hernández, ha sido aprobado como requisito parcial para optar el título de Odontólogo General.

---

Firma del Tutor

---

Firma Jurado

---

Firma Jurado

Bogotá, 5 noviembre 2021

### ***Dedicatoria***

*Dedico este trabajo primeramente a Dios por darme la oportunidad de hacer parte de este maravilloso equipo de trabajo, a mi familia por apoyarme en este proceso, y a los dos grandes asesores que nos estuvieron acompañando.*

*Katherine Pinzón Chacón*

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por brindarme la oportunidad de hacer parte de este equipo, a mis padres por ser los pilares más importantes y por demostrar siempre su apoyo, y a los dos grandes asesores que nos estuvieron acompañando con su profesionalismo.*

*Santiago Hernández Morales*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Antonio Nariño por brindarnos la oportunidad de formarnos como profesionales y por suminístranos las instalaciones para cumplir con el objetivo de la tesis de grado.

Al Doctor Camilo Alfonso, nuestro director de tesis, que aportó sus conocimientos, su tiempo, dedicación, y su persistencia, con su profesionalismo, dirigiéndonos con éxito en este proyecto.

A la Doctora Yeily, por sus enseñanzas y motivación para no desfallecer, brindándonos unas bases sólidas para el fundamento de la tesis de grado.

Por último, a todos los que hicieron parte en la elaboración del trabajo y nos transmitieron todos sus conocimientos y dedicación, para lograr la culminación de esta tesis de grado con éxito, cumpliendo su objetivo planteado.

## Tabla de contenido

1	Introducción .....	12
2	Planteamiento del problema.....	13
2.1	Pregunta de investigación.....	14
3	Objetivos .....	15
3.1	Objetivo general .....	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	Justificacion .....	16
5	Marco teorico .....	17
5.1	Endodoncia regenerativa.....	17
5.2	Apexogenesis y apexificación.....	19
5.3	Revascularización.....	20
5.4	Células madre.....	21
5.5	Células madre de la papila apical .....	22
5.6	Biocerámicos.....	23
5.7	MTA.....	24
5.8	Indicaciones MTA.....	25
5.9	Ensayo de viabilidad celular .....	28
5.10	Ensayo de Azul Tripán .....	29
5.11	Ensayo de proliferación metabólica WST-1 y viabilidad celular.....	30
5.12	Citotoxicidad .....	30
5.13	Cultivo celular .....	31

6	Metodología .....	31
6.1	Recolección de la muestra.....	32
6.2	Cultivo celular.....	33
6.3	Preparación de las concentraciones de MTA .....	34
6.4	Análisis de la viabilidad celular .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
6.5	Análisis de viabilidad celular mediante azul tripán .....	36
6.6	Análisis morfológico y evaluación de la adherencia celular.....	36
6.7	Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo metabólico WST-1 .....	<b>¡Error!</b>
<b>Marcador no definido.</b>		
6.7.1	Protocolo para ensayo metabólico WST-1	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
6.8	Análisis de la proliferación de la proliferación celular .....	37
6.9	Análisis estadístico.....	37
6.10	Consideraciones éticas.....	38
7	Resultados .....	39
7.1	Análisis morfológico y adherencia celular.....	39
7.2	Viabilidad celular mediante azul tripán .....	42
7.3	Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo metabólico WST-1.....	45
7.4	Análisis de la proliferación celular.....	49
8	Discusión.....	52
9	Conclusiones .....	58
10	Bibliografía .....	59

**Lista de figuras**

Figura 1 MTA Angelus .....	35
Figura 2 Microscopia electrónica 10x, en el día 1 .....	39
Figura 3 Microscopia electrónica 10x, en el día 3 .....	40
Figura 4 Microscopia electrónica 10x, en el día 5 .....	41
Figura 5 Microscopia electrónica 10x, en el día 7 .....	42
Figura 6 Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 1 .....	43
Figura 7 Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 3 .....	44
Figura 8 Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 5 .....	44
Figura 9 Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 7 .....	45
Figura 10 Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 1.....	46
Figura 11 Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 3.....	46
Figura 12 Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 5.....	47
Figura 13 Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 7.....	47
Figura 14 Representacion grafica del ensayo WST-1.....	48
Figura 15 Lectura del ensayo WST-1, mediante espectrofotometro.....	48
Figura 16 Análisis de proliferación celular, en el día 1 .....	49
Figura 17 Análisis de proliferación celular, en el día 3 .....	50
Figura 18 Análisis de proliferación celular, en el día 5 .....	50
Figura 19 Análisis de proliferación celular, en el día 7 .....	51

**Lista de tablas**

Tabla 1 Operacionalización de las variables ..... 32

Tabla 2 Concentraciones experimentales utilizadas ..... 34

## Resumen

**Objetivo:** evaluar la viabilidad del biocerámico MTA sobre las células madre de la papila apical ex-vivo mediante el ensayo metabólico de WST-1 y Azul Trypan.

**Materiales y métodos:** estudio Ex Vivo, se utilizó una muestra de células madre de la papila apical descongeladas, se realizó un cultivo celular, a cada uno se le hizo pruebas de microscopia óptica identificando la morfología celular hasta observar la proliferación celular, luego se pasó con el MTA, se evaluó la actividad mitocondrial mediante la prueba WST-1 y Azul trypan, a concentraciones de 10mg, 5mg, 2.5mg y 1.25mg

Luego se agregó el medicamento en el cultivo de células madre, se definió los días (1, 3, 5, 7) días por la cual los medicamentos permanecieron en el cultivo celular y a cada respectivo se le realizo prueba de viabilidad celular.

**Resultados:** el Bioceánico MTA en los días 3, 5 y 7 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 las células adheridas en todas las concentraciones no presentan conexiones ni ramificaciones ni la típica morfología fibroblastoide y la población celular disminuida. En cuanto a la viabilidad celular en los estudios realizados de azul tripán y WST-1 en los días 3, 5, y 7 se evidencio que todas las concentraciones de MTA propuestas, afectaron negativamente la viabilidad celular. El análisis de proliferación celular en todas las concentraciones demostró que en los días 1 y 3 se observó un crecimiento exponencial, al contrario de los días 5 y 7 que se vieron afectadas.

**Discusión:** la variedad de ensayos in vitro encaminados a la regeneración y revascularización pulpar, con materiales biocerámicos; donde analizan la viabilidad y estimulación de las células madre de la papila apical inducidas por estos cementos. Donde las

concentraciones planteadas en el estudio y más la concentración pura mostro efectos negativos, en el año del 2020 Sanz y cols, realizaron una revisión, evaluando la viabilidad y estimulación de las células madre de la papila apical, inducidas por materiales a base de silicato, mostrando efectos negativos a mayor concentración de este biocerámico, en cuanto a la viabilidad

**Conclusión:** El biocerámico MTA demostró que todas las concentraciones propuestas en el estudio afectaron negativamente la actividad metabólica celular, la presentación comercial pura del biocerámico MTA altera la estructura y metabolismo a nivel mitocondrial de las células de la papila apical, por lo tanto, su viabilidad celular se ve seriamente afectada. También demuestra que afecta la proliferación celular.

*Palabras claves MTA, regeneración, viabilidad celular, células madre, papila apical*

## Abstract

**Objective:** to evaluate the viability of the bioceramic MTA on the ex-vivo apical papilla stem cells by means of the metabolic assay of WST-1 and Trypan Blue.

**Materials and methods:** Ex Vivo study, a sample of thawed apical papilla stem cells was used, a cell culture was performed, each one underwent optical microscopy tests identifying cell morphology until cell proliferation was observed, then it was passed with MTA, mitochondrial activity was evaluated using the WST-1 test and Trypan Blue, at concentrations of 10mg, 5mg, 2.5mg and 1.25mg

Then the drug was added in the stem cell culture, the days (1, 3, 5, 7) for which the drugs remained in the cell culture were defined and each respective cell viability test was performed.

**Results:** the Bioceramic MTA on days 3, 5 and 7 altered the morphology of the cells when it was subjected to the study concentrations. At the concentrations of 0.5 mg / ml, 0.25 mg / ml and 0.125 mg / ml, adhered cells were observed in all concentrations without connections or branches or the typical fibroblast morphology and decreased cell population. Regarding cell viability, in the studies of trypan blue and WST-1 on days 3, 5, and 7, it was evidenced that all the proposed MTA concentrations negatively affected cell viability. Cell proliferation analysis at all concentrations showed that exponential growth was observed on days 1 and 3, contrary to days 5 and 7, which were affected.

**Discussion:** the variety of in vitro tests aimed at pulp regeneration and revascularization, with bioceramic materials; where they analyze the viability and stimulation of the apical papilla stem cells induced by these cements. Where the concentrations raised in the study and more the pure concentration showed negative effects, in the year 2020 [Sanz et al](#), carried out a review, evaluating the viability and stimulation of the apical papilla stem cells, induced by silicate-based

materials. , showing negative effects at a higher concentration of this bioceramic, in terms of viability

**Conclusion:** The MTA bioceramic showed that all the concentrations proposed in the study negatively affected the cellular metabolic activity, the pure commercial presentation of the MTA bioceramic alters the structure and metabolism at the mitochondrial level of the apical papilla cells, therefore, its viability. cell phone is seriously affected. It also shows that it affects cell proliferation.

*Keywords* MTA, regeneration, cell viability, stem cells, apical papilla

## 1 Introducción

La viabilidad de las células periradiculares puede verse comprometida debido a la citotoxicidad de los materiales utilizados durante los procedimientos de recubrimiento pulpar, reparación de perforaciones y relleno retrógrado. Estos materiales pueden inducir apoptosis o necrosis de las células y, por tanto, deben ser biológicamente inertes y neutrales (Bojar, Marczewska, Karwicka, y Anuszevska, 2009). En esta investigación, el MTA demostró afectar la viabilidad celular y ser altamente tóxico de la manera como se está usando en la práctica clínica odontológica y es por esta razón que, en su concentración pura, se debe diluir para obtener viabilidad celular.

Este trabajo fue realizado en la Universidad Antonio Nariño, donde se llevó a cabo una evaluación acerca de la viabilidad de las células madre al ser expuestas al material MTA.

Inicialmente, en los primeros apartes de la investigación, se encuentra estructurada una recolección exhaustiva de información, con base a la literatura científica de datos y estudios expuestos en los últimos años. Así mismo, de las técnicas de revascularización pulpar en tratamientos de dientes temporales o dientes jóvenes con ápice abierto, que se presenta en la práctica clínica odontológica. Seguido de esto, en el aparte de materiales y métodos, se obtuvo un medio de cultivo celular, en tiempos determinados para describir su morfología.

Se obtuvieron resultados cualitativos, aplicando dos ensayos de proliferación y viabilidad, donde, finalmente, se ven reflejados los resultados puntuales que resuelven la pregunta de investigación.

Por lo tanto, este estudio experimental, tiene como propósito analizar la viabilidad del biocerámico MTA sobre las células madre de la papila apical ex-vivo durante determinado tiempo.

## 2 Planteamiento del problema

El desarrollo de nuevos materiales con propiedades regenerativas ha sido un objetivo importante en la odontología actual y endodoncia moderna. El uso de este método de tratamiento en terapias pulpares vitales y procedimientos de endodoncia regenerativa debe proporcionar una barrera para el coágulo sanguíneo, los microorganismos al mismo tiempo poseer una biocompatibilidad adecuada con propiedades bioactivas para inducir la reparación de tejidos o estimular la diferenciación y regeneración de células madre (Prati and Gandolfi, 2015).

Según la Asociación Americana de Endodoncia (s.f.), lo que busca la endodoncia regenerativa es utilizar el concepto de ingeniería de tejidos, para restaurar el componente pulpar a un estado saludable, lo que permite el desarrollo continuo de la raíz y el tejido circundante. De esta manera, poder preservar los dientes en boca por un tiempo, lo más prolongado posible, siendo este el propósito del procedimiento en regeneración pulpar. Antiguamente como hasta ahora se vienen utilizando diversas opciones frente a terapia regenerativa, la literatura reporta diferentes procedimientos endodónticos regenerativos como la apexogénesis y la apexificación, Según Facchin, D'Anselmo y Jiménez (2018), el objetivo es la formación de una barrera apical calcificada con el uso de hidróxido de calcio o cementos a base de silicato de calcio, para producir un sellado apical artificial.

De igual manera, surgen materiales altamente biocompatibles para procesos regenerativos del complejo pulpo-dentinal, llamados biocerámicos, que a nivel general, estos materiales tendrán aplicaciones tanto a nivel coronal, como a nivel radicular; como lo son el recubrimiento pulpar directo, pulpotomía, sellado de perforaciones radiculares, perforaciones en furca, sellado de reabsorciones cervicales invasivas y reabsorciones radiculares internas y externas, obturaciones en cirugía periapical y endodoncia regenerativa (Montero, 2017).

Un gran avance en este campo ocurrió hace 20 años con la introducción del Agregado de Trióxido Mineral (MTA por sus siglas en inglés) en uso clínico. A lo largo de los años, el material de odontología ha ido evolucionando, eliminando e incorporando nuevos materiales. Este es el caso del cemento MTA, el cual es un material indicado para el tratamiento pulpar en dientes vitales en apicoformaciones, en cirugía endodóntica y principalmente en obturación dental. El MTA es un polvo que consta de partículas finas hidrofílicas que fraguan en presencia de humedad. El MTA está compuesto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato férrico tetracálcico, sulfato cálcico dihidratado, óxido tricálcico, óxido de silicato y óxido de bismuto que le aporta radiopacidad, siendo esta una de sus ventajas. En cuanto a sus propiedades como material presenta un pH alcalino (12.5), baja hidrosolubilidad, buena biocompatibilidad y capacidad de sellado, radiopacidad, capacidad bacteriostática y antifúngica, no es reabsorbible, fragua en ambiente húmedo y tiene un tiempo de trabajo largo (Montero, 2017).

Se han demostrado, excelentes propiedades de biocompatibilidad invitro y baja citotoxicidad (Küçükkaya, Görduysus, Zeybek, & Müftüoğlu, 2016). Sin embargo, este material presenta varias desventajas tales como, la pigmentación de la superficie dental, adicionalmente a esto presentaba problemas de manipulación (Montero, 2017).

Por estas razones, es necesario evaluar cómo afecta el MTA a la viabilidad celular de células de la papila apical utilizando diferentes ensayos de viabilidad celular los cuales permitirán brindar más información sobre el estado celular. Por esta razón, el grupo de investigación plantea la siguiente pregunta de investigación.

## **2.1 Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto sobre la viabilidad de células madre de la papila apical cuando son expuestas en ambiente ex-vivo al biocerámico MTA?

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

- Evaluar los efectos de la viabilidad celular de células madre de la papila apical cuando son expuestas en un ambiente ex-vivo al biocerámico MTA.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad metabólica mitocondrial por medio del ensayo WST-1 de células madre de la papila apical cuando son expuestas al biocerámico MTA.
- Analizar la permeabilidad de la membrana celular mediante la prueba de azul trypan en células de la papila apical expuestas al biocerámico MTA.

#### 4 Justificación

Este trabajo de investigación forma parte de la línea de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa, encaminado a la continuación del estudio previo experimental llamado “*Evaluación de la viabilidad de células de la papila apical expuestas a pasta triantibiótica y endosequence. Estudio ex-vivo*” realizado en la Universidad Antonio Nariño, durante el año 2019. En este, se evidenció que la pasta triantibiótica de Hoshino, efectivamente puede ser utilizada en protocolos de terapias endodónticas regenerativas.

Del mismo modo, en esta investigación se retoma la viabilidad de la regeneración pulpar como un tratamiento alternativo, que es un proceso el cual consiste en regenerar tejidos similares a la pulpa por medio de biomateriales que se han desarrollado y mejorado a través del tiempo. Igualmente, se llevará a cabo en los laboratorios de la universidad Antonio Nariño desarrollada dentro de la línea de investigación de ingeniería tisular y medicina regenerativa, enfocada a analizar y evaluar la viabilidad celular de las células madre de la papila apical frente al biomaterial MTA.

De esta manera, los estudios contribuirán a determinar de un modo particular e innovador lo que se presenta actualmente en la literatura científica. Donde básicamente, se cultivarán las células madre de papila apical expuestas a este material, se observará y se describirá morfología; evaluando la proliferación o mortalidad celular de la papila apical, en un tiempo determinado. Dando un impacto diferencial al realizar varios métodos de estudio y obteniendo unos resultados científicos detallados frente a este material, basados en evidencia. Brindando un gran aporte científico del MTA, y en un futuro desarrollar un material que cumpla todos los requisitos para estimular la regeneración y preservación de la estructura dental en cavidad oral.

## 5 Marco teorico

### 5.1 Endodoncia regenerativa

Se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas en la odontología regenerativa o endodoncia 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, Schreibmann, Yang y Xing, 2006). Así como, la identificación de fuentes novedosas de células madre (Nakashima y Iohara, 2011). Y moléculas bioactivas (Lu y Átala, 2013). Se han dirigido a la regeneración de tejidos y órganos perdidos debido a traumas o enfermedades (Mikos, y otros, 1993).

La revascularización pulpar se remonta a décadas pasadas, fue descrito por Nygaard y Hjortdal (1971), 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. 1996). Demostraron la efectividad de revascularización mediante la formación del coágulo intraconducto, lo que potenció el desarrollo de la raíz en diversos estudios clínicos (Baranwal and Vidyarthi, 2015).

Según Nygaard y Hjortdal (1971), la revascularización ha sido introducida desde 1961, cuando se planteó la hipótesis 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, Boda, Shambarger, Bowles y McClanahan, 2010). Möller et al en 2010. mostraron que el tejido pulpar necrótico infectado provoca fuertes reacciones inflamatorias en los tejidos apicales. Myers et al. en 1996 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, Matsuyama, Sato y Hoshino (1997), realizaron un estudio en Japón, 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 y otros (1997), 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.

Sato y otros (1997), 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 fisicoquímicas (Alobaid, Cortes, Lo, Nguyen, Albert, Abu-Melha, Gibbs, 2014).

## **5.2 Apexogenesis y apexificación**

La apexogénesis, es la formación de la raíz incompleta con la pulpa vital a partir de un biomaterial que incita el desarrollo fisiológico y formación del ápice radicular. A diferencia de la apexificación, cuyo propósito es lograr la inducción del selle apical mediante la formación de tejido mineralizado en dientes con formación radicular incompleta y necrosis pulpar con el objetivo de lograr un tope apical que permite obturar el conducto radicular. En esta alternativa de tratamiento se retira el tejido necrótico y se posiciona el medicamento biocompatible como el hidróxido de calcio en polvo para estimular el cierre radicular. Dicho requerimiento precisa de múltiples visitas, un largo tiempo de tratamiento hasta que el cierre radicular es completado (Thomson-Reuters, 2009), junto con un mayor riesgo de fractura radicular, debido a una mayor

fragilidad radicular resultante (Nosrat, Seifi y Asgary, 2011) y obliteración total del conducto (Chueh, Roberts, Shakesheff y Buttery, 2009).

Es por ello por lo que, con el paso de los años en la actividad endodóntica clínica se ha buscado adelantos en materiales más compatibles, fáciles de manejar, con una alta tasa de éxito al uso en pacientes que requieren de terapias pulpares o tratamientos endodónticos complejos que ayuden a solucionar los problemas clínicos del profesional (Chueh y otros, 2009).

### **5.3 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 y andamios (Diógenes 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., 2018)

## 5.4 Células madre

Las células madre constituyen la unidad natural de generación durante la embriogénesis y regeneración en la vida adulta (Betancourt, Barciela, Guerra y Cabrera, 2012).

Estas 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) (Quesada, León, Fernández y Nicolau, 2017).

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 Inter folicular, que producen únicamente escamas queratinizadas (Quesada, León, Fernández y Nicolau, 2017).

## 5.5 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 (Avilés, 2018).

## 5.6 Biocerámicos

El agregado trióxido mineral es el primer material biocerámico utilizado con éxito en endodoncia regenerativa y terapia pulpar (Raghavendra, Vontas, Martins, Ng, Koou, Dusfour, Weetman, 2017). Entre ellos se encuentra el MTA y biodentine, este último material es relativamente nuevo en el mercado, es un sustituto dentinario bioactivo (Septodont, 2015) a base de silicato tricálcico manufacturado por Septodont que estimula las células de la pulpa para formar una dentina reactiva, posee propiedades mecánicas similares a la dentina sana y puede reemplazarla tanto a nivel coronario como a nivel radicular (Marciano, Camilleri, Lucateli, Costa, Matsumoto, Duarte, 2019).

Con la aparición del agregado trióxido mineral en la década de los 90 (Torabinejad, Watson y Pett, 1993). Se establece un cambio en la terapia endodóntica moderna y se da paso a los nuevos biomateriales en terapia endodóntica con el uso del MTA y *biodentine*, desde inicios de 1990 se han propuesto nuevos biomateriales endodónticos encaminados a la terapia pulpar y la regeneración celular además se ha caracterizado por una mayor aplicación de dispositivos médicos en todos los campos de la medicina destinados principalmente al diagnóstico, a la reparación y a la regeneración de tejidos dañados (Bianco, Kuznetsov, Riminucci, Fisher, Spiegel y Robey, 1998).

Los materiales odontológicos han evolucionado de forma espectacular; respecto a los materiales biocerámicos estos fueron introducidos a la endodoncia gracias a la expansión en sus distintas aplicaciones, a sus propiedades fisicoquímicas., su perfil hidrofílico que puede establecerse en un ambiente húmedo, como la dentina, la cual está compuesta por casi el 20% de agua (Lopes, Koch, Ferreira, Bueno y Moisés, 2010). Además, poseen una buena radiopacidad y

gran capacidad antibacteriana (Raghavendra, Vontas, Martins, Ng, Koou, Dusfour, Weetman, 2017).

Los biocerámicos son materiales cerámicos biocompatibles u óxidos metálicos con capacidad de sellado mejorada, actividad antibacteriana y antimicótica aplicada para uso en medicina y odontología (Raghavendra y otros, 2017), cuyo prefijo “bio” se refiere a su biocompatibilidad (Simon y Flouriot, 2016). Tienen la capacidad de funcionar como tejidos humanos o de reabsorberse y estimulan la regeneración de tejidos.

Tessier, Rodriguez, Lifshitz, Friedman y Lanata (2010), proponen que la curación satisfactoria de los tejidos periapicales tras el tratamiento endodóntico depende en parte, de la composición química y las propiedades fisicoquímicas de los materiales de obturación y de la extensión de cualquier degradación y liberación de los componentes de estos materiales hacia los tejidos periapicales (Peng, Li y Zhou, 2020).

## **5.7 MTA**

El agregado de trióxido mineral (MTA) es un material desarrollado para endodoncia. Las principales indicaciones del MTA, son el tratamiento pulpar en dientes vitales (pulpotomías, recubrimiento pulpar directo), apicoformaciones (barrera apical), cirugía endodóntica, reparación de perforaciones furcales, laterales y las provocadas por las reabsorciones. El MTA favorece la formación de hueso y cemento, y puede facilitar la regeneración del ligamento periodontal sin provocar inflamación (Miñana, 2002).

El MTA es un polvo que consta de partículas finas hidrofílicas que fraguan en presencia de humedad. La hidratación del polvo genera un gel coloidal que forma una estructura densa. El material MTA está compuesto principalmente por partículas de silicato tricálcico, aluminato

tricálcico, silicato dicálcico, aluminato férrico tetracálcico, óxido de bismuto, y sulfato de calcio dihidratado (Miñana, 2002).

El tiempo de fraguado del material es de tres a cuatro horas. El MTA es un cemento muy alcalino, con un pH de 12,5. Este pH es muy similar al del Hidróxido de Calcio, y puede posibilitar efectos antibacterianos. El material tiene una fuerza compresiva baja, lo que provoca que no pueda ser usado en áreas funcionales. Otras características del MTA son su baja solubilidad y una radiopacidad mayor que la dentina. Además, el MTA ha demostrado una buena biocompatibilidad, un excelente sellado a la microfiltración, una buena adaptación marginal y parece que reduce la microfiltración de bacterias (Miñana, 2002).

### **5.8 Indicaciones MTA**

El recubrimiento pulpar y la pulpotomía, sólo están indicados en dientes con ápices inmaduros cuando se expone la pulpa, y se quiere mantener su vitalidad. Estos tratamientos están contraindicados si existe sintomatología de pulpitis irreversible. El MTA ha demostrado que estimula la formación de puentes de dentina adyacente a la pulpa dental. Esta formación de dentina puede ser debida a la capacidad de sellado, alcalinidad y biocompatibilidad o posiblemente a otras propiedades del MTA (Miñana, 2002).

Barrera apical con MTA, apicoformaciones, la creación de una barrera apical con MTA está indicada en dientes con pulpas necróticas y ápices abiertos. Varios materiales (hidróxido de calcio, fosfato tricálcico, colágeno, fosfato de calcio, etc.) se han empleado anteriormente como barrera apical, para que la gutapercha pueda condensarse, y así prevenir una posible extrusión de material durante el tratamiento de dientes con el ápice abierto. Después de una primera cita en la que realizamos la limpieza y conformación del conducto, colocamos hidróxido de calcio durante 7 a 14 días para ayudar a la desinfección y limpieza. En la segunda cita, eliminamos el hidróxido

de calcio, y secamos el conducto con puntas de papel. Si lo consideramos necesario, se puede colocar una matriz, para evitar una sobreobtención del MTA. Para ello se pueden utilizar materiales biocompatibles como son: colágeno absorbible (CollaCote, Calcitek, Plainsboro, NJ, EE. UU), hidroxiapatita, polvo de hidróxido de calcio, etc., (Miñana, 2002).

El MTA se transporta al conducto por medio de un porta-amalgamas, y se condensa suavemente hasta crear unos 3-4 mm de barrera apical. La barrera se comprueba radiográficamente. Si no conseguimos el resultado esperado, conviene lavar con agua estéril para retirar el MTA, y volver a intentar el procedimiento. Si nos parece apropiada la barrera apical de MTA, colocamos una bolita de algodón húmeda en el conducto junto al MTA, y sellamos la apertura con una obturación provisional (Miñana, 2002).

Las perforaciones radiculares pueden producirse durante la preparación y conformación de los conductos radiculares, en la colocación de postes, en retratamientos, y también como resultado de una reabsorción interna perforante a los tejidos periradiculares. La reparación de las perforaciones se puede intentar de forma quirúrgica o no quirúrgica. Los factores que afectan al pronóstico son el tamaño de la perforación, el daño al hueso y ligamento, el tiempo entre la perforación y la reparación, la habilidad para conseguir un sellado hermético, y si la perforación es supraósea o intraósea. Muchos materiales se han utilizado para la reparación de perforaciones como son la gutapercha, la amalgama de plata, el ionómero de vidrio, el composite, el Super EBA® (Harry J. Bosworth, EE. UU), el Cavit® (ESPE, Seefeld, Alemania) o el hidróxido de calcio. Cuando sellemos una perforación, hay que evitar la extrusión de material a los tejidos periradiculares. Una matriz interna nos proporciona biocompatibilidad y control del material restaurador, evitando la sobre obturación del MTA en la perforación. Se pueden utilizar con este fin materiales biocompatibles como son: colágeno absorbible (CollaCote, Calcitek, Plainsboro,

NJ, EE. UU), hidroxiapatita, polvo de hidróxido de calcio, etc. La matriz se utilizará en perforaciones mayores de un milímetro. El procedimiento clínico depende de la localización de la perforación (Miñana, 2002).

En el caso de una perforación en la furca, primero limpiamos la zona con NaOCl o suero salino. Se localizan los conductos y la perforación. Se procede a la instrumentación y obturación, para después reparar la perforación; o bien primero se puede reparar la perforación y luego instrumentar y obturar los conductos. Si es necesario, se coloca una matriz interna antes del MTA. Mezclamos el MTA con el agua estéril y lo colocamos en la perforación con un porta-amalgamas pequeño. Tras la reparación se coloca una bolita de algodón húmeda junto al MTA, y se sella la apertura con una obturación provisional. Luego, se retira el provisional (como mínimo tres o cuatro horas después) en la siguiente cita para poner el material de obturación permanente (Miñana, 2002).

En el caso de una perforación lateral en el tercio medio de la raíz siempre se procede primero a la instrumentación y la obturación de los conductos, para después reparar la perforación de la manera descrita anteriormente (Miñana, 2002).

En el caso de una perforación en el tercio apical de la raíz: el MTA se debe de colocar para formar un tapón apical de tres a cinco milímetros. Se coloca con un porta-amalgamas muy pequeño. Después se coloca una bolita de algodón húmeda, y se sella la apertura con un provisional. En la siguiente cita (mínimo tres o cuatro horas después) se obtura el resto del conducto con gutapercha y cemento sellador. Al final, se coloca un material de obturación permanente (Miñana, 2002).

En la reparación de una reabsorción interna perforante, Primero procedemos a la limpieza y conformación del conducto. Se utiliza NaOCl durante la preparación, e hidróxido de calcio

entre citas, para así ayudarnos a limpiar el defecto y a la vez disminuir el sangrado. En la siguiente cita, quitamos el hidróxido de calcio, y obturamos con gutapercha y cemento el conducto, excepto el defecto, en el que colocamos el MTA. Para que fragüe el MTA, ponemos encima una bolita de algodón húmeda. En la siguiente cita, eliminamos la bolita de algodón, y procedemos a la obturación permanente (Miñana, 2002).

Para conseguir un buen sellado, es importante siempre comprobar la dureza del MTA antes de la colocación del material de obturación permanente.

## **5.9 Ensayo 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).

### **5.10 Ensayo de Azul Tripán**

El azul tripán (azul diamina, azul Niágara, 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).

### **5.11 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 37 °C. Cada muestra se analiza utilizando un lector de microplacas (Garzón, Martín, Alfonso, González, Carriel, Martínez, Alaminos, 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.

### **5.12 Citotoxicidad**

Es la cualidad de algunas células para ser tóxicas frente a otras que están alteradas. La citotoxicidad constituye uno de los mecanismos efectores de ciertas poblaciones del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interaccionar con otras células y destruirlas (Fan y Zhang, 2005).

Sustancias que son tóxicas para las células; pueden estar involucradas en la inmunidad o pueden estar contenidos en los venenos. Estos se distinguen de los agentes citostáticos en el grado de efecto. Algunos de ellos se usan como antibióticos citotóxicos (Fan y Zhang, 2005).

### 5.13 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, sustrato 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, Juneja y Meher, 2018).

## 6 Metodología

Tipo de estudio: experimental ex-vivo

Muestra de referencia: células de la papila apical

Criterios de inclusión: células de la papila apical obtenidas previamente por la línea de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa de la facultad de odontología UAN. Las células ya se encuentran caracterizadas y congeladas en fase 4.

Criterios de exclusión: células que presentaron viabilidad celular menor del 60%

Tabla 1  
Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Naturaleza	Medición
MTA	Agregado trióxido mineral que favorece la remineralización y la cicatrización de la pulpa	Cuantitativa	Preparación de diferentes concentraciones.
Viabilidad celular	Ensayo WST-1: permite evaluar 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.	Cuantitativa	Uso de espectrofotómetro el cual mide la longitud de onda
	Ensayo Azul trypan: es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de determinar la proporción de células vivas y muertas. Y es usado para evaluar la viabilidad celular		Tinción que permite contar células vivas y muertas
Tiempo	Día 1 Día 3 Día 5 Día 7	Cuantitativa	Horas
Morfología Celular	Es el estudio de las estructuras internas de las células que nos permite, determinar la forma, tamaño celular	Cualitativa	Microscopio óptico

Fuente: elaborado por el autor

## 6.1 Recolección de la muestra

Se obtuvo un vial congelado de células de la papila apical donada por la línea de investigación de la facultad. Las células se encuentran previamente caracterizadas. El MTA fue comprado directamente a un distribuidor autorizado en Bogotá.

## 6.2 Cultivo celular

Inicialmente descongelamos las células y posteriormente las cultivamos en placas de cultivo de 25cm<sup>3</sup> con 5 ml de medio de cultivo modificado, Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco (DMEM), el cual, se suplementó para mejorar las condiciones de las células, se añadió, 50 ml de suero bovino fetal (Gibco), 5 ml de antibiótico (Lonza) y 5 ml de L-glutamina. Para la realización del traspaso de las células o cambio de medio de cultivo, se procedió a lavar las células con una solución salina tamponada, PBS (Phosphate Buffered Saline) y luego tripsinizadas con tripsina (Gibco) durante 5 min a 37°C para separarlas de la placa. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa degradando las proteínas que sirven de unión entre las células y las placas de cultivo separándolas entre ellas. Una vez tripsinizadas, se procedió a añadir medio completo para neutralizar la reacción de tripsinización. Luego se concentraron las células mediante centrifugación para eliminar así la tripsina y se añadió el nuevo medio. Partiendo del número de células totales, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la cantidad de células deseadas.

Una vez logrado la estabilización del cultivo celular se procedió a realizar un análisis de viabilidad celular mediante técnica de azul tripán para verificar si las células eran aptas para desarrollar la experimentación.

Obtenida una viabilidad de más del 70% se procede a cultivar en cajas de 6 pozos 20000 células por pozo adicionándoles las diferentes concentraciones definidas para la experimentación. Los cultivos fueron analizados a 1, 3, 5 y 7 días.

Se les realizó análisis de viabilidad celular mediante azul tripán, morfología celular, análisis de viabilidad celular mediante el ensayo metabólico WST-1

### 6.3 Preparación de las concentraciones de MTA

Para el protocolo de preparación del MTA (Angelus) se tuvieron en cuenta las recomendaciones del fabricante.

En una canastilla de pesaje se depositó todo el polvo de MTA (1g). Posteriormente, se procedió a preparar las concentraciones para la experimentación. Las concentraciones fueron realizadas en 1 ml de medio de cultivo DMEM. Adicionalmente, se dejó una concentración máxima tal como viene el producto y como lo indica la casa comercial para poder realizar las comparaciones.

Se definieron las siguientes concentraciones experimentales:

Tabla 2

Concentraciones experimentales utilizadas

10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	Concentración Pura. Estado puro dosis recomendada 150 mg/ml (que corresponde a la cucharilla dispensadora de la casa comercial).
----------	---------	-----------	------------	--

Fuente: elaborado por el autor

**Grupo control:** se tuvo en cuenta un grupo control el cual el medio de cultivo no tenía disuelto el MTA. Es decir, las células fueron cultivadas solo con el medio de cultivo.

Adicionalmente, todas las muestras fueron agitadas en vortex durante 5 minutos para lograr la homogenización del material. 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  $\mu\text{m}$ .

Figura 1  
MTA Angelus



Fuente: Dentalcost,s.f.

#### 6.4 Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo metabólico WST1

- Protocolo para ensayo metabólico WST-1

El WST-1 permite medir la proliferación y la viabilidad celulares con un ensayo colorimétrico, basado en la escisión de sales de tetrazolio por la deshidrogenasa mitocondrial en células viables.

- Para realizar esta prueba se cultivaron 20.000 células por cada pozo en una caja de 12 pozos. Se verificó su adherencia a las 48 horas de cultivo. Una vez realizado el cultivo celular se extrae el medio de cultivo y se le adiciona las diferentes concentraciones de MTA (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml y concentración pura) a los diferentes días establecidos (1, 3,5 7 días).
- Para el uso del reactivo de WST-1 se debe descongelar la solución a 37 grados durante 2 a 10 minutos, se agita para disolver los precipitados.
- Se agregaron 10µl de reactivo a los pozos que contenían las células, de acuerdo con los tiempos estipulados de 1, 3, 5 y 7 días.

- d) Posteriormente, se adiciona el reactivo B WST-1 10 microlitros a cada pocillo y se incubaron a 37 grados en oscuridad durante 4 horas.
- e) Finalmente, se tomaron los sobrenadantes y se pasaron a placas de 96 pozos y realiza la lectura con un espectrofotómetro de una longitud de onda comprendida entre 490 y 620 nanómetros.

### **6.5 Análisis de viabilidad celular mediante 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: MTA 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml y 1,25mg/ml y MTA puro. 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 contener el MTA, 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 µl de células y se pusieron en contacto con 10 µl de Azul Tripán (Panreac) durante 5 minutos. En seguida se tomaron 10 µl de la mezcla y se pusieron en una cámara de Neubauer. Finalmente, se realizó un conteo celular bajo microscopio invertido. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de viabilidad celular:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \text{Número de células vivas} / \text{Número total de células} * 100$$

### **6.6 Análisis morfológico y evaluación de la adherencia celular**

La morfología se determina mediante microscopio invertido. Se hicieron controles de los cultivos iniciales. A cada condición se le hizo su correspondiente análisis morfológico a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo con el MTA. Se tuvo en cuenta la morfología típica fibroblastoide que debe

tener las células de la papila apical, su capacidad de adherirse a la superficie de cultivo, capacidad para hacer ramificaciones e interconexión celular.

### **6.7 Análisis de la proliferación de la proliferación celular**

Para obtener el dato de la cuantificación celular se tomaron los cultivos celulares con las diferentes concentraciones de MTA preparadas en los diferentes días (1, 3, 5 y 7). A dichos cultivos se le tomaron 5 fotos en diferentes zonas en todas las concentraciones objeto de estudio a una magnificación de 10X.

Una vez obtenidas las imágenes se utilizó el programa ImageJ, para proceder a la cuantificación celular. Inicialmente, el programa descartó cualquier brillo y contraste y convirtió en imagen binario es decir en una imagen a blanco y negro. Posteriormente, el programa hizo lecturas de tamaño de partícula similares al tamaño de una célula. Finalmente, el programa pudo obtener una cuantificación de la proliferación celular a 1, 3, 5 y días con las diferentes concentraciones a estudiadas. Esta cuantificación se realizó a las 5 fotos tomadas por condición para obtener suficientes datos estadísticos.

### **6.8 Análisis estadístico**

Para evaluar la viabilidad y proliferación celular se aplicó estadística descriptiva analizando media, mediana, moda y desviación estándar. Los datos obtenidos se procesaron en una hoja de cálculo Excel obteniendo el promedio de la viabilidad y proliferación celular y su posterior representación gráfica.

Para análisis de la morfología celular se utilizó descripción cualitativa.

## **6.9 Consideraciones éticas**

- Según la Resolución 8430 de 1993 este artículo se clasifica en la categoría de investigación con riesgo mínimo
- Solicitar una autorización por escrito a las directivas de la facultad odontológica para la realización del estudio.

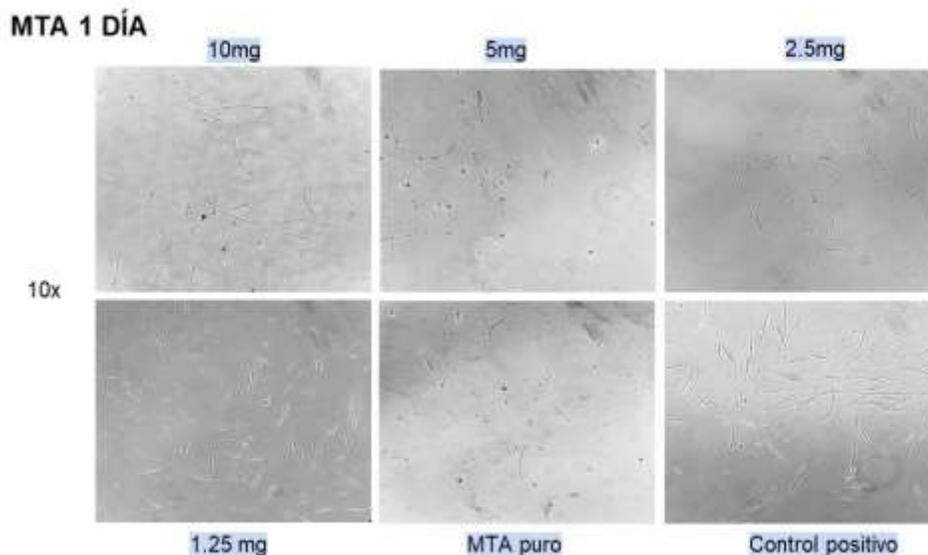
## 7 Resultados

### 7.1 Análisis morfológico y adherencia celular

Los resultados encontrados en este estudio demostraron que las diferentes concentraciones de MTA en el día 1 no alteraron la morfología celular. Adicionalmente, en el día 1 se observan que las células están adheridas a la superficie de cultivo y se comienza a observar la morfología fibroblastoide y la emisión de prolongaciones celulares. Sin embargo, se puede observar que las concentraciones de 10mg, 5mg y concentración pura no presentan gran cantidad celular cuando son comparadas con el control y las concentraciones de 2,5mg y 1,25mg.

Figura 2

Microscopía electrónica 10x, en el día 1



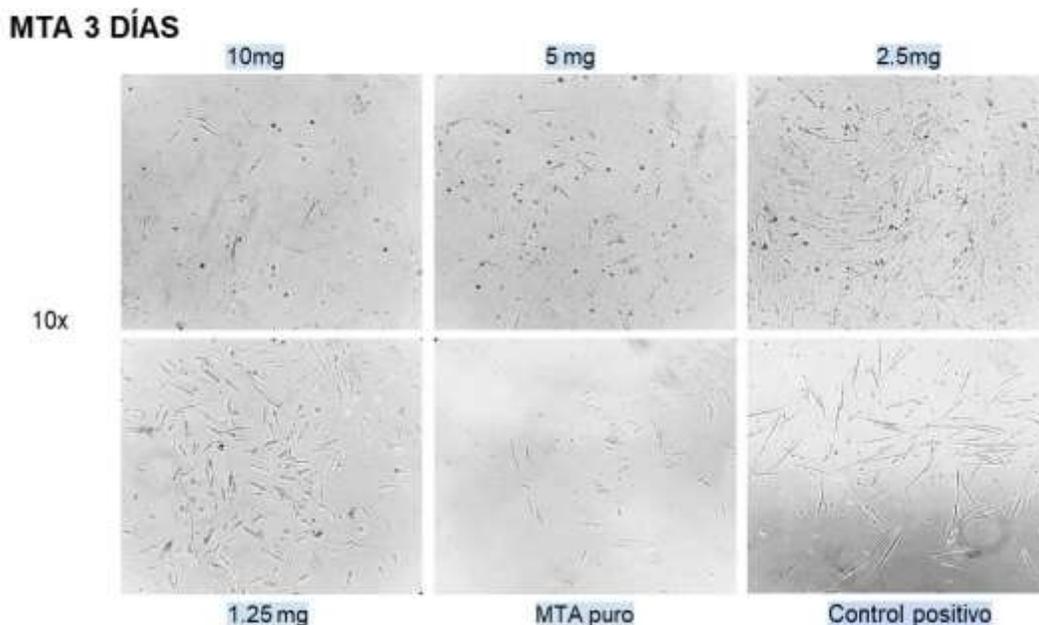
Fuente: elaborado por el autor

Cuando observamos la morfología y adherencia celular en el día 3 se pudo evidenciar una homogenización del cultivo, las células están completamente adheridas a la superficie celular y se define la morfología típica fibroblastoide. Adicionalmente, se observan prolongaciones e interconexiones celulares. Sin embargo, se observa que los cultivos de 10 mg y la concentración

pura a pesar de tener las características morfológicas adecuadas no presentan un número alto de células cuando se comparan con las otras concentraciones y el control, como se observa a continuación.

Figura 3

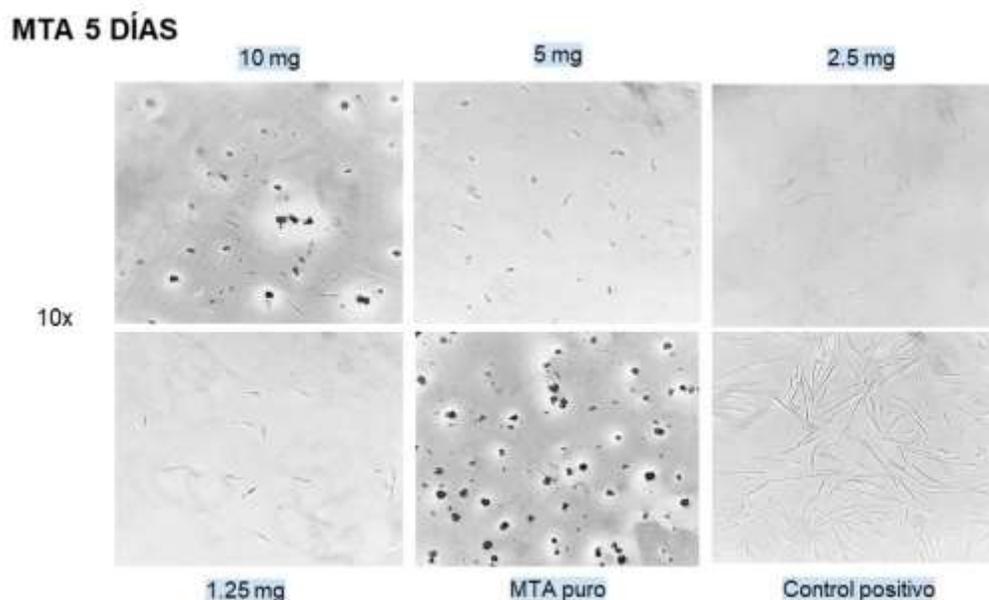
Microscopia electrónica 10x, en el día 3



Fuente: elaborado por el autor

Los resultados encontrados en el presente trabajo evidenciaron que en el día 5 de estar en contacto las células con las distintas concentraciones de MTA objeto de estudio la morfología celular se alteró en las concentraciones de 10mg, 5mg y concentración pura. Sin embargo, las concentraciones de 2,5 mg, y 1,25 mg conservan su morfología típica fibroblastoide y se evidencia adherencia a la superficie de cultivo observando ramificaciones. En todas las concentraciones la población celular se ve disminuida.

Figura 4  
Microscopía electrónica 10x, en el día 5

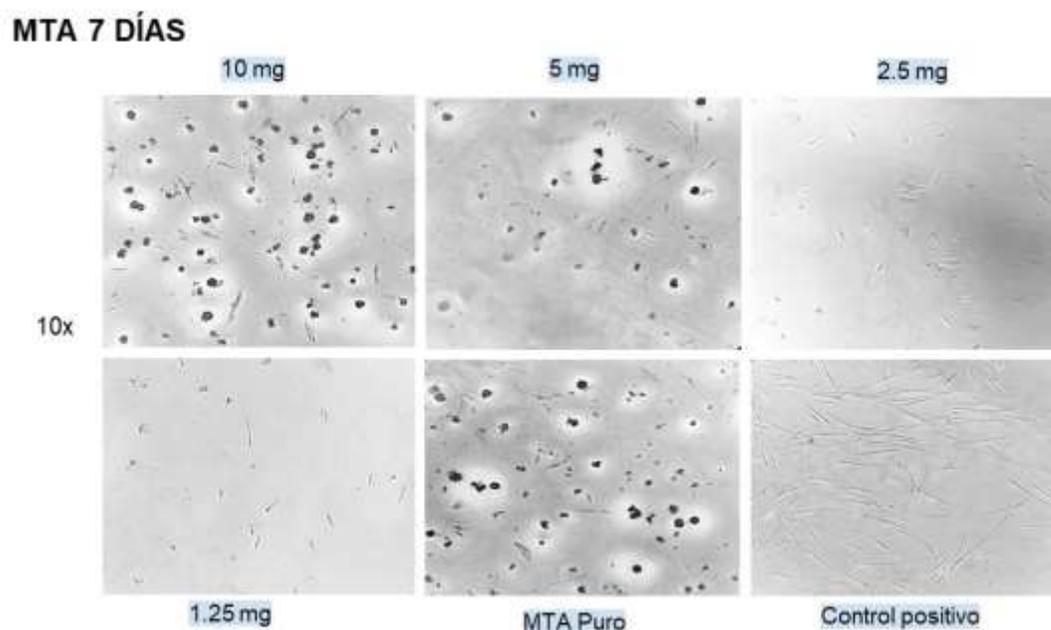


Fuente: elaborado por el autor

Los resultados encontrados a los 7 días demostraron que la morfología celular se alteró en todas las concentraciones siendo las concentraciones de 10 mg, 5 mg y concentración pura la que mayor alteración se observa en su morfología. Las concentraciones de 2,5 mg y 1,25 comienzan a presentar cambios en su morfología. Aunque las células se observan adheridas en todas las concentraciones no presentan conexiones ni ramificaciones ni la típica morfología fibroblastoide. Además, la población celular se ve disminuida.

Figura 5

Microscopía electrónica 10x, en el día 7



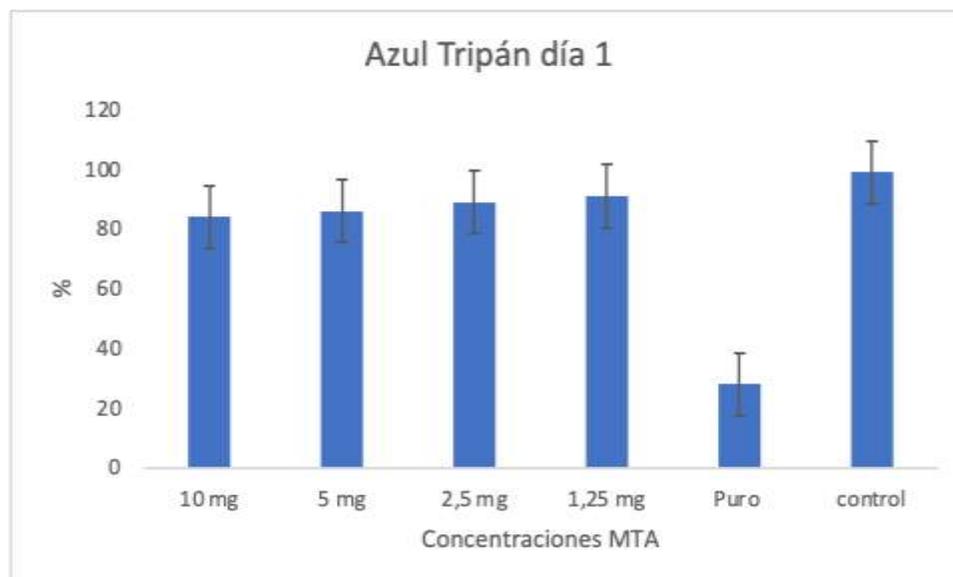
Fuente: elaborado por el autor

## 7.2 Viabilidad celular mediante azul tripán

Los resultados encontrados en esta investigación ponen en evidencia que las concentraciones de 10 mg, 5 mg, 2,5 mg y 1,25 mg en el primer día de poner en contacto a las células de la papila apical con el MTA presentan porcentaje superiores de viabilidad celular mediante la prueba de azul tripán 84%, 86%, 89% y 91% respectivamente. Sin embargo, la concentración pura mostró un porcentaje de viabilidad del 28%.

Figura 6

Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 1

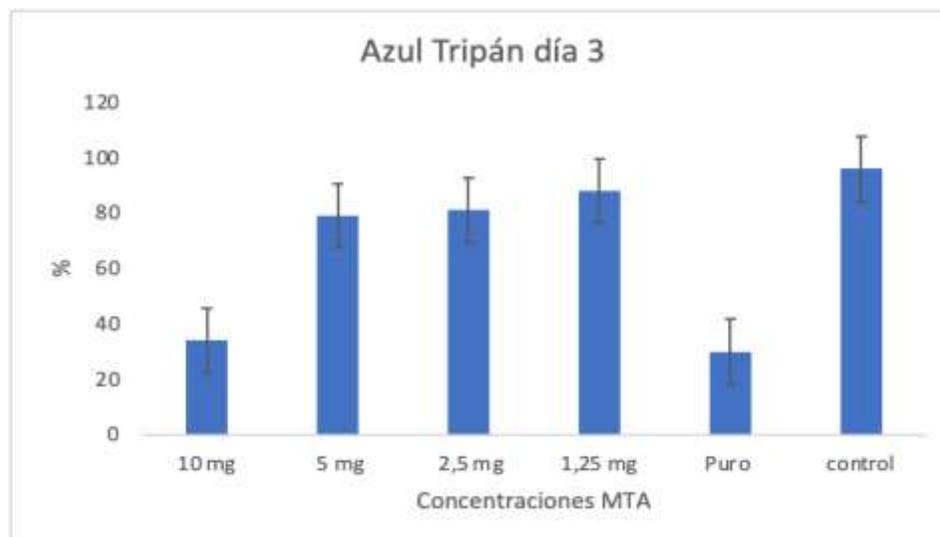


Fuente: elaborado por el autor

En el día 3 los resultados arrojados en este estudio mediante azul tripán se puede observar que las células sometidas a concentraciones de 5 mg, 2,5 mg y 1,25 presentaron porcentajes de viabilidad del 79%, 81% y 88% respectivamente. Sin embargo, se observa deficiente viabilidad celular en las concentraciones de 10 mg y concentración pura; 34% y 30% respectivamente.

Figura 7

Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 3

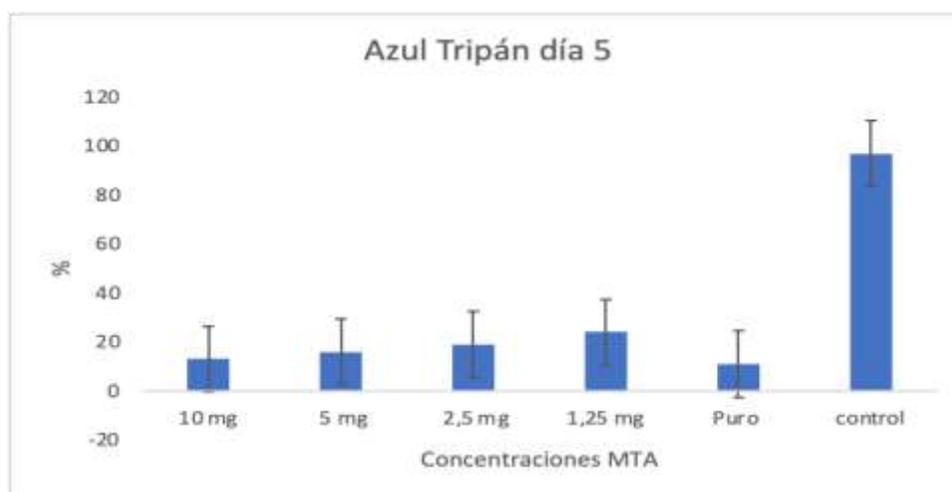


Fuente: elaborado por el autor

Cuando se analizó la viabilidad celular mediante ensayo de azul tripán en el día 5 los resultados mostraron que todas las concentraciones afectaron negativamente la viabilidad celular obteniendo porcentajes de menos del 30% siendo las concentraciones de 10 mg y concentración pura las que más afectaron a las células.

Figura 8

Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 5

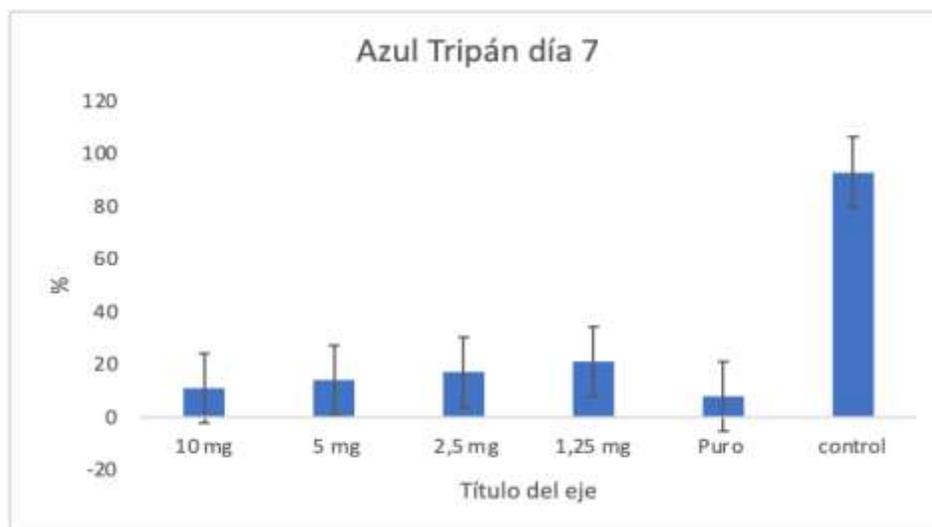


Fuente: elaborado por el autor

Por último, los resultados en cuanto a viabilidad celular en el día 7 mediante el ensayo de azul tripán pone en evidencia que todas las concentraciones de MTA propuestas en este estudio afectaron negativamente la viabilidad celular obteniendo resultados de menos del 25% siendo las concentraciones de 10 mg y concentración las que mas afectaron a las células con porcentajes del 11% y 8% respectivamente.

Figura 9

Viabilidad celular mediante azul tripán, en el día 7



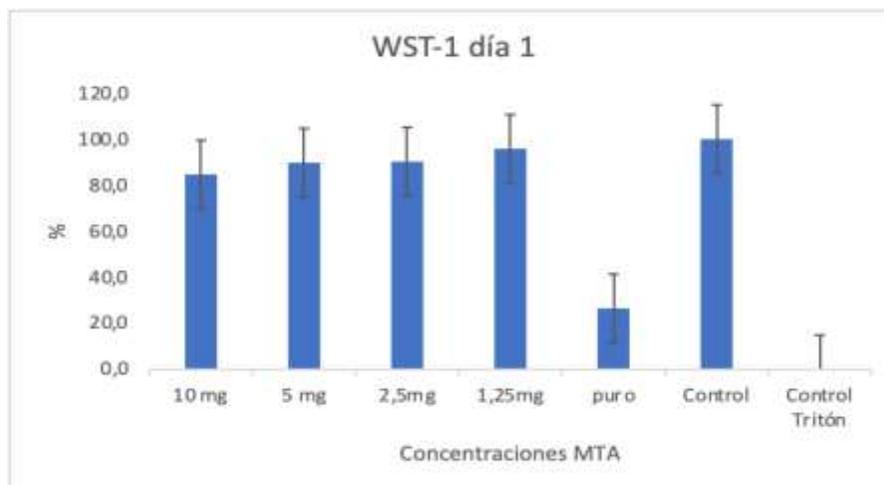
Fuente: elaborado por el autor

### 7.3 Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo metabólico WST-1

En este estudio, los resultados demostraron que la actividad metabólica de las células de la papila apical sometidas a diferentes concentraciones de MTA, no se vio afectada presentando porcentajes de viabilidad celular mayores del 84%. Sin embargo, la concentración pura de MTA afecto negativamente la actividad metabólica celular obteniendo un porcentaje del 26,6%.

Figura 10

Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 1

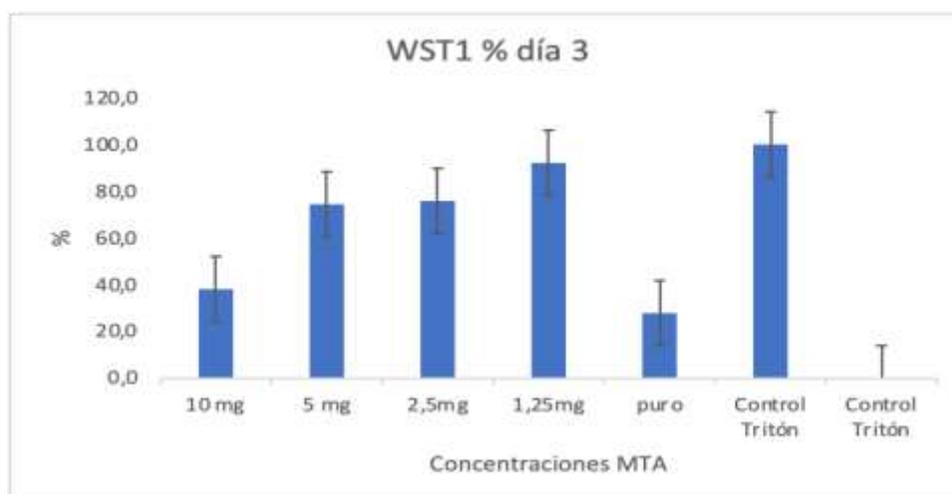


Fuente: elaborado por el autor

En cuanto al día 3, los datos obtenidos mediante el ensayo metabólico WST-1 evidenciaron que las concentraciones de 5 mg, 2,5 mg y 1,25 mg no afectaron la viabilidad celular presentando porcentajes del 74,4%, 75,8 y 92% respectivamente. Sin embargo, la viabilidad celular se vio afectada con las concentraciones de 10 mg con un 38% y la concentración pura con un 28%.

Figura 11

Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 3



Fuente: elaborado por el autor

Los resultados de este estudio en el día 5 analizando la viabilidad celular mediante el ensayo metabólico WST-1 demostró que todas las concentraciones propuestas en el estudio afectaron negativamente la actividad metabólica celular con porcentajes por debajo del 20%.

Figura 12

Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 5

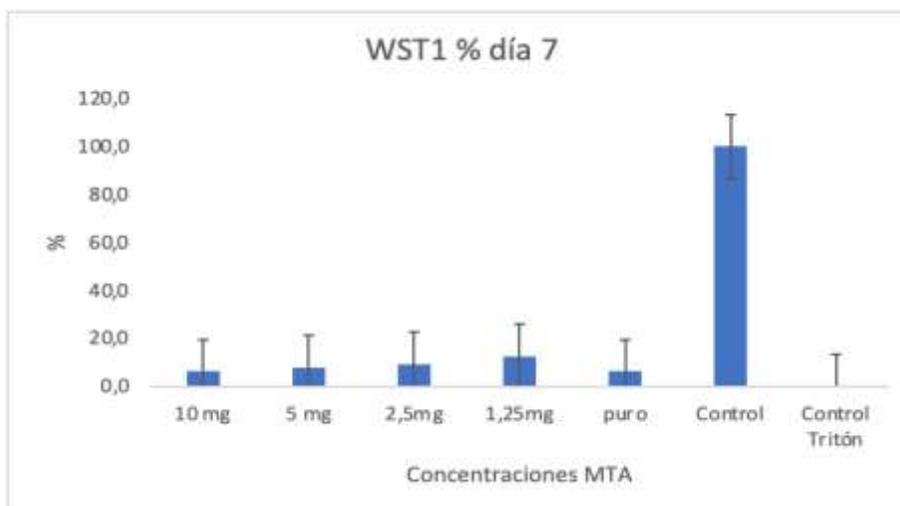


Fuente: elaborado por el autor

Finalmente, en los análisis arrojados en el día 7 mediante el ensayo WST-1 se observó un porcentaje por debajo del 15% de todas las concentraciones objeto de estudio.

Figura 13

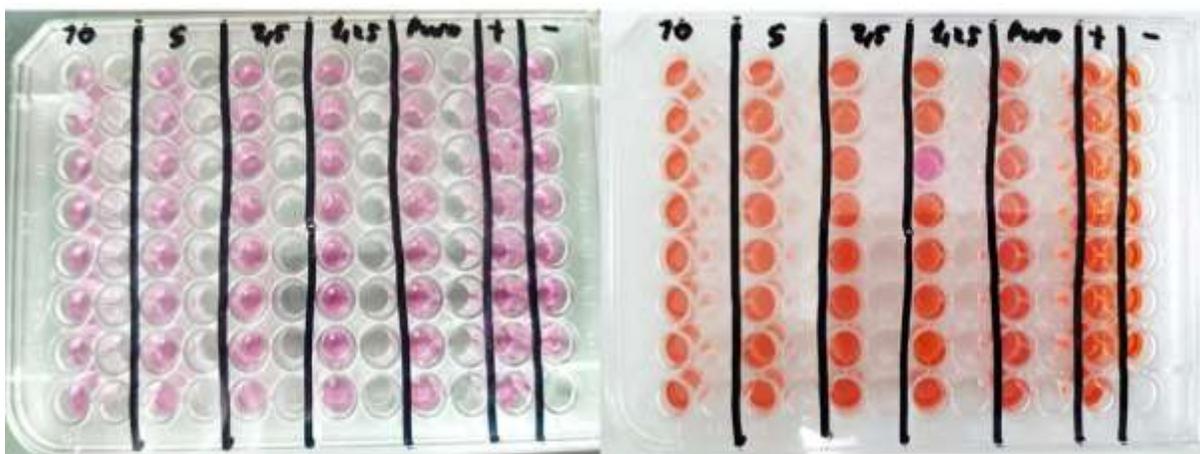
Viabilidad Celular mediante WST-1, en el día 7



Fuente: elaborado por el autor

Figura 14

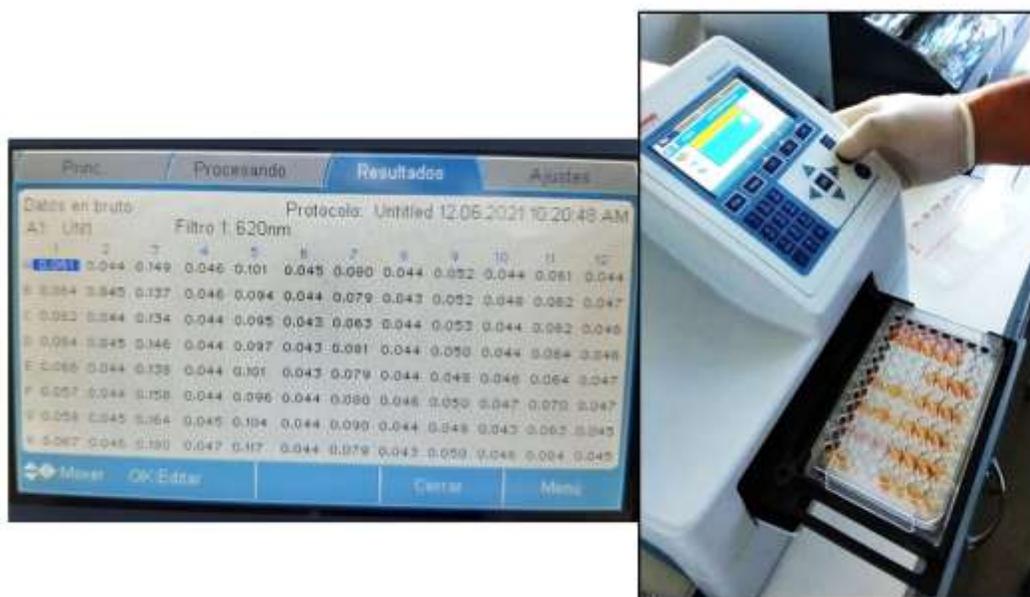
Representación grafica del ensayo WST-1



Fuente: elaborado por el autor

Figura 15

Lectura del ensayo WST-1, mediante espectrofotómetro.



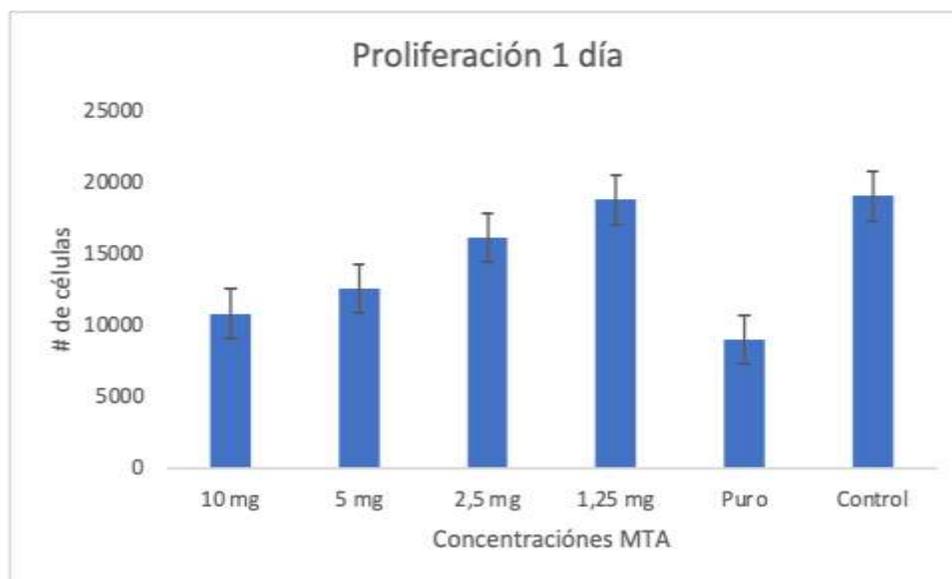
Fuente: elaborado por el autor

## 7.4 Análisis de la proliferación celular

Los resultados encontrados en esta investigación en cuanto a proliferación celular muestran que durante el día 1 de incubación celular y de exponer las células al material MTA se afectó la proliferación celular en concentraciones de 10 mg, 5 mg y concentración pura obteniendo una población por debajo de 15.000 células/por pozo partiendo de la base inicial de 20.000 células/por pozo. Sin embargo, las concentraciones de 2,5 mg y 1,25 mostraron poblaciones de más de 15.000 células /por pozo.

Figura 16

Análisis de proliferación celular, en el día 1

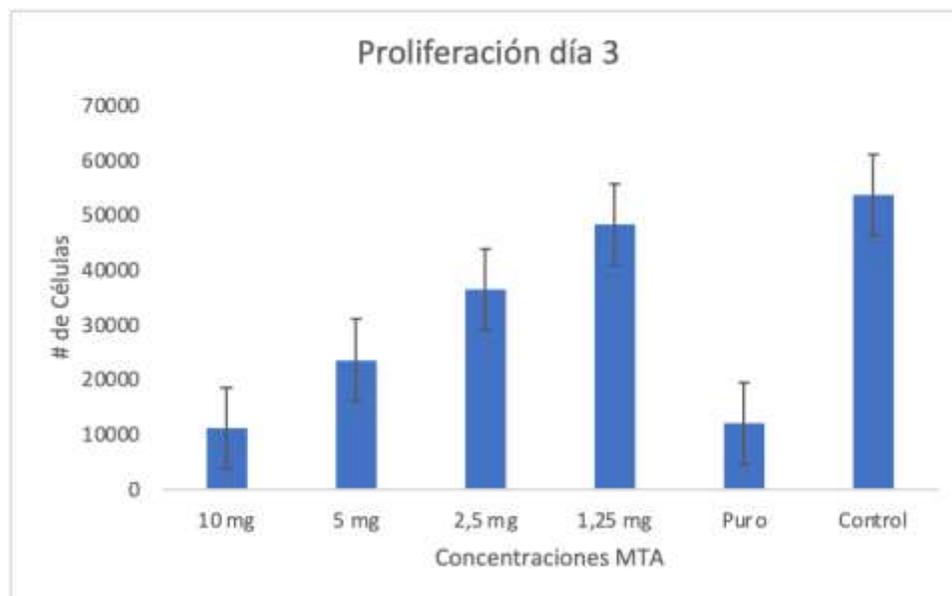


Fuente: elaborado por el autor

En cuanto al análisis de la proliferación celular en el día 3 se observa un crecimiento exponencial en las concentraciones de 5 mg, 2,5 mg y 1,25 mg. Superando una población celular inicial de 20.000 células por pozo. Sin embargo, se evidenció que las concentraciones de 10 mg y la concentración pura afectaron la proliferación celular por debajo de 15.000 células/por pozo.

Figura 17

Análisis de proliferación celular, en el día 3

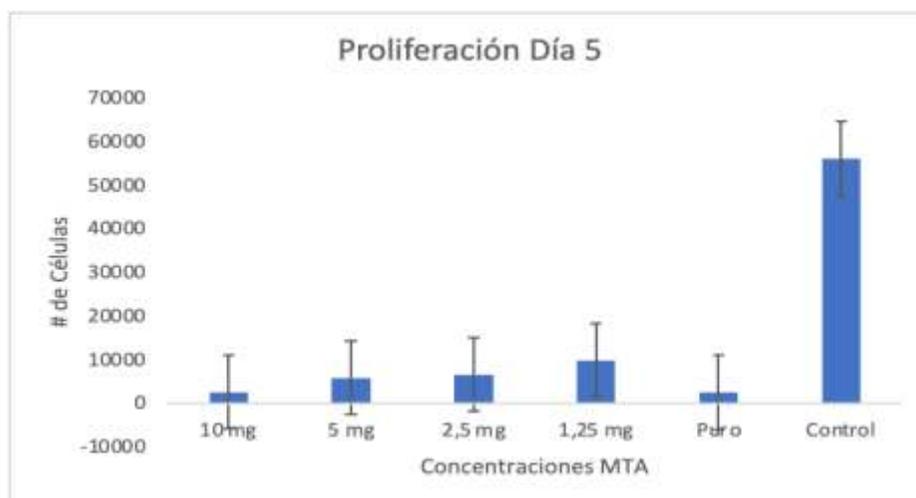


Fuente: elaborado por el autor

En el día 5 se observó que todas las concentraciones planteadas en esta investigación afectaron la proliferación celular. Se observó una población celular de menos de 10.000 células por pozo.

Figura 18

Análisis de proliferación celular, en el día 5

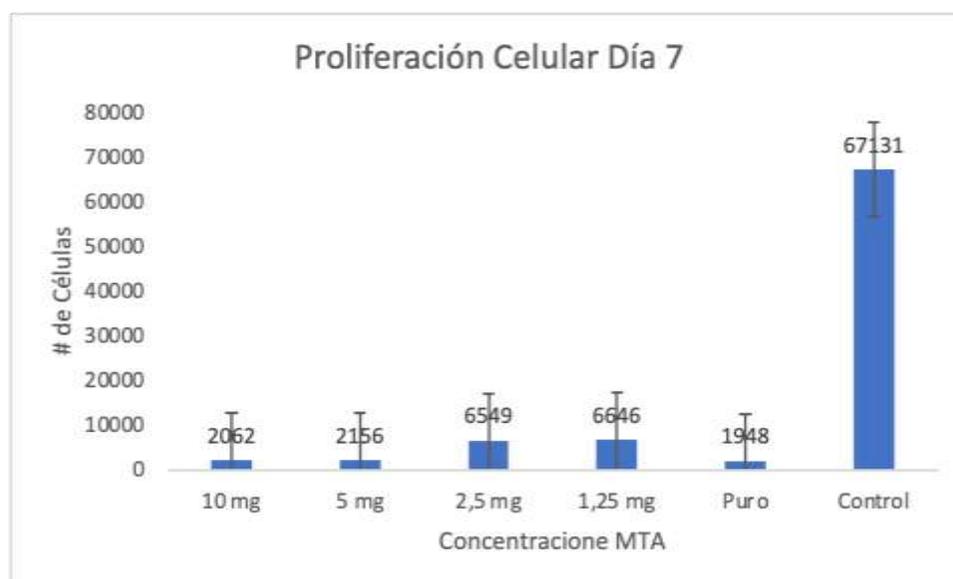


Fuente: elaborado por el autor

Los resultados hallados en este trabajo mostraron que a los 7 días de estar las células en contacto con concentraciones de MTA de 10 mg, 5 mg, 2,5 mg, y 1,25 mg y concentración pura; afectaron la proliferación celular encontrando poblaciones celulares de 2.062 células/por pozo, 2.156 células/por pozo, 6.549 células/ por pozo, 6.646 células/por pozo y 1.948 células/ por pozo respectivamente.

Figura 19

Análisis de proliferación celular, en el día 7



Fuente: elaborado por el autor

## 8 Discusión

En la actualidad, se han presentado una amplia variedad de ensayos in vitro encaminados a estudiar la regeneración y revascularización pulpar, con materiales biocompatibles a base de silicato tricálcico clasificados como cementos endodónticos; donde analizan la viabilidad y estimulación de las células madre de la papila apical inducidas por estos cementos.

Muchos de los trabajos reportados se han centrado en evaluar los efectos citotóxicos del MTA sobre diferentes modelos de células (pulpa dental, papila apical, ligamento periodontal) (Ruiz, 2012), (Ospina y Builes, 2013), (Sottano, 2020), utilizando solamente un método metabólico para evaluar dicha condición. El MTA actualmente es un biocerámico muy utilizado en la práctica clínica potencializándose su uso en la endodoncia regenerativa ya que es un material que presenta excelentes propiedades de biológicas (Obando, Torres, Salas y Hofling, 2009).

En este estudio, utilizamos células de la papila apical por ser células que presentan excelentes características de diferenciación, proliferación, migración y porque participan directamente en la formación de las paredes de la raíz estimulado el cierre apical (Gaitán, Velosa, Rodríguez, Rodríguez y Niño, 2017). Además, utilizamos y mezclamos diferentes métodos para evaluar la viabilidad e integridad de las células de la papila apical. Al utilizar diferentes métodos de evaluación se proporciona mejores hallazgos (Martin, Garzón, Oliveira, Alfonso, Sánchez, Campos, Alaminos, 2013).

Siguiendo con el objetivo de esta investigación de evaluar los efectos citotóxicos del biomaterial MTA sobre células de la papila apical, en este trabajo utilizamos los ensayos de WST-1 para evaluar la actividad metabólica mitocondrial. Adicionalmente, analizamos la

integridad de la membrana mediante el ensayo de azul tripán y estudiamos los cambios morfológicos cuando las células son expuestas al material MTA.

En cuanto al análisis de la morfología celular cuando las células fueron expuestas a las diferentes concentraciones de MTA, se pudo evidenciar que en el día 1 y 3 no se presentaron cambios morfológicos relevantes. Sin embargo, en el día 5 las concentraciones de 5mg, 10 mg y concentración pura, alteraron la morfología celular. De igual manera, en el día 7 todas las concentraciones alteraron la morfología celular. Estos resultados están en desacuerdo por lo reportado por Shi, Zhao y Yuan (2020), quienes usando un modelo de células madre de la pulpa dental no encontraron alteración en la morfología celular cuando aplicaron concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 ug/ml en los días 1, 3, 5, 7 y 9. Esos resultados pueden deberse a que ellos utilizaron concentraciones más diluidas del material y un modelo celular diferente. Además, se pudo evidenciar limitada capacidad de diferenciación celular.

Sin embargo, los resultados arrojados en este estudio en cuanto a morfología celular concuerdan con los reportados por Peters, Galicia, Arias, Tolar, Ng y Shin (2016), quienes usando un modelo de células madre de la papila apical no encontró cambios morfológicos en los días 1 y 3 al ser sometido al material MTA.

Por otro lado, la viabilidad celular analizada mediante el ensayo de azul tripán demostró que en los días 1 y 3 a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1.25 mg/ml tuvieron altos porcentajes de viabilidad celular. Sin embargo, desde el día 1 la concentración pura de MTA afectó la viabilidad celular.

Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Saberi, Karkehabadi y Mollashahi (2016), quienes utilizando concentraciones más bajas, iguales y superiores a este estudio encontraron, adecuados niveles de viabilidad celular mediante esta técnica de azul tripán en los

días 1 y 3. Sin embargo, en los días 5, 7 y 9 en su estudio se observó normalización en los porcentajes de viabilidad de forma positiva. Por otro lado, en el trabajo Saberi, Karkehabadi y Mollashahi (2016) no se observó citotoxicidad con la concentración pura.

En cuanto a los resultados de la prueba metabólica mitocondrial WST-1 lo reportado en este estudio evidencio que las células de la papila apical cuando son expuestas al material biocerámico MTA en los días 1 y 3 no sufren afección en su viabilidad celular a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1.25 mg/ml. Pero vale la pena mencionar que la concentración pura desde el día uno afecta negativamente la viabilidad celular. Otro aspecto relevante, es que a partir del día 5 todas las concentraciones afectan la viabilidad celular.

Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Jing Du y otros citados por Miller, Takimoto, Wealleans y Diógenes (2018), quien usando concentraciones más bajas y altas que en este estudio pudo corroborar que las concentraciones bajas de 0.02 mg/, 0.2 mg/ml y 2 mg/ml no afectaron la viabilidad celular cuando fue analizado con ensayos metabólicos mitocondriales similares al WST-1. Por el contrario, las concentraciones altas de 10 mg y 20 mg/ml afectaron negativamente sobre la viabilidad celular.

Similares resultados fueron reportados por Miller, Takimoto, Wealleans y Diógenes (2018), en el estudio *“Effect of 3 bioceramic materials on stem cells of the apical papilla proliferation and differentiation using a dent in disk model”*, quién expuso células de la papila apical a una concentración pura de MTA, encontró resultados negativos en cuanto a la viabilidad celular.

Finalmente, los resultados encontrados en este trabajo de investigación ponen de manifiesto que la proliferación celular no se vio afectada en concentraciones bajas de 2,5 y 1,25 mg/ml durante el día 3 y 5. Sin embargo, se pudo observar una disminución en la proliferación

celular a concentraciones de 5 y 10 mg/ml y estado puro en los días 1, 3, 5 y 7. Vale la pena recalcar, que todas las concentraciones afectaron negativamente la proliferación celular desde el día 5.

Los resultados de Miller, Takimoto, Wealleans y Diógenes (2018), fueron similares, usando un modelo experimental de 7 días con varios cerámicos se pudo identificar que el MTA produce disminución de la proliferación celular.

Estos resultados podrían explicarse porque la liberación de iones de calcio sobre las células madre de la papila apical podría afectar su ciclo celular, como se ha demostrado en otros estudios realizados sobre células madre de la pulpa dental donde se encontró que el calcio afecta en la proliferación celular. Sin embargo, no hay estudios sobre células de la papila apical que lo demuestren (Özdemir, Özçelik, Karabucak y Cehreli, 2008).

En la misma corriente de investigación Peters y colaboradores en 2015 demostró que el MTA en estado puro tal como lo recomienda la casa comercial ejerce un efecto negativo sobre la proliferación celular cuando las células son expuestas a prologados rangos de tiempo mayores a 7 días.

De igual manera Du, Lu, Song, Yang, Liu, Chen y Wang (2020), en el estudio "*Effects of ERK/p38 MAPKs signaling pathways on MTA-mediated osteo/ odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla: a vitro study*", demostraron que el MTA a bajas concentraciones podría estimular la proliferación celular, pero concuerda con nuestro estudio debido a que pudo demostrar que el MTA, a altas concentraciones altera la morfología celular, la viabilidad y la proliferación celular.

Estos resultados negativos que ejerce el MTA sobre las células de la papila apical podrían explicarse justificando que las células pierden la capacidad de diferenciación celular y por ende su capacidad para proliferar.

Sin embargo, Saberi, Karkehabadi y Mollashahi (2016), encontraron en su estudio que el MTA tenía la capacidad de estimular la proliferación celular. Vale la pena mencionar que los autores anteriormente mencionados utilizaron concentraciones mucho más bajas que las utilizadas en este estudio.

El MTA ha sido un material de amplio uso en la endodoncia regenerativa donde las casas comerciales sugieren una preparación en estado puro para su posterior aplicación. Sin embargo, en este trabajo se pudo evidenciar que no es recomendable utilizar este biocerámico en estado puro y que es necesario realizar diluciones para su posterior uso. En este trabajo se sugiere a los profesionales de la odontología usar concentraciones de 2,5 o 1,25 mg/ml.

Al utilizar diferentes técnicas de evaluación celular se pueden obtener mejores resultados, al incorporar pruebas que evalúen la actividad metabólica mitocondrial, el análisis de la integridad de la membrana celular y el análisis de la morfología celular hace que el estudio sea más integral.

Dentro de los resultados encontrados en este trabajo se puede notar que todas las pruebas realizadas dentro de la planeación metodológica tienen patrones similares. Se puede observar que la proliferación, la viabilidad y la morfología celular están directamente relacionadas con el nivel de concentración que se les coloca a las células de la papila apical.

Dentro de las limitaciones del estudio hay que mencionar que la coyuntura COVID-19 y el paro nacional de marzo a mayo de 2021 marcó retrasos en todos los procesos. Inicialmente se

pensó trabajar con otro material (Biodentine) en aras de darle continuidad a la línea de investigación, pero infortunadamente tuvimos que plantearlo con MTA.

Otro aspecto importante que vale la pena mencionar fue el estricto horario que se debía manejar por cuestiones de la pandemia.

Como sugerencias es necesario que otros grupos realicen un trabajo de investigación donde se evalué si las bajas concentraciones propuestas en este trabajo podrían cumplir con la función biológica del MTA. Es decir, ¿las bajas concentraciones promueven la diferenciación celular?, ¿las bajas concentraciones de MTA ayudan a cumplir con las funciones de estimulación del selle apical?

Por otro lado, realizar pruebas moleculares específicas donde se pueda identificar el estado de apoptosis de las células cuando son sometidas a diferentes concentraciones de MTA.

## 9 Conclusiones

El biocerámico MTA demostró que todas las concentraciones propuestas en el estudio afectaron negativamente la actividad metabólica celular con porcentajes de bajo del 15%

La presentación comercial pura del biocerámico MTA altera la estructura y metabolismo a nivel mitocondrial de las células de la papila apical, por lo tanto, su viabilidad celular se ve seriamente afectada.

El biomaterial MTA en todas sus concentraciones demuestra que afecta la proliferación celular.

El uso de varias técnicas 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 ayuda al odontólogo a facilitar la toma de decisiones, para elegir el material de elección, para un procedimiento clínico endodóntico regenerativo.

Las células de la papila apical permiten obtener resultados mas fiables debido a la relación directa que tienen en los procesos de formación del complejo pulpodentinal.

## 10 Bibliografía

Sanz, J., Forner, L., Almudever, A., Girones, J., Llena, Cane. (2020).

Viabilidad y estimulación de células madre humanas de la papila apical (hSCAP) inducidas por materiales a base de silicato para su uso potencial en endodoncia regenerativa: una revisión sistemática.

Alobaid, A., Cortes, L., Lo, J., Nguyen, T., Albert, J., Abu-Melha, A., & Gibbs, J. (2014).

Resultados radiográficos y clínicos del tratamiento de dientes permanentes inmaduros por revascularización o apexificación: un estudio de cohorte retrospectivo piloto. *Revista de endodoncia*, 40(8), 1063-1070.

American Association of Endodontists. (s.f.). *Endodoncia regenerativa*. Obtenido de AAE:

<https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/regenerative-endodontics/>

Arora, N., Juneja, R., & Meher, R. (2018). Complication of an odontogenic infection to an

orbital abscess: the role of a medical fraudster (“Quack”). *Iranian journal of otorhinolaryngology*, 30(98), 181.

Avilés, D. (2018). *Prevalencia de recesión gingival según la clasificación de Miller en pacientes*

*con enfermedad periodontal de la clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, Septiembre del 2016 a Mayo del 2018. Trabajo de grado*. Ecuador: Universidad Católica de Cuenca .

Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical

periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics*, 30(4), 196-200.

Baranwal, G., & Vidyarthi, D. (2015). A fair multi-attribute combinatorial double auction model

for resource allocation in cloud computing. *Journal of systems and software*(108), 60-76.

- Betancourt, K., Barciela, J., Guerra, J., & Cabrera, N. (2012). Uso de células madre en el complejo bucofacial. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 16(5), 651-661.
- Bharadwaj, S., Liu, G., Shi, Y., Wu, R., Yang, B., He, T., . . . Zhang, Y. (2013). Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem cells*, 31(9), 1840-1856.
- Bianco, P., Kuznetsov, S., Riminucci, M., Fisher, L., Spiegel, A., & Robey, P. (1998). Reproducción de displasia fibrosa humana de hueso en ratones inmunodeprimidos mediante mosaicos trasplantados de células progenitoras esqueléticas normales y mutadas en Gsalpha. *Revista de investigación clínica*, 101(8), 1737-1744.
- Bojar, W., Marczewska, J., Karwicka, E., & Anuszewska, E. (2009). Cytotoxicity and mutagenicity of N2 cement–root canal filling material. *Adv Clin Exp Med*(18), 615–621.
- Chueh, D., Roberts, S., Shakesheff, K., & Buttery, L. (2009). Engineering embryonic stem-cell aggregation allows an enhanced osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(4), 583-595.
- Colombia. Ministerio de Salud. Resolución 8430. (1993). *Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud*. Bogotá.
- Commons, M. (2008). Introduction to the model of hierarchical complexity and its relationship to postformal action. *World Futures*, 64(5-7), 305-320.
- Du, J., Lu, Y., Song, M., Yang, L., Liu, J., Chen, X., & Wang, Y. (2020). Effects of ERK/p38 MAPKs signaling pathways on MTA-mediated osteo/odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla: a vitro study. *BMC oral health*, 20(1), 1-9.
- Ehrlich, F. (1904). Ueber das natürliche Isomere des Leucins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 37(2), 1809-1840.

- Facchin, C., D'Anselmo, G., & Jiménez, L. (2018). Procedimiento endodóntico regenerativo en diente permanente no vital con ápice inmaduro. Reporte de caso. *Odous Científica*, 19(1), 29-41.
- Fan, Z., & Zhang, Q. (2005). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol*, 2(4), 259-264.
- Gaitán, A., Velosa, T., Rodríguez, A., Rodríguez, A., & Niño, J. (2017). Células troncales mesenquimales de la papila apical y su papel prometedor en la biología radicular. *Revista Mexicana de Estomatología*, 3(2), 61-74.
- Garzón, I., Martín, M., Alfonso, C., González, M., Carriel, V., Martínez, C., & Alaminos, M. (2014). Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(7), 4073-4083.
- Gibbs, S., Roffel, S., Meyer, M., & Gasser, A. (2019). Biology of soft tissue repair: Gingival epithelium in wound healing and attachment to the tooth and abutment surface. *Eur. Cells Mater*, 38, 63-78.
- Hargreaves, K., Diogenes, A., & Teixeira, F. (2013). Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediatric dentistry*, 35(2), 129-140.
- Hargreaves, K., Diogenes, A., & Teixeira, F. (2013). Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediatric dentistry*, 35(2), 129-140.
- Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Principales mecanismos apoptóticos y genes implicados en la apoptosis. *Biología tumoral*, 37(7), 8471-8486.

- Küçükkaya, S., Görduysus, M., Zeybek, N., & Müftüoğlu, S. (2016). Citotoxicidad in vitro de cemento endodóntico a base de silicato de calcio como materiales de obturación de extremos radiculares. *Scientifica*.
- Li, N., Zhang, Y., Nepal, N., Li, G., Yang, N., Chen, H., & Jin, S. (2021). Dental pulp stem cells overexpressing hepatocyte growth factor facilitate the repair of DSS-induced ulcerative colitis. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 1-13.
- Li, T., Schreibmann, E., Yang, Y., & Xing, L. (2006). Motion correction for improved target localization with on-board cone-beam computed tomography. *Phys Med Biol*, *51*(2), 253-267.
- Lopes, M., Koch, F., Ferreira, I., Bueno, R., & Moysés, S. (2010). Grupos focais: uma estratégia para a pesquisa em saúde. *RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, *7*(2), 166-172.
- Marciano, M., Camilleri, J., Lucateli, R., Costa, R., Matsumoto, M., & Duarte, M. (2019). Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF<sub>3</sub>. *Clinical oral investigations*, *23*(1), 33-41.
- Martin, M., Garzón, I., Oliveira, A., Alfonso, C., Sánchez, M., Campos, A., & Alaminos, M. (2013). Niveles de viabilidad celular promedio de las células madre de la pulpa dental humana: un índice combinatorio preciso para el control de calidad en la ingeniería de tejidos. *Citoterapia*, *15*(4), 507-518.
- Bharadwaj, S., Liu, G., Shi, Y., Wu, R., Yang, B., He, T., ... y Zhang, Y. (2013). Diferenciación multipotencial de células madre derivadas de orina humana: potencial para aplicaciones terapéuticas en urología. *Células madre*, *31* (9), 1840-1856.

- Mikos, A., Bao, Y., Cima, L., Ingber, D., Vacanti, J., & Langer, R. (1993). Preparación de estructuras de fibras unidas con poli (ácido glicólico) para la unión y el trasplante de células. *Revista de investigación de materiales biomédicos*, 27(2), 183-189.
- Miller, 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*, 44(4), 599-603.
- Miñana, M. (2002). El agregado de trióxido mineral (MTA) en endodoncia. *RCOE*, 7(3), 283-289.
- Montero, P. (noviembre de 2017). *Cementos biocerámicos en endodoncia. Novedades e indicaciones*. Obtenido de Espidident : <https://espidident.es/cementos-bioceramicos-en-endodoncia-novedades-e-indicaciones/>
- Nakashima, M., & Iohara, K. (2011). Regeneration of dental pulp by stem cells. *Advances in Dental Research*, 23(3), 313-319.
- Nosrat, A., Seifi, A., & Asgary, S. (2011). Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and reports of two cases with new biomaterial. *J Endod, New York*, 37(4), 562-567.
- Nygaard, B., & Hjortdal, O. (1971). Formación de tejido en el conducto radicular tras la extracción de la pulpa. *Revista europea de ciencias orales* , 79(3), 333-349.
- Obando, G., Torres, K., Salas, H., & Hofling, J. (2009). Análisis de la composición química, capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas del MTA y del cemento Portland. *Endodoncia*, 27(3), 111-120.
- Ospina, A., & Builes, W. (2013). Apexogénesis de un molar inferior permanente joven con MTA. *Revista Nacional de Odontología*, 9(16), 93-97.

- Özdemir, H., Özçelik, B., Karabucak, B., & Cehreli, Z. (2008). Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. *Dental Traumatology*, 24(1), 70-73.
- Peng, X., Li, C., & Zhou, R. (2020). Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *International Journal of Oral Science*, 12(9). doi:10.1038/S41368-020-0075-9
- Peters, O., Galicia, J., Arias, A., Tolar, M., Ng, E., & Shin, S. (2016). Effects of two calcium silicate cements on cell viability, angiogenic growth factor release and related gene expression in stem cells from the apical papilla. *International endodontic journal*, 49(12), 1132-1140.
- Petrino, J., Boda, K., Shambarger, S., Bowles, W., & McClanahan, S. (2010). Challenges in regenerative endodontics: a case series. *Journal of endodontics*, 36(3), 536-541.
- Prati, C., & Gandolfi, M. (2015). Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental materials*, 31(4), 351-370.
- Quesada, L., León, C., Fernández, S., & Nicolau, E. (2017). Células madre: una revolución en la medicina regenerativa. *MediSan*, 21(5), 574-581.
- Raghavendra, K., Vontas, C., Martins, J., Ng, A., Koou, L., Dusfour, Y., & Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7).
- Ramírez, J., Olaciregui, A., Salazar, G., Rivera, I., Zamorano, A., & Narváez, V. (2013). Evaluación de la orientación empática en estudiantes de odontología de la Fundación Universitaria San Martín. Puerto Colombia (Atlántico, Colombia). *Salud Uninorte*, 29(1), 34-41.

- Ruiz, A. (2012). Selle apical con MTA en un diente con apexogénesis incompleta: Reporte de Caso. *Revista CES Odontologia*, 25(1), 54-61.
- Saberi, E., Karkehabadi, H., & Mollashahi, N. (2016). Citotoxicidad de diversos materiales endodónticos en células madre de papila apical humana. *Revista de endodoncia iraní*, 11(1), 17.
- Sato, T., Matsuyama, J., Sato, M., & Hoshino, E. (1997). Differentiation of *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar* and *Veillonella parvula* using restricted fragment-length polymorphism analysis of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction. *Oral microbiology and immunology*, 12(6), 350-353.
- Shi, B., Zhao, Y., & Yuan, X. (2020). Effects of MTA and Brazilian propolis on the biological properties of dental pulp cells. *Brazilian oral research*, 33.
- Simon, S., & Flouriot, A. (2016). BioRoot™ RCS a new biomaterial for root canal filling. *J Case Studies Collection*(13), 4-11.
- Sottano, M. (2020). *Apexificación en dientes con rizogénesis incompleta. Doctoral dissertation*. Argentina: Universidad Nacional de Cuyo.
- Tessier, J., Rodriguez, P., Lifshitz, F., Friedman, S., & Lanata, E. (2010). The use of ozone to lighten teeth: An experimental study. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 23(2), 84-89.
- Thomson-Reuters. (15 de enero de 2009). *Regional content expansion in Web of Science®: opening borders to exploration*. Obtenido de GlobalHigherEd: <https://globalhighered.wordpress.com/2009/01/15/regional-content-expansion-in-web-of-science/>
- Torabinejad, M., Watson, T., & Pett, F. (1993). Sealeng ability of Mineral Trioxide aggregate when used as a root – end filling material. *Journal of Endodontics*, 19(12), 591-595.