



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS
ODONTOLOGICAS**

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

**EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARA
ESTIMULAR LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS
MADRE DE LA PULPA DENTAL DEL CEMENTO BIODENTINE® MODIFICADO
CON NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO.**

Diego H. Gaete Altamirano

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Camila Corral Núñez

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

Dr. Javier Martín Casielles

Adscrito a PRI ODO 18/004

Santiago - Chile

2019



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

**EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARA
ESTIMULAR LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS
MADRE DE LA PULPA DENTAL DEL CEMENTO BIODENTINE® MODIFICADO
CON NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO.**

Diego H. Gaete Altamirano

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Camila Corral Núñez

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

Dr. Javier Martín Casielles

Adscrito a PRI ODO 18/004

Santiago - Chile

2019

A mi madre, Pamela, y mi abuelita, Brisa, sin su apoyo ni sus enseñanzas no podría haber llegado a este momento.

A mis amigos, por las risas, la paciencia y el cariño.

A TCO por renovar mi amor por la odontología en cada voluntariado.

A la Dra Corral, por el apoyo durante este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de nanomateriales por incluirme en el proyecto y enseñarme algo nuevo.

A Septodont/Dental Laval por mostrar interés en este proyecto y facilitar el material Biodentine para el estudio.

A Proyecto PRI-ODO 18/004, FOUCH.

GRACIAS.

ÍNDICE

• RESUMEN.....	6
• INTRODUCCIÓN.....	7
• MARCO TEÓRICO.....	10
• Terapia Pulpar Vital en TDA.....	11
• Materiales dentales utilizados en TPV.....	13
• Cementos de Hidróxido de Calcio.....	14
• Cementos de Silicato de Calcio.....	15
• Agregado de Trióxido Mineral.....	15
• Biodentine.....	17
• Vidrio Bioactivo.....	19
• HIPÓTESIS.....	22
• OBJETIVOS.....	22
• Objetivo General.....	22
• Objetivos Específicos.....	22
• MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
• RESULTADOS.....	28
• DISCUSIÓN.....	35
• CONCLUSIÓN.....	38
• REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
• ANEXOS.....	48
• Anexo n.1 Síntesis de nVB.....	48
• Anexo n.2 Protocolo de Aislamiento de DPSCs.....	50

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Dentro de las interacciones entre materiales dentales y tejido dentario, el caso de la exposición pulpar es uno de los más complejos. En esta aplicación el material deberá estar en contacto directo con el tejido pulpar y ser capaz de estimular su reparación y la aposición de dentina. Con este propósito se han desarrollado diferentes materiales, entre los que podemos mencionar: los cementos de hidróxido de calcio y los cementos de silicato de calcio, como Biodentine® (BD, Septodont). Otro material que se encuentra en estudio por presentar propiedades favorables para esta aplicación son las nanopartículas de vidrio bioactivo (nVB). El propósito del estudio es investigar el efecto en la citotoxicidad y bioactividad que tiene la incorporación de nVB en cemento BD en células madre de pulpa dental (DPSCs).

METODOLOGÍA: Se realizaron discos de BD, BD modificado con nVB al 2 y 5% (BDnVB2%, BDnVB5%) y vidrio ionómero (VI, Fuji II, GC América). DPSCs fueron sembradas sobre los discos y mantenidas por: 3, 7 y 14 días para el ensayo de viabilidad; 7 y 14 días para ensayo de adhesión con microscopía electrónica de barrido y el ensayo de actividad fosfatasa alcalina (ALP). Las muestras fueron procesadas, las imágenes obtenidas fueron descritas en términos de densidad y morfología celular e interacción con el material. Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad y actividad ALP fueron analizados estadísticamente con ANOVA de uno y dos factores y post-test HSD Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS: En el ensayo de adhesión con microscopía electrónica de barrido se observó una capa densa de células aplanadas, con múltiples prolongaciones en la superficie de los discos de BD, BDnVB2% y BDnVB5%, mientras que VI presentó escasas células en su superficie. La viabilidad celular de DPSCs fue estadísticamente mayor en BDnVB2%, BDnVB5% respecto a VI y no fue diferente a la observada en las DPSCs cultivadas en BD. Por otro lado, las DPSCs cultivadas en los cementos nanocompuestos BDnVB2% y BDnVB5%, presentaron una mayor actividad de ALP que al ser cultivadas en BD o VI después de 7 días de incubación.

CONCLUSIONES: La incorporación de nVB a BD no modifica su citocompatibilidad sin embargo mejora su capacidad de inducir producción de ALP en las DPSCs. Esta incorporación podría suponer una mejora en la velocidad de formación de un puente dentinario y por tanto la cicatrización y reparación de la pulpa ante una injuria pulpar, sin embargo, se requiere realizar más estudios.

INTRODUCCIÓN

En odontología, la ciencia de los biomateriales busca desarrollar materiales que permitan preservar y restablecer los tejidos dentales perdidos. En un principio, se buscaba que el material fuese capaz de reemplazar el tejido perdido de manera inerte, idealmente sin interactuar con el medio (1). De esta manera, se buscaba no generar una respuesta adversa o de rechazo y tampoco que el material se degradara en el tiempo. Sin embargo, más recientemente, el enfoque ha cambiado hacia el desarrollo de materiales bioactivos que interactúen y generen respuestas favorable en el huésped, y así permitan realizar procedimientos menos invasivos (2).

Una de las interacciones entre material y tejido dental más compleja, es aquella que se genera cuando existe exposición pulpar, producto, por ejemplo, de un traumatismo dentoalveolar o por el avance de una lesión de caries. El material que reemplace estos tejidos perdidos no solo debe reemplazar esmalte y dentina ausentes, sino también interactuar favorablemente con el tejido pulpar. El recubrimiento pulpar directo y la pulpotomía parcial de Cvek corresponden a procedimientos que buscan mantener la vitalidad pulpar cuando hay una exposición de esta al medio bucal ante un traumatismo dentoalveolar (3). El material que se ponga en contacto con la pulpa debe cumplir con ciertas características que lo transformen en un sustituto dentinario adecuado (4). Comúnmente, las propiedades evaluadas en un material dental que será utilizado como reemplazo de tejido duro son su resistencia, adhesión, sellado marginal, solubilidad, facilidad de manipulación y estética (5). Sin embargo, en estos casos en que el material estará en contacto directo con tejido pulpar es especialmente relevante la evaluación de la interacción del material con las células involucradas.

En el caso de materiales que estarán en contacto pulpar directo existen dos propiedades que son altamente deseadas. Una de ellas, la citocompatibilidad, que es la capacidad de mantener la viabilidad celular y proliferación. La otra corresponde a la bioactividad, que es la capacidad de inducir una respuesta favorable en el huésped, formando una interfase de unión entre el tejido y el material. En el caso de esta aplicación se espera que sea a través del depósito de una capa mineral similar a hidroxiapatita (6). De manera tal, que el material sea capaz de generar un buen sellado de la interfase entre el biomaterial y el tejido pulpar (7), con el propósito de mantener la salud pulpar, previniendo la infiltración bacteriana y promoviendo la formación de un puente dentinario (8).

Existen distintos materiales que se han utilizado para estas aplicaciones a lo largo de la historia. En un principio se utilizaba el hidróxido de calcio por sus propiedades antibacterianas, y su capacidad de estimular y ser la matriz para la formación de un puente dentinario (9). Sin embargo, sus principales desventajas son el largo tiempo que demora en inducir formación de tejidos duros, la calidad del tejido formado y el efecto debilitador de la dentina que genera (10). Actualmente, los más recomendados son cementos en base a silicato de calcio, como Mineral Trioxide Aggregate (MTA) o Biodentine (11). Si bien MTA presenta excelentes propiedades bioactivas, sus bajas propiedades de resistencia mecánica y estéticas, sumadas a su difícil manipulación lo alejan de ser el sustituto dentinario ideal (12). En contraste, Biodentine[®] presenta, aparte de las propiedades bioactivas similares a MTA, propiedades mecánicas similares a la dentina, un menor tiempo de fraguado y mejor estética (13). Ambos materiales son capaces de depositar una matriz similar a hidroxiapatita y estimular la proliferación, adhesión y el depósito de dentina reparativa del tejido pulpar (14). Tanto los cementos en base a hidróxido de calcio como los cementos en base a silicato de calcio, comparten los mecanismos de estimulación celular y formación de matriz, la presencia de una alta concentración de calcio estimula la migración y diferenciación celular y el pH alcalino aumenta la expresión de la fosfatasa

alcalina (ALP) y proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) que promueven la formación de nódulos calcificados (15).

Recientemente se demostró *in vitro* que la incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo (nVB) a Biodentine® aumenta sus propiedades bioactivas, acelerando la velocidad de formación de una capa de apatita en la interfase restauración-dentina en condiciones simuladas acelulares (16). Sin embargo, no se han estudiado las respuestas celulares que podría generar este cemento nanocompósito. Es posible que la incorporación de nVB a Biodentine® mejore su capacidad de inducir diferenciación osteogénica, ya que estudios *in vitro* han demostrado el potencial de esta nanopartícula de inducir diferenciación odontogénica y formación dentinaria al producir un aumento de la expresión del gen Runx2 y de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), debido a un aumento de las concentraciones de silicio y la alcalinidad del pH a nivel extracelular (17). Esto se ve favorecido por el tamaño nanométrico de la partícula, que al poseer una mayor superficie de contacto, permite una disolución rápida de sus componentes para formar este medio extracelular bioactivo (18).

Debido a estas propiedades la incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo en materiales de recubrimiento pulpar podría mejorar su bioactividad y con ello otorgar efectos positivos en terapias pulpares. Es por ello que el presente proyecto busca evaluar la citocompatibilidad de Biodentine® modificado con nVB, y su capacidad de inducir diferenciación osteogénica al estar en contacto con células madre de la pulpa dental.

MARCO TEÓRICO

Los traumatismos dentoalveolares (TDA) son un grupo de lesiones que afectan los dientes y sus tejidos de soporte como consecuencia de un impacto, que según factores como la dirección y fuerza, la forma del objeto, la edad del paciente y la resiliencia de los tejidos bucales dan como resultado una amplia gama de presentaciones clínicas (19). Su frecuencia es alta, y ocurren mayoritariamente en la población bajo 20 años de edad (20, 21). En dentición permanente, el TDA más frecuente es la fractura coronaria, la cual corresponde a la pérdida de estructura dentaria (esmalte y/o dentina) con o sin exposición del órgano pulpar (complicada o no complicada, respectivamente) (22).

Según la guía para el manejo de trauma dental de la Asociación Internacional de Traumatología Dental (IADT), es ideal mantener y preservar la vitalidad de la pulpa dental, especialmente en pacientes jóvenes, que no presentan desarrollo radicular completo. En estos casos, un tratamiento mínimamente invasivo como la **terapia pulpar vital** (incluyendo recubrimiento pulpar directo y pulpotomía parcial) es el tratamiento de elección. Mientras que para pacientes adultos si bien muchas veces el tratamiento de elección es el tratamiento endodóntico, es posible también realizar estas terapias menos invasivas que permiten mantener la vitalidad de la pulpa (22).

TERAPIA PULPAR VITAL EN TDA

La terapia pulpar vital (TPV) tiene por objetivo preservar y mantener la pulpa dental que ha sido afectada, pero no destruida, por el proceso de caries, trauma o iatrogenia durante el mismo proceso restaurador (23). Dentro de las TPVs se incluye el recubrimiento pulpar directo (Figura 1), procedimiento que busca detener la hemorragia y aplicar un biomaterial protector en contacto directo con la pulpa sana expuesta menor a 1 mm, con la intención de sellar, formar una barrera protectora y mantener la vitalidad pulpar (4).

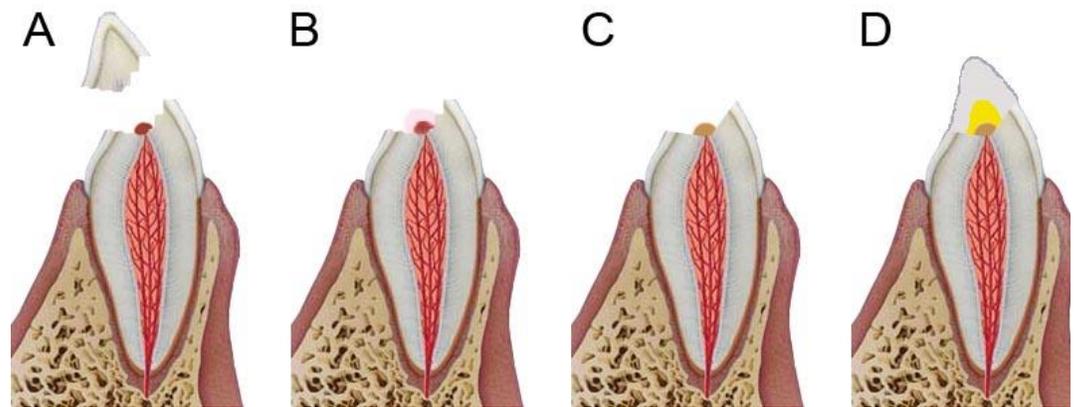


Figura 1. Esquema representativo del procedimiento de recubrimiento pulpar directo. A. Fractura coronaria complicada con exposición pulpar menor a 1mm - B. Control de la hemorragia - C. Aplicación de biomaterial - D. Restauración y control. (Imagen modificada de Diangelis et al., *Pediatr Dent.* 2017;39(6):401-11.)

Dentro de las TPV, también se incluyen la pulpotomía parcial o pulpotomía de Cvek (Figura 2), que es la eliminación parcial de tejido pulpar cameral expuesto, con desinfección y control de sangrado pulpar, con posterior sellado y restauración. Este tratamiento presenta una mayor tasa de éxito en exposiciones pulpares que son debido a trauma, que en las que tienen su origen en lesiones de caries dental (24).

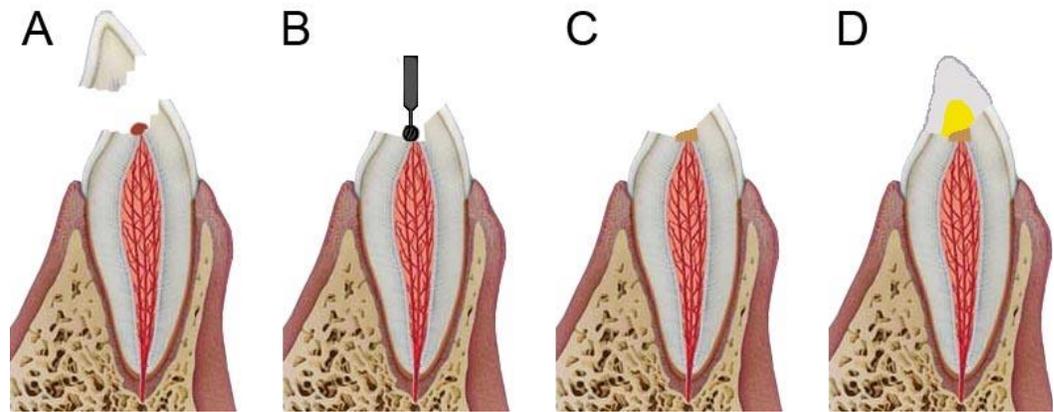


Figura 2. Esquema representativo del procedimiento de pulpotomía parcial A. Fractura Coronaria Complicada con exposición pulpar > a 1 mm - B. Eliminación de parte de la pulpa expuesta y control de la hemorragia - C. Aplicación de biomaterial - D. Restauración y control. (Imagen modificada de Diangelis et al., *Pediatr Dent.* 2017;39(6):401-11.)

Ante una injuria, el complejo pulpodentinario reacciona con una combinación de procesos inflamatorios y mineralizadores. Varios tipos celulares participan en la reacción: odontoblastos, fibroblastos, células madre y células del sistema inmunológico (células dendríticas, histiocitos, linfocitos T), por lo tanto, se genera una compleja serie de respuestas antibacterianas, inflamatorias, inmunes y vasculares (25). Los odontoblastos que se encuentren vitales son la primera línea de defensa, produciendo dentina reaccional, si estos no están presentes, las células ubicadas en la zona sub-odontoblástica se diferencian y reemplazan a estos odontoblastos. Sin embargo, cuando la pulpa es expuesta, la zona odontoblástica y sub-odontoblástica no puede reparar y se da inicio a otro proceso. Las células madres ubicadas en la pulpa son reclutadas, proliferan, se diferencian en células tipo odontoblasto y comienzan a producir dentina reparativa, matriz extracelular que pasará por un proceso de mineralización hasta formar un puente dentinario que puede llenar parcial o totalmente la cámara pulpar (26).

MATERIALES DENTALES UTILIZADOS EN TPV

Los materiales utilizados en la TPV deben cumplir con ciertas propiedades que permitan obtener resultados óptimos y conservar la vitalidad pulpar. El material debe ser capaz de producir un buen sellado bacteriano, endurecer en un ambiente y en contacto con tejidos con constante humedad, estimular el depósito de dentina terciaria y promover la reparación de la pulpa (4).

La biocompatibilidad ha sido descrita como la capacidad de un material para funcionar en un sistema vivo, y que este responda de manera apropiada ante el material, es decir sin reacciones adversas. Por seguridad, es necesario evaluar la biocompatibilidad de un material previo a usarlo clínicamente, para esto es necesario realizar estudios *in vitro*, en animales y ensayos clínicos (27). Para que un material sea considerado biocompatible es sometido a diversos ensayos: citotoxicidad, genotoxicidad y sensibilidad (2). Los ensayos de citotoxicidad buscan evaluar la viabilidad de las células que están en contacto con el material y los productos de disolución de este; comúnmente son realizados *in vitro* y proveen resultados repetibles, sin embargo, no constituyen una réplica exacta de la situación clínica ni tampoco de la complejidad de los tejidos (28).

La bioactividad de un material, se puede evaluar no solo por su capacidad de depositar apatita en contacto con fluidos fisiológicos, sino también por su capacidad de inducir a las células a formar tejido mineralizado (29). Durante la dentinogénesis, aumenta la expresión de ciertos genes, proteínas y moléculas, tales como DSPP (gen para sialoproteína dentinaria -DSP-, fosfoproteína dentinaria -DPP-), fosfoproteína para matriz dentinaria (DMP-1), ALP, osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), Runx2, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los cuales se han evaluado para determinar la bioactividad de materiales (30). La enzima fosfatasa alcalina (ALP) es un conocido marcador de diferenciación osteogénica y odontogénica. Se considera que ALP juega un rol importante en la mineralización

de dentina reparativa y es un marcador proteico de desarrollo odontoblástico temprano, asociado a una intensa actividad secretoria de la célula (31). Por tanto, la expresión de esta y su actividad ha sido tema de investigación para evaluar la bioactividad de cementos utilizados como protección pulpodentinaria. Se han obtenido resultados favorables para los cementos en base a silicato de calcio, ya que, en contacto con células madre de pulpa dental, se observa una expresión aumentada de ALP y de su actividad (32).

CEMENTOS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO

Dentro de los materiales recomendados para ser utilizados en TPV, uno de los primeros en ser utilizado por presentar propiedades bioactivas fue el hidróxido de calcio, disponible en dos formatos: pasta-pasta fraguable, donde la base contiene fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y 1,3 butilenglicol disalicilato, el catalizador contiene hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y sulfonamida de N-etil-o/p-tolueno, además de óxido (ZnO) y estearato de zinc ($\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)_2$), tungstato de calcio (CaWO_4), dióxido de titanio (TiO_2) y pigmentos de óxido de hierro (FeO) (ejemplo: Dycal[®], Denstply, USA); y el formato no fraguable, en formato pasta cremosa en base a hidróxido de calcio y agua (ejemplo: Calcicur[®], VOCO, Alemania, Figura 3) (33).



Figura 3. Cementos de hidróxido de calcio A. Dycal[®] - B. Calcicur[®]

Esta pasta de hidróxido de calcio tiene un pH de 12-13 lo que le da propiedades bactericidas y capacidad de inducir la formación de una cicatriz pulpar mediante la formación de una zona necrótica con dentina desmineralizada (debido al grabado alcalino). Además, induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento dentinarios en las células sobrevivientes y por lo tanto un proceso

de reparación tisular y de aposición de dentina. La aposición de una matriz de calcio produce una barrera mecánica, lo que en la práctica clínica es beneficioso, ya que genera un sellado del tejido pulpar, necesario para evitar una posible colonización bacteriana (34). Sin embargo, ensayos *in vitro* han mostrado que el hidróxido de calcio no solo no induce, si no que inhibe la proliferación y diferenciación de las células madre en la pulpa dental (35). Además, su alta citotoxicidad (producto del pH alcalino) y alta solubilidad lleva a la formación de porosidades y microfiltraciones en la interfase material-dentina, una posible causa de fracaso de la TPV (23, 33). Ante estos inconvenientes se han desarrollado otros materiales que presentan una mejor biocompatibilidad, inducen el proceso reparativo en la pulpa (36), y son bioactivos: como los cementos de silicato de calcio. Entre ellos se encuentran el Agregado de Trióxido Mineral (MTA, Maillefer-Dentsply, Suiza), y Biodentine (BD, Septodont, Francia) (37).

CEMENTOS DE SILICATOS DE CALCIO

AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA)

MTA fue desarrollado en el año 1993 por Torabinejad y colaboradores en la Universidad de Loma Linda, con el objetivo de obtener un material biocompatible capaz de sellar ápices y perforaciones en la raíz del diente (10). Este material es básicamente cemento de Portland (CP) de construcción con un agregado radiopaco (Figura 4). Compuesto principalmente por silicato tricálcico ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), aluminato tricálcico ($\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 3\text{CaO}$), óxido tricálcico, óxido de silicio (SiO_2) y óxido de bismuto (Bi_2O_3) (38), este cemento se presenta comercialmente en un sobre hermético con el polvo, al que se le agrega agua destilada estéril en una proporción polvo-líquido de 3:1 (39). Al hidratar este polvo se forma un gel coloidal sobresaturado de hidróxido de calcio y silicato de calcio hidratado, también llamado “gel de silicato” (40) que alcanza un pH de 10-10,5, y es capaz de llegar a un pH similar al hidróxido de calcio (12.5) después del fraguado inicial de 3 horas.

Como material restaurador, posee un buen sellado y adaptación marginal. Su solubilidad es variable dependiendo de la cantidad de agua utilizada en la mezcla inicial (41) y presenta buena radiopacidad, debido a la presencia de óxido de bismuto (42). Este material presenta una buena citocompatibilidad y capacidad para inducir formación de tejido mineralizado, con mínima o nula respuesta inflamatoria, que en comparación a la necrosis alcalina del hidróxido de calcio lo hace un mejor sustituto dentinario (43).

Con respecto a su uso en la TPV, el MTA ha mostrado una mayor tasa de éxito a corto y largo plazo que el hidróxido de calcio, tanto en dientes primarios (44) como en dientes permanentes (45, 46), con formación de un puente dentinario de mayor grosor, más organizado y una respuesta pulpar más favorable y predecible que ante el uso de hidróxido de calcio (47). Sin embargo su largo tiempo de endurecimiento, bajas propiedades mecánicas, además del cambio de coloración que genera en el diente en el tiempo (41) son sus principales desventajas para su uso en TPV.



Figura 4. Presentaciones comerciales de MTA Angelus® y ProRoot MTA®

BIODENTINE

Biodentine® es un producto en base silicato de calcio, comercializado desde el 2011 como material de remplazo de tejido dentinario, con un amplio rango de indicaciones, desde reparación endodóntica a material de recubrimiento pulpar directo (48). Se presenta en una cápsula que contiene el polvo y una ampolla para el líquido. El polvo está compuesto de: silicato tricálcico ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), silicato dicálcico ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), carbonato de calcio (CaCO_3), dióxido de zirconio (ZrO_2) y óxido de hierro (FeO) que se mezcla con el líquido compuesto de: cloruro de calcio (CaCl_2), agua y un agente reductor en base a un polímero hidrosoluble (49, 50) (Figura 5).

Al momento de ser mezclados, el silicato tricálcico reacciona con el agua formando un gel de silicato tricálcico hidratado con núcleos de silicato tricálcico, pasado un tiempo este gel forma una red sólida y libera hidróxido de calcio al medio aumentando la alcalinidad. Las partículas de silicato tricálcico que no reaccionan son envueltas por este gel y se convierten en núcleos de mineralización donde se depositan los cristales de CaCO_3 formados en el proceso de hidratación. Estos llenan lentamente las porosidades entre el cemento sin reaccionar, alcanzando su máxima capacidad en aproximadamente dos semanas, dando como resultado una estructura parcialmente impermeable (13, 49).



Figura 5. Biodentine® y su forma de presentación cápsula/ampolla monodosis.

La reacción de hidratación de Biodentine® está resumida en la siguiente fórmula:



Al momento de interactuar con la dentina, el gel forma una interfase mineral de cristales de carbonato de calcio que infiltran los túbulos dentinarios, lo que se ve facilitado por el “grabado alcalino” del fuerte pH alcalino sobre las fibras de colágeno (7). La interfase formada es rica en Ca y Si, considerados importantes en la precipitación de apatita de estos materiales cuando están en contacto con fluidos biológicos. Durante el proceso de hidratación del silicato de calcio, se produce un aumento de pH e iones Si y Ca^{2+} en el medio, sobresaturándolo y facilitando su precipitación. Además de esto, los grupos funcionales que contienen silicio, presente en la matriz de silicato hidratado actúan como centros de nucleación para la precipitación de apatita (51).

Biodentine® tiene una alta citocompatibilidad, demostrada por su baja citotoxicidad y genotoxicidad (52). Esto ha sido evaluado en diferentes tipos de células como, fibroblastos (53), células de médula ósea (54) y células madre de pulpa dental (55) y se han obtenido similares resultados en cuanto a viabilidad, adhesión y proliferación celular. En comparación con MTA, posee mejores propiedades mecánicas, similares a la dentina lo que sugiere podría ser un mejor sustituto dentinario (56). Presenta, además un tiempo de fraguado reducido lo que es una ventaja en la práctica clínica (13).

VIDRIO BIOACTIVO

El vidrio bioactivo (VB) fue desarrollado en 1969 por el profesor Larry Hench en la Universidad de Florida. Existen varias presentaciones del VB (Figura 6), dentro de estos el más utilizado es el 45S5 que se compone por esta red de silicato y por dióxido de silicio (SiO_2), óxido de fósforo (P_2O_5), óxido de sodio (Na_2O) y óxido de calcio (CaO) resumidos en la siguiente fórmula: 46.1 SiO_2 , $2.6 \text{ P}_2\text{O}_5$, $24.4 \text{ Na}_2\text{O}$, 26.9 CaO (mol%) (57). Se destaca por poseer la capacidad de adherirse a hueso y a tejido conectivo. Dependiendo del tamaño de la partícula, posee la capacidad de inducir formación de hueso mediante proliferación y diferenciación de líneas celulares osteoprogenitoras (58).



Figura 6. Fotografía de nanopartículas de vidrio bioactivo.

Se ha utilizado principalmente en el área ortopédica en trauma, artroplastia y como material de relleno posterior a la remoción de quistes o tumores (59). También ha sido utilizado en áreas de la odontología, como la cirugía maxilofacial, en perforaciones y elevaciones de seno maxilar y también en casos de fractura de piso de órbita. En implantología dental se ha utilizado como modificador de la superficie implantar; y en periodoncia para rellenar defectos óseos producto de enfermedad periodontal (60). También se ha agregado a pastas dentales como agente remineralizante y para disminuir la sensibilidad dentaria al obliterar los túbulos dentinarios (61).

En estudios *in vivo* presenta excelentes propiedades como material de recubrimiento pulpar directo, similares al MTA, en relación a la respuesta inflamatoria que ambos materiales producen en el tejido pulpar y a la capacidad formadora de un puente dentinario (62). Además, es capaz de obtener un buen sellado en la interfase material-dentina al realizar intercambio iónico, comparable con el cemento de vidrio ionómero (63) donde el tamaño de las partículas influye en la adhesión, sellado y formación de apatita. Las partículas de tamaño nanométrico presentan mejores propiedades que su contraparte micrométrica al tener mayor superficie de contacto (64).

Se ha estudiado también la incorporación de nVB a Biodentine[®], demostrándose que acelera su bioactividad, al aumentar la velocidad con la que se deposita apatita en la superficie del material cuando está en contacto con fluido fisiológico simulado acelular (16). Debido a las posibles indicaciones de uso de este material nanocompuesto en contacto directo con tejido pulpar, es relevante investigar su comportamiento en contacto directo con cultivos celulares. En primer lugar, se hace necesario verificar la citocompatibilidad de este material. Se espera que la incorporación de nanopartículas de nVB no altere las propiedades biológicas de Biodentine[®], ya que hay estudios que sugieren que el vidrio bioactivo produce una respuesta celular similar a MTA en el tejido pulpar (62). Por otro lado, es también

relevante evaluar el efecto de la incorporación de nVB en el BD sobre el proceso de diferenciación celular odontogénico. La incorporación de nVB en BD podría aumentar la capacidad de este cemento para inducir la diferenciación odontogénica de células madre de la pulpa dental, lo cual podría tener consecuencias favorables en la formación de dentina en tratamientos de TPV con este tipo de materiales.

HIPÓTESIS

La incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo a Biodentine® mantiene la citocompatibilidad del nanocompuesto y mejora su capacidad para estimular la diferenciación osteogénica en células madre de la pulpa dental.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la citocompatibilidad de Biodentine® modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo en células madre de pulpa dental y su capacidad de estimular diferenciación osteogénica *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

1. Evaluar la morfología y adhesión de células madre de la pulpa dental cultivadas con Biodentine® modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo.
2. Evaluar la citocompatibilidad de Biodentine® modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo con células madre de la pulpa dental.
3. Evaluar la capacidad de Biodentine modificado con nano partículas de vidrio para inducir diferenciación de células madre de pulpa dental a un fenotipo mineralizante.

METODOLOGÍA.

1. Tipo de estudio

Esta investigación corresponde a un estudio experimental *in vitro*, en el cual se determinó y comparó la citocompatibilidad y capacidad osteogénica en células madre de pulpa dental de Biodentine® modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo. Este proyecto se realizó en el laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

2. Grupos experimentales

Se utilizaron los siguientes materiales experimentales:

- Biodentine® modificado con 2% de nanopartícula de vidrio bioactivo (BDnVB2%)
- Biodentine® modificado con 5% de nanopartícula de vidrio bioactivo (BDnVB5%)

Se utilizaron los siguientes materiales como control de referencia:

- Control positivo, Biodentine® sin modificar (BD, Septodont, Saint-Maur-des-Fosses Cedex, Francia)
- Control negativo, Cemento de vidrio ionómero (VI, GC Corporation, Tokio, Japón)
- Células sin ningún tipo de material (CT)

3. Preparación de materiales.

Las partículas de nVB (40-70 nm) fueron sintetizadas por el método sol-gel (Anexo n.1) usando la composición molar: $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5$. El nanocompósito fue preparado con un 2 y 5% (M/M) en contenido de la nanopartícula, debido que resultados anteriores indicaron que con este contenido se logran la mayor actividad de formación de apatita en medio fisiológico simulado (16). Para este propósito se añadieron 0,015 y 0,039 g de nVB, previamente pesados en una balanza de

precisión Radwag WT2000, a una cápsula de Biodentine (BD) luego fue mezclado en el amalgamador Softly-8 (Satelec, Francia) por 30 segundos. Posteriormente se abrió la cápsula y se vertieron 5 gotas de líquido BD para ser mezclado según instrucciones del fabricante. Los compuestos (BDnVB) fueron puestos en moldes de silicona hasta terminar el tiempo de fraguado y se obtuvieron discos de 6 mm de ancho y 1,5 de altura. Previamente a su utilización estos discos fueron lavados individualmente con tampón fosfato salino (PBS) con el siguiente protocolo: 2 lavados de 24 horas y 2 lavados de 15 minutos. Este protocolo también fue aplicado en los discos de los materiales control.

4. Análisis de Superficie con microscopía electrónica de barrido con detector de energía dispersiva (MEB-EDX)

Se montaron discos de BD, BDnVB2%, BDnVB5% y VI en portamuestras de aluminio y posteriormente se metalizaron con oro en metalizador Denton Desk V (Denton Vacuum, New Jersey, USA) y se observaron en aumentos de 100x, 500x y 1000x con un microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM IT300LV (Jeol USA Inc., EEUU) y se les realizó análisis EDX con software de Aztec EDS system (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido) en las superficies con aumento de 1000x.

5. Evaluación de respuesta celular

5.1 Cultivo celular

Se utilizaron células madre aisladas de la pulpa dental humana (Dental pulp stem cells – DPSCs) mediante un protocolo optimizado (Anexo n.2) y que se mantienen criopreservadas en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología. Las DPSCs fueron cultivadas en Alpha-MEM suplementado con 10% (v/v) suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina y solución buffer HEPES 10mM en una atmósfera humidificada a 37°C y 5%

CO₂. El medio de cultivo fue cambiado una vez al día hasta completar los días de cultivo.

5.2 Análisis de adhesión y morfología celular

DPSCs (50.000 células) fueron sembradas en placas de 48 pocillos conteniendo un disco de material. Las células fueron incubadas y al término del tiempo a evaluar (7 y 14 días) las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2% y cacodilato de sodio 0,1 M por 2 horas y almacenadas a 4°C antes de empezar el proceso de deshidratación. Posterior a ello, los discos fueron deshidratados en soluciones crecientes de etanol por 5 minutos. Las muestras fueron puestas en el Secador de punto crítico Autosamdri-815, Series A (Tousimis, Maryland, USA) usando CO₂ por 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron metalizadas con una película de oro en metalizador Denton Desk V (Denton Vacuum, New Jersey, USA) y luego examinadas mediante microscopia electrónica de barrido Jeol Modelo JSM IT300LV (Jeol USA Inc., EEUU).

Las imágenes fueron obtenidas con aumentos de 100, 500 y 1000x. Las células fueron descritas en términos de densidad de células, su morfología e interacción con la superficie del material. Para este ensayo una muestra por material fue seleccionada para evaluar en MEB.

5.3 Análisis de viabilidad celular

La prueba de viabilidad celular fue realizada utilizando el ensayo de viabilidad con 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium (MTS), siguiendo el protocolo del fabricante (Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution cell proliferation assay kit, Promega, Wisconsin, USA). Discos de los materiales fueron insertados en placas de 24 pocillos y

posteriormente 50.000 DPSCs fueron sembradas. El ensayo de MTS fue realizado después de 3, 7 y 14 días de cultivo. El ensayo fue realizado en cuatriplicado (4 muestras por material, por tiempo) en dos experimentos independientes. La absorbancia fue medida en un lector de placa de Elisa a 490 nm. La viabilidad celular fue determinada calculando el promedio de absorbancia de las células tratadas con los materiales.

5.4 Análisis de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP).

La capacidad de diferenciación dentinogénica de las DPSCs fue evaluada midiendo la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). DPSCs (50.000) fueron cultivadas en placas de 48 pocillos conteniendo discos de los materiales durante 7 y 14 días de cultivo. El ensayo fue realizado en triplicado (3 muestras por material, por tiempo) en dos experimentos independientes. Una vez terminado el tiempo de cultivo, se lavaron con PBS y se adicionaron 100 µl de tampón de lisis a pH 9.8 (solución preparada con NP-40 O Triton X-100 (1%), Tris (0,2 M), MgCl₂*6H₂O (10 mM), ZnCl₂ (1 mM) y 100 mL de agua desionizada). Se incubaron en frío por 15 minutos y centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12000 RPM en centrífuga HERMLE Z216MK para eliminar cualquier material insoluble. Se recogió el sobrenadante y se mantuvo en frío. A cada una de las muestras se les agregó 50 µl de p NPP9 mM en buffer de reacción (Tis (5^o mM)), MgCl₂ (1 mM), ZnCL₂ (0,1 mM). Se agregaron 10 µl de solución de enzima ALP a cada muestra. Se incubaron las muestras a 37°C durante 90 minutos protegidas de la luz, en una solución de 90% etanol y 10% de formaldehido (de concentración 37%) durante 30 segundos, luego se lavaron con una solución PBS y se agregó el reactivo en buffer de reacción (Anexo n. 3). Las células fijadas se incubaron con fosfato de p-nitrofenol a pH básico (pNPP, incoloro) durante 20 min a 37 °C, tiempo durante el cual el pNPP fue desfosforilado en presencia de ALP, liberando p-nitrofenol, que en condiciones fisiológicas pierde un protón generando p-nitrofenolato, de color amarillo. La cantidad de p-nitrofenolato generado es

directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, y se midió por absorbancia a 405 nm en un lector de placa ELISA. La actividad de ALP fue determinada calculando el porcentaje de diferencia de absorbancia entre las células tratadas con los materiales y las células sin tratar.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas de citocompatibilidad y de diferenciación osteogénica fueron tabulados y presentados como promedios +/- desviación estándar. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la distribución de los datos de cada material, con el software SPSS Statistics 21.0 (IBM, New York, USA). Los datos se analizaron con ANOVA de uno y dos factores y post-test HSD Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Caracterización superficial de los materiales con MEB-EDX

Mediante MEB se obtuvieron imágenes de la superficie de los materiales: BD, BDnVB2%, BdnVB5% y VI (Figura 7).

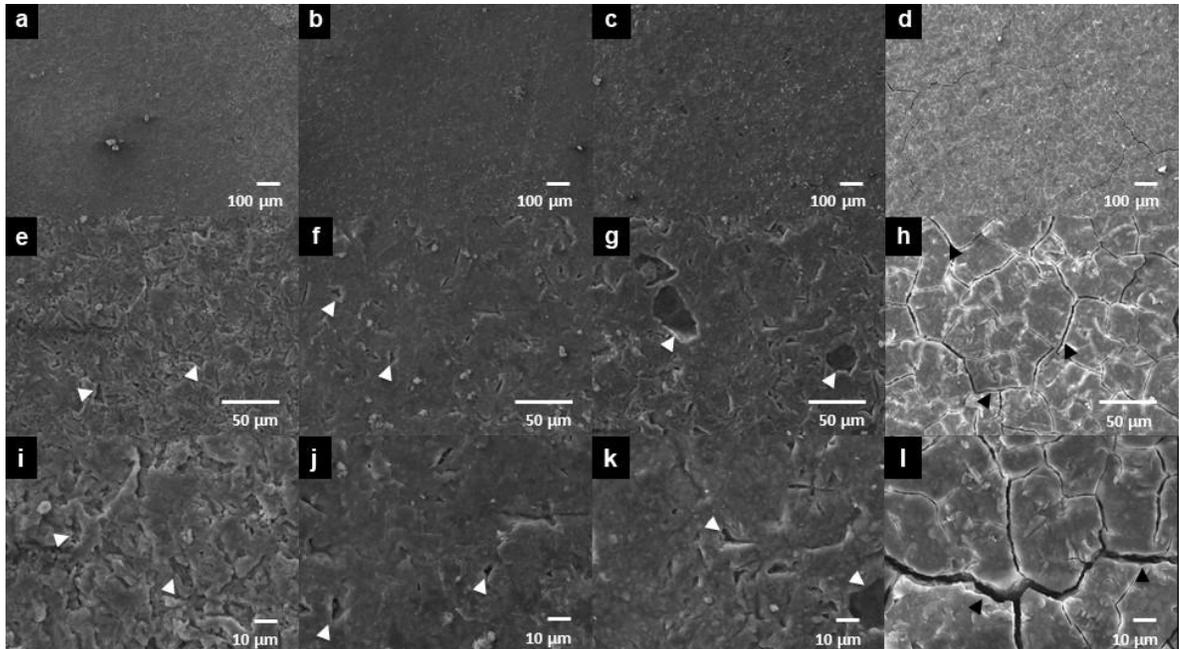


Figura 7. Imágenes obtenidas con MEB de la superficie de los materiales BD (a, e, i), BDnVB2% (b, f, j), BDnVB5% (c, g, k) y VI (d, h, l) con aumentos de 100x (a, b, c, d), 500x (e, f, g, h) y 1000x (i, j, k, l). Las puntas de flecha blanca muestran irregularidades en la superficie de los materiales BD, BDnVB2% y BDnVB5%. Las puntas de flecha negra muestran grietas en la superficie de VI.

Las superficies de los discos de BD, con y sin agregado de nVB, se observan similares. Las cuales presentan irregularidades leves con pequeñas porosidades, observables a magnitudes superiores (500 y 1000X). En cambio, la superficie de VI presenta una superficie lisa, con grietas visibles con aumentos de 500 y 1000x.

En el análisis elemental EDX (Figura 8), se puede observar la composición elemental de los materiales. BD, BDnVB2% y BDnVB5% se componen

principalmente (>10% en peso) de oxígeno, calcio, carbono, en menor cantidad (1-10% en peso) de sílice, nitrógeno, con trazas (<1% en peso) de sodio y fósforo. Por otro lado, VI se compone principalmente (>10% en peso) de oxígeno, carbono y estroncio, en menor cantidad (1-10% en peso) de aluminio y sílice, con trazas (<1% en peso) de sodio.

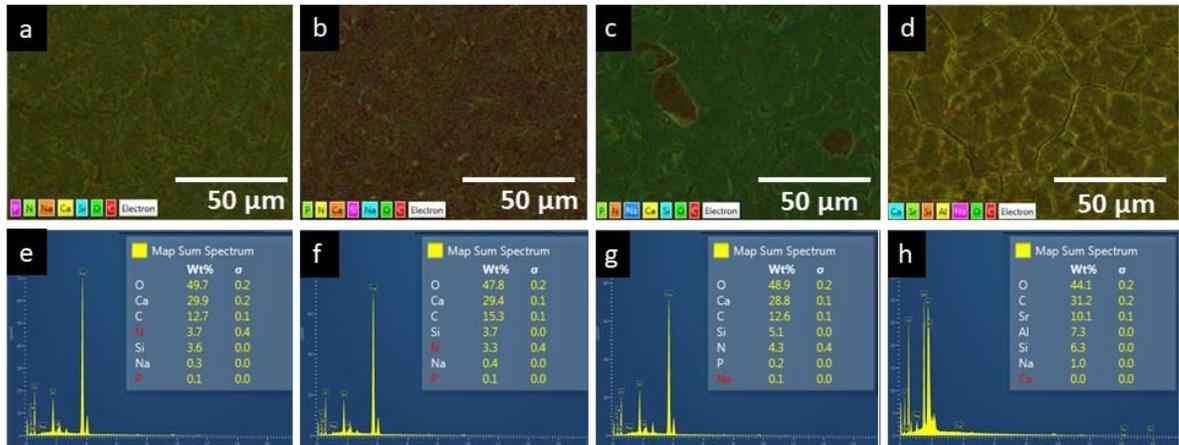


Figura 8. Imágenes representativas obtenidas con MEB acoplada a mapeo composicional EDX de la superficie de los materiales BD (a, e), BDnVB2% (b, f), BDnVB5% (c, g) y VI (d, h), su respectivo espectro EDX y tabla con contenido de los elementos.

2. Análisis MEB de adhesión y morfología de DPSCs sobre los materiales

Mediante MEB se obtuvieron imágenes de la superficie de los materiales: BD, BDnVB2%, BdnVB5% y VI después de 7 y 14 días de cultivo con DPSCs (Figura 9 y 10 respectivamente).

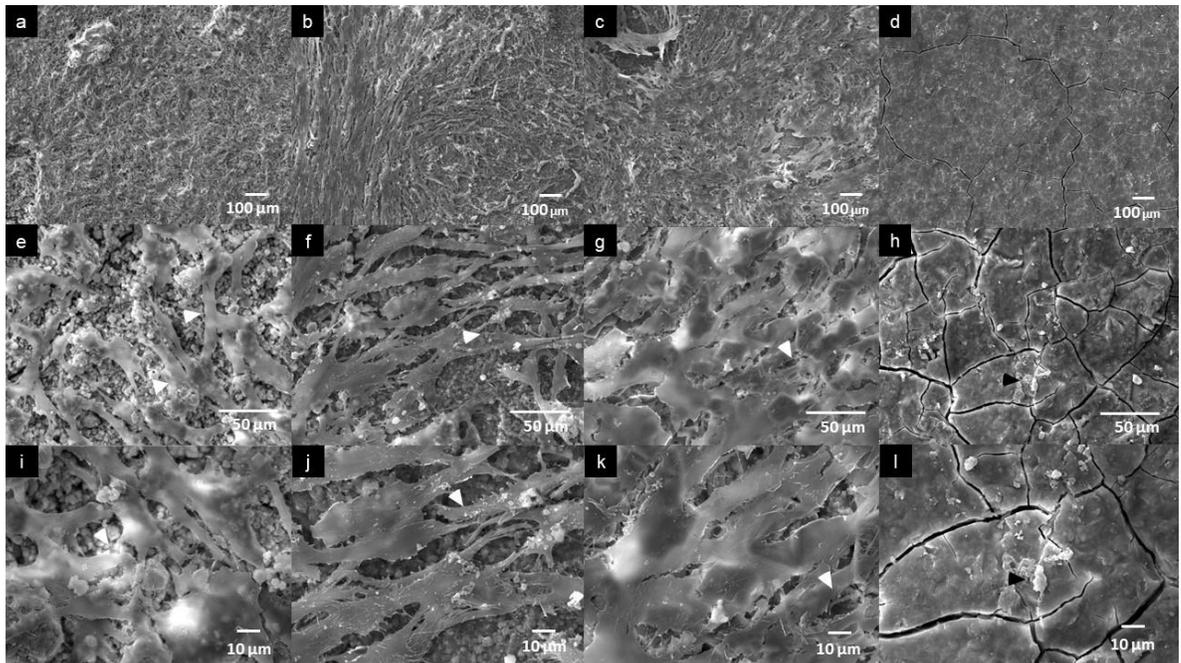


Figura 9. Imágenes obtenidas con MEB después de siete días de cultivo de DPSCs sobre la superficie de los materiales BD (a, e, i), BDnVB2% (b, f, j), BdnVB5% (c, g, k) y VI (d, h, i), a aumentos de 100x, 500x y 1000x. La superficie se observa cubierta por una capa celular incipiente en BD, BDnVB2% y BDnVB5%. Las puntas de flecha blancas muestran células aplanadas con prolongaciones citoplasmáticas, características de una célula vital. Por otro lado, las puntas flecha negra muestran una célula de aspecto apoptótico: redonda, contraída en VI.

A los 7 días de cultivo, se observa la presencia de una capa celular sobre las superficies de BD, BDnVB2% y BDnVB5% que cubre casi la totalidad de la superficie, con células aplanadas de aspecto fibroblástico, con múltiples prolongaciones. Por otro lado, en VI se observa la superficie del material con reducida cantidad de células, las cuales a mayores aumentos se observan con características de muerte celular: aisladas, de forma redondeada, con pocas o inexistentes prolongaciones citoplasmáticas.

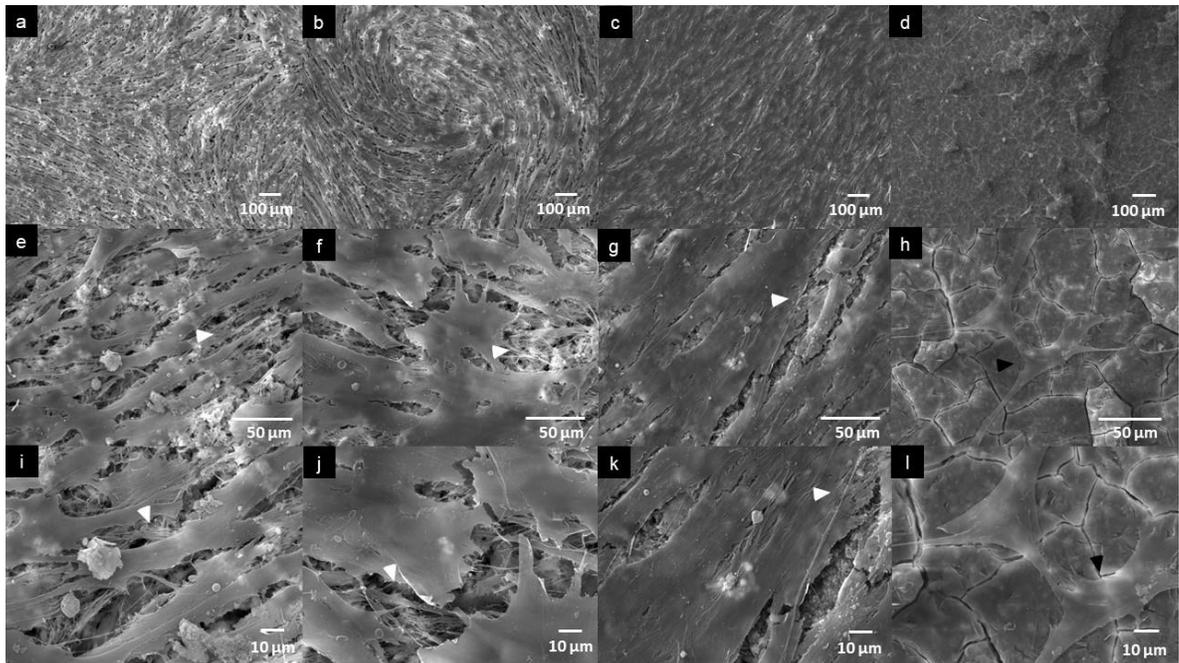


Figura 10. Imágenes obtenidas con MEB después de 14 días de cultivo de DPSCs sobre la superficie de los materiales BD (a, e, i), BDnVB2% (b, f, j), BdnVB5% (c, g, k) y VI (d, h, i), a aumentos de 100x, 500x y 1000x. La superficie se observa cubierta por una capa celular más densa en BD, BDnVB2% y BDnVB5%, en comparación a los observado después de 7 días (Figura 9). Las puntas de flechas blancas muestran como las prolongaciones citoplasmáticas se extienden en varias capas celulares. Las puntas de flechas negras muestran una célula aislada en la superficie de VI.

Después de 14 días de exposición, se observa un aumento en la cantidad de células, formando un tejido organizado sobre la superficie de BD, BDnVB2% y 5%. En contraste, VI presenta algunas células aisladas sobre la superficie del material, levemente contraídas y con pocas prolongaciones.

3. Análisis de viabilidad celular de DPSCs en contacto con los materiales

Los resultados del análisis de viabilidad de DPSCs en contacto con los materiales evaluados se presentan en la Figura 11.

La viabilidad celular de DPSCs al contacto con los materiales nanocompuestos (BDnVB2% y BDnVB5%) no presentó diferencias estadísticamente significativas al

compararla con BD, en todos los tiempos estudiados. Sin embargo, al compararlo con el contacto con VI, se observó una mayor viabilidad celular a los 3 días de cultivo de BD y BDnVB2% ($p=0,016$ y $p=0,005$ respectivamente). A los 7 días, DPSCs en contacto con BD, BDnVB2% y 5% presentaron mayores valores de viabilidad celular en comparación a VI ($p=0,009$, $p=0,016$ y $p=0,011$ respectivamente). Luego de 14 días, las DPSCs en contacto con BDnVB2% presentan la mayor viabilidad celular, estadísticamente diferente a VI ($p=0,017$), el cual presentó una menor viabilidad en todos los tiempos.

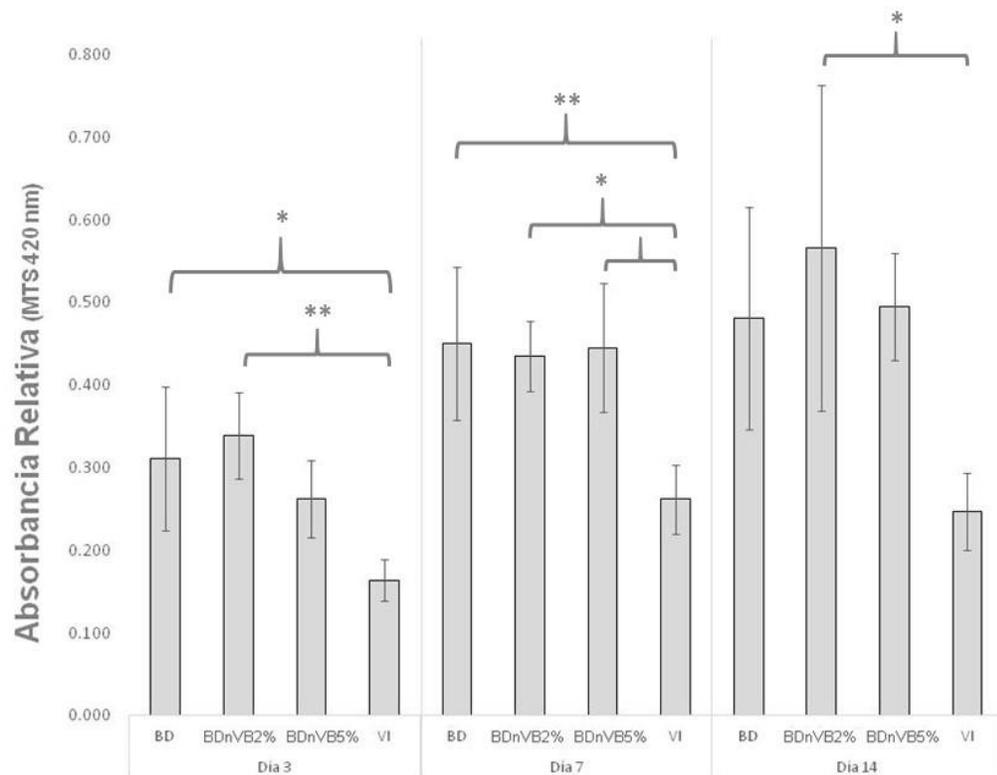


Figura 11. Viabilidad celular evaluada con MTS en DPSCs expuestos a BD, BDnVB2%, BDnVB5% y VI por 3, 7 y 14 días. Los valores son promedios combinados de 2 experimentos ($n=4$ /por experimento), las barras verticales indican desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($*=p<0.05$, $**=p<0.01$) entre los grupos de acuerdo con los resultados de test de ANOVA y post-hoc de Tukey.

Al analizar los resultados de la actividad de MTS considerando la interacción de ambos factores: material y tiempo (ANOVA de 2 factores) se observa que existen diferencias entre los grupos y existe un aumento de la viabilidad en el tiempo, pero no existe interacción entre ambos factores ($p=0,53$).

4. Análisis de actividad de la enzima fosfatasa alcalina en DPSCs en contacto con los materiales

Los resultados del análisis de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en DPSCs en contacto con los materiales se muestran en la Figura 12. Luego de 7 días de cultivo, la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en DPSCs expuestos a los nanocompósitos (BDnVB2% y BDnVB5%) es estadísticamente mayor que el control, BD y VI. Luego de 14 días, la actividad de ALP de BD, BDnVB2% y BDnVB5% es estadísticamente mayor que en el grupo control y VI.

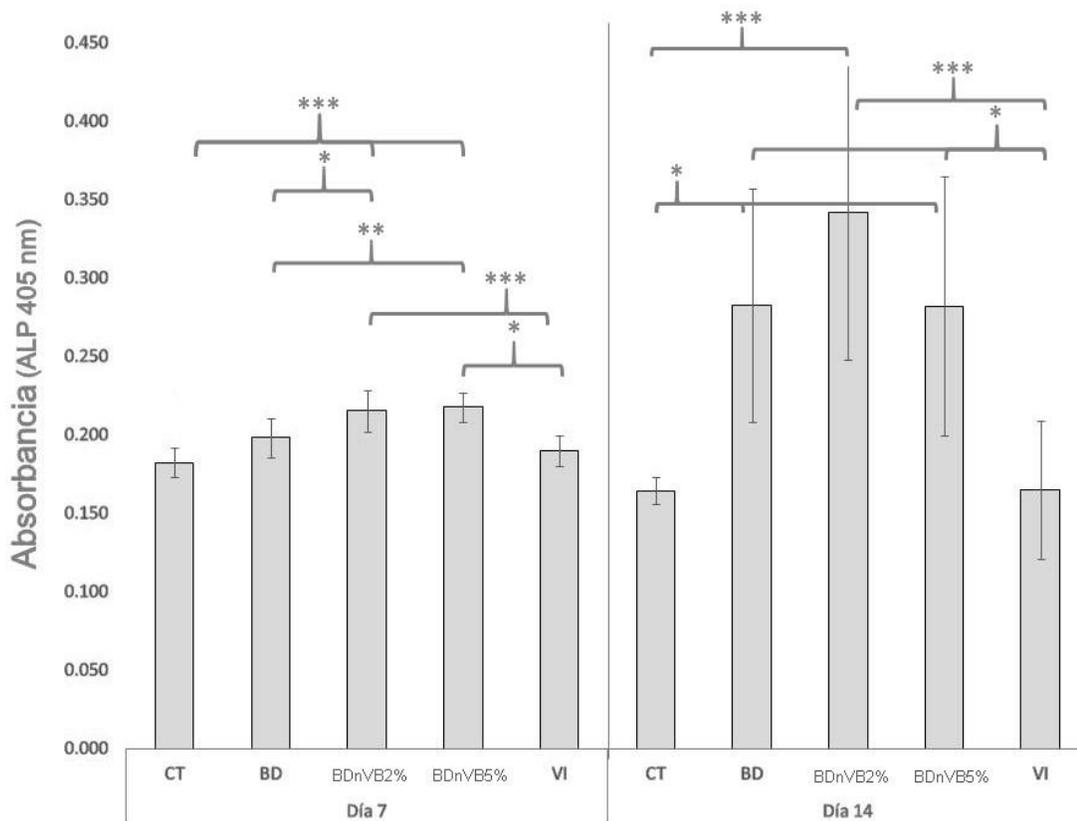


Figura 12. Actividad de enzima fosfatasa alcalina en DPSCs expuestos a BD, BDnVB2%, BDnVB5% y VI por 7 y 14 días. Los valores son promedios combinados de 2 experimentos ($n=4$ /por experimento), las barras verticales indican desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$) entre los grupos de acuerdo con ANOVA y test post hoc de Tukey.

Al evaluar la interacción de ambos factores hay diferencia en la actividad tanto entre los materiales, como en el tiempo ($p<0,05$), además de una interacción entre los factores ($p<0,05$), específicamente en los grupos BD y BDnVB2%, donde hay un aumento de los valores de actividad a lo largo del tiempo.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, la incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo a un cemento de silicato de calcio mejoró su capacidad de inducir diferenciación odontogénica, sin generar cambios significativos en la adhesión y viabilidad celular de DPSCs. Se utilizaron DPSCs para evaluar citocompatibilidad y bioactividad de los materiales nanocompuestos desarrollados, las cuales se utilizan ampliamente en estudios *in vitro* de evaluación de materiales dentales. Esto, debido a que su obtención no es invasiva (utilizando terceros molares semi-incluidos extraídos) y permiten recrear una aproximación de cómo se comportarán la células de la pulpa dental al entrar en contacto directo con el material dental y sus componentes (65). Una de las características relevantes de las DPSCs es su potencial de diferenciación, la cual puede ser en líneas celulares condrogénicas, adipogénicas y osteogénicas dependiendo del estímulo (66). Es esta capacidad de diferenciación la que le permite a la pulpa dental responder, depositando dentina ante noxas como el proceso de caries o el trauma dental. Sin embargo, para que esto ocurra la vitalidad de la pulpa dental, incluyendo la de sus células debe preservarse, por ello la importancia de evaluar citocompatibilidad en materiales para TPV (67).

La citocompatibilidad de los materiales nanocompuestos fue evaluada con microscopía electrónica de barrido y con test de viabilidad celular con MTS, con contacto directo de los materiales con el cultivo celular de DPSC, ya que es este tipo de relación el que se establece en TPV. Ambos análisis determinaron que la incorporación de nVB en concentraciones de 2 al 5% a BD no afectan la adhesión celular, ni viabilidad celular de DPSCs. A la fecha, no existen estudios publicados que comparen la citocompatibilidad de compuestos de nVB con BD. Sin embargo, la viabilidad de las DPSCs en contacto con nVB se ha estudiado incorporándolo a diferentes vehículos: adicionado a un hidrogel de alginato (68), en forma de nanofibras (69) y en andamios de quitosano (70) (69, 71). En estos estudios, de manera similar a lo observado en el presente trabajo, la presencia de nVB no afectó

la adhesión y proliferación de las células, presentando una citocompatibilidad similar a los controles sin VB.

En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se observó que las DPSCs se comportaron de manera similar al estar en contacto con los nanocompósitos (nVB/BD) y con BD. Las células estaban aplanadas, formando una capa bien organizada cubriendo la superficie, con múltiples prolongaciones entre las células y hacia la superficie de los materiales. Similar a lo observado en este estudio, Loison-Robert, Tassin observaron la superficie de BD irregular, cubierta con gránulos y pequeños cristales (72) sobre los cuales las DPSCs se encontraban estiradas, aplanadas y con múltiples prolongaciones citoplasmáticas, características que indican una adhesión efectiva (73). En contraste, la superficie del cemento de VI se observó lisa y resquebrajada, con las células poco adheridas y en forma aislada y con aspecto contraído (74).

En el presente estudio las DPSCs sembradas sobre los nanocompuestos, presentaron una viabilidad similar a las expuestas a BD, sin incorporación de vidrio bioactivo. Una reciente revisión concluyó que los cementos en base a silicato de calcio, incluyendo Biodentine y MTA, han demostrado una excelente biocompatibilidad en células madre de origen dentario (75). Por otro lado, VI es un material que es considerado citotóxico, esto se debe a la capacidad del material de actuar como un reservorio de flúor y liberar este al medio (76). La presencia de flúor en su superficie afecta la síntesis de proteínas y la actividad mitocondrial llevando las células a apoptosis (77). En estudios recientes en que se ha incorporado nVB a VI, las células presentaron mejor viabilidad y adhesión en las superficies del material con agregado de nVB (78) esto podría deberse a que la presencia de hidroxiapatita, por precipitado sobre nVB, tiene la capacidad de retener los iones de flúor y por lo tanto disminuir su citotoxicidad (79). En el presente trabajo, el cemento de vidrio ionómero fue utilizado como un material de referencia, el cual mostró diferencias con BD y los nanocompósitos con nVB, de menor viabilidad celular y adhesión de DPSCs.

En los análisis de actividad de la enzima fosfatasa alcalina, los nanocompósitos de BD y nVB presentaron una inducción temprana de la producción de ALP a los 7 días, estadísticamente mayor que el material sin nanopartícula, BD. Al día 14, los nanocompuestos y BD, presentan un aumento en la actividad de ALP en comparación al control y VI, sobre todo en la concentración del 2% (p/p) que presentó la mayor actividad, indicando que podría ser una concentración de uso óptima de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad celular y actividad ALP. Esto se puede explicar debido a la probada capacidad de nVB de inducir diferenciación osteogénica (80) y odontogénica (81). Se ha demostrado que iones solubles liberados por nVB promueven la viabilidad, producción de ALP y expresión de genes odontogénicos (ALP, RUNx2, OCN) (82). Esta rápida liberación de iones solubles, principalmente Si y Ca, da paso a una rápida nucleación y cristalización de un precipitado inicial de fosfato de calcio amorfo a una capa de hidroxiapatita policristalina (83). Las DPSCs comienzan la producción de ALP aproximadamente a los 7-9 días de estar en contacto o ante la presencia de hidroxiapatita (84). Además, se ha demostrado que la presencia de calcio en bajas concentraciones estimula la migración, proliferación y diferenciación de las DPSCs en líneas odontogénicas, esto se debe a la activación de receptores sensores de calcio acoplados a proteína G y la producción de ALP como consecuencia (85). El silicato, otro compuesto principal tanto de nVB como Biodentine[®], también tiene la capacidad de inducir la migración y diferenciación de las DPSCs, además de reducir la inflamación de estas (86, 87).

Si bien en las pruebas *in vitro* realizadas, los materiales nanocompósitos en base a BD con nVB han mostrado respuestas celulares favorables, son necesarios estudios adicionales que establezcan la seguridad del uso de este material para su aplicación *in vivo*. Los resultados de este estudio indican que el nanocompósito de BD/nVB podría ser un material promisorio para uso en terapias pulpares vitales, que podría suponer una mejora en la velocidad de formación de un puente dentinario y por tanto de la cicatrización y reparación de la pulpa ante una injuria pulpar.

CONCLUSIONES

La incorporación de nVB a la composición principal de Biodentine® no modifica las propiedades citocompatibles del material y proporciona una superficie en que las DPSCs se pueden adherir y proliferar.

La incorporación de nVB a Biodentine® aumenta la actividad de ALP en las DPSCs y, por lo tanto, la diferenciación de estas a un fenotipo mineralizante.

La incorporación de nVB a Biodentine® podría suponer una mejora en la velocidad de formación de un puente dentinario y por tanto la cicatrización y reparación de la pulpa ante una injuria pulpar, sin embargo, se requiere realizar más estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Material Tissue Interaction--From Toxicity to Tissue Regeneration. *Oper Dent*. 2016;41(2):117-31.
2. Schmalz G, Galler KM. Biocompatibility of biomaterials - Lessons learned and considerations for the design of novel materials. *Dent Mater*. 2017;33(4):382-93.
3. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. Guidelines for the Management of Traumatic Dental Injuries: 1. Fractures and Luxations of Permanent Teeth. *Pediatr Dent*. 2017;39(6):401-11.
4. da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TMD, Mesquita LC, Galarca AD, Silva AFD, et al. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(3):1358-68.
5. Rekow ED, Bayne SC, Carvalho RM, Steele JG. What constitutes an ideal dental restorative material? *Adv Dent Res*. 2013;25(1):18-23.
6. Simila HO, Karpukhina N, Hill RG. Bioactivity and fluoride release of strontium and fluoride modified Biodentine. *Dent Mater*. 2018;34(1):e1-e7.
7. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res*. 2012;91(5):454-9.
8. Jefferies S. Bioactive and biomimetic restorative materials: a comprehensive review. Part II. *J Esthet Restor Dent*. 2014;26(1):27-39.
9. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, et al. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:181945.
10. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol*. 2012;28(1):25-32.
11. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018;51(2):177-205.

12. Kaup M, Schafer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med.* 2015;11:16.
13. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(8):ZG01-ZG5.
14. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent.* 2014;42(4):490-7.
15. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossu M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015;13(1):43-60.
16. Corral Nunez C, Covarrubias C, Fernandez E, Oliveira OBJ. Enhanced bioactive properties of Biodentine™ modified with bioactive glass nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(2):177-85.
17. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):461-5.
18. Covarrubias C, Arroyo F, Balanda C, Neira M, Von Marttens A, Caviedes P, et al. The Effect of the Nanoscale Structure of Nanobioceramics on Their In Vitro Bioactivity and Cell Differentiation Properties. *Journal of Nanomaterials.* 2015;2015:14.
19. Andreasen JO, Lauridsen E, Christensen SS. Development of an interactive dental trauma guide. *Pediatr Dent.* 2009;31(2):133-6.
20. Castro Brezzo P, Dreyer Arroyo E. Prevalencia de traumatismos dentoalveolares en pacientes infantiles del complejo asistencial Dr. Sótero del Río. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral.* 2012;5:127-30.
21. Velásquez F, Mancilla C, Niño AY, Tirreau V, Cortés-Araya J, Rojas MC, et al. Patrones Epidemiológicos del Trauma Dentoalveolar (PatologíaGES) en

Pacientes Adultos Atendidos en un Centro de Trauma de Chile Durante 2 Períodos. *International journal of odontostomatology*. 2014;8:191-9.

22. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012;28(1):2-12.

23. Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iran Endod J*. 2014;9(1):15-22.

24. Akhlaghi N, Khademi A. Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015;12(5):406-17.

25. Bjorndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF. Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J*. 2019;52(7):949-73.

26. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):137-47.

27. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater*. 1994;16(1):21-60.

28. Jiang RD, Lin H, Zheng G, Zhang XM, Du Q, Yang M. In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *J Dent*. 2017;58:28-33.

29. Wu T, Xu C, Du R, Wen Y, Chang J, Huan Z, et al. Effects of silicate-based composite material on the proliferation and mineralization behaviors of human dental pulp cells: An in vitro assessment. *Dent Mater J*. 2018.

30. Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Martens L, De Coster P. Gene Expression Profiling and Molecular Signaling of Dental Pulp Cells in Response to Tricalcium Silicate Cements: A Systematic Review. *J Endod*. 2015;41(11):1805-17.

31. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, et al. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod*. 2014;40(8):1217-22.

32. Daltoe MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2016;42(4):596-603.
33. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2015;66(3):181-8.
34. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):544-54.
35. Cai S, Zhang W, Tribble G, Chen W. Reactions of human dental pulp cells to capping agents in the presence or absence of bacterial exposure. *J Oral Sci.* 2017;59(4):621-7.
36. Sakai VT, Moretti AB, Oliveira TM, Fornetti AP, Santos CF, Machado MA, et al. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. *Br Dent J.* 2009;207(3):E5; discussion 128-9.
37. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015;31(4):351-70.
38. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303.
39. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27.
40. Altan H, Tosun G. The setting mechanism of mineral trioxide aggregate. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2016;50(1):65-72.
41. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate--a review. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;34(1):1-7.
42. Espir CG, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Chavez-Andrade GM, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Solubility and bacterial sealing ability of MTA and root-end filling materials. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(2):121-5.
43. Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and Treatment perspectives. *Pediatr Dent.* 2008;30(3):211-9.

44. Coll JA, Seale NS, Vargas K, Marghalani AA, Al Shamali S, Graham L. Primary Tooth Vital Pulp Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Dent.* 2017;39(1):16-123.
45. Zhu C, Ju B, Ni R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):17055-60.
46. Paula A, Carrilho E, Laranjo M, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Botelho MF, et al. Direct Pulp Capping: Which is the Most Effective Biomaterial? A Retrospective Clinical Study. *Materials (Basel).* 2019;12(20).
47. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod.* 2015;41(9):1412-7.
48. Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int.* 2014;2014:160951.
49. Bachoo IK, Seymour D, Brunton P. A biocompatible and bioactive replacement for dentine: is this a reality? The properties and uses of a novel calcium-based cement. *Br Dent J.* 2013;214(2):E5.
50. Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent.* 2017;8(2).
51. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J.* 2011;44(12):1081-7.
52. Zakerzadeh A, Esnaashari E, Dadfar S. In Vitro Comparison of Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Vital Pulp Capping Materials. *Iran Endod J.* 2017;12(4):419-25.
53. Escobar-Garcia DM, Aguirre-Lopez E, Mendez-Gonzalez V, Pozos-Guillen A. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine) Used as Root-End Filling Materials. *Biomed Res Int.* 2016;2016:7926961.

54. Margunato S, Tasli PN, Aydin S, Karapinar Kazandag M, Sahin F. In Vitro Evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on Human Alveolar Bone Marrow Stem Cells in Terms of Biocompatibility and Mineralization. *J Endod.* 2015;41(10):1646-52.
55. Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Alvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J.* 2017;50 Suppl 2:e19-e30.
56. Jefferies SR. Bioactive and biomimetic restorative materials: a comprehensive review. Part I. *J Esthet Restor Dent.* 2014;26(1):14-26.
57. Brauer DS. Bioactive glasses-structure and properties. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(14):4160-81.
58. Hench LL. The future of bioactive ceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(2):86.
59. Hench LL. Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. *New Journal of Glass and Ceramics.* 2013;3(2):6.
60. Skallevoid HE, Rokaya D, Khurshid Z, Zafar MS. Bioactive Glass Applications in Dentistry. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
61. Zhong Y, Liu J, Li X, Yin W, He T, Hu D, et al. Effect of a novel bioactive glass-ceramic on dentinal tubule occlusion: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2015;60(1):96-103.
62. Long Y, Liu S, Zhu L, Liang Q, Chen X, Dong Y. Evaluation of Pulp Response to Novel Bioactive Glass Pulp Capping Materials. *J Endod.* 2017;43(10):1647-50.
63. Gjorgievska ES, Nicholson JW, Apostolska SM, Coleman NJ, Booth SE, Slipper IJ, et al. Interfacial properties of three different bioactive dentine substitutes. *Microsc Microanal.* 2013;19(6):1450-7.
64. Fernando D, Attik N, Pradelle-Plasse N, Jackson P, Grosogeat B, Colon P. Bioactive glass for dentin remineralization: A systematic review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;76:1369-77.
65. Morsczeck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(2):187-96.

66. Trivedi S, Srivastava K, Saluja TS, Shyam H, Kumar S, Singh A, et al. Hydroxyapatite-collagen augments osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Odontology*. 2019.
67. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018;51(8):829-46.
68. Sevari SP, Shahnazi F, Chen C, Mitchell JC, Ansari S, Moshaverinia A. Bioactive glass-containing hydrogel delivery system for osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2019.
69. Kim GH, Park YD, Lee SY, El-Fiqi A, Kim JJ, Lee EJ, et al. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *J Biomater Appl*. 2015;29(6):854-66.
70. Zhu N, Chatzistavrou X, Ge L, Qin M, Papagerakis P, Wang Y. Biological properties of modified bioactive glass on dental pulp cells. *J Dent*. 2019;83:18-26.
71. Bae WJ, Min KS, Kim JJ, Kim JJ, Kim HW, Kim EC. Odontogenic responses of human dental pulp cells to collagen/nanobioactive glass nanocomposites. *Dent Mater*. 2012;28(12):1271-9.
72. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, et al. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190014.
73. Athanasiadou E, Paschalidou M, Theocharidou A, Kontoudakis N, Arapostathis K, Bakopoulou A. Biological interactions of a calcium silicate based cement (Biodentine) with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. *Dent Mater*. 2018;34(12):1797-813.
74. Corral Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*. 2014;40(3):406-11.
75. Emara R, Elhennawy K, Schwendicke F. Effects of calcium silicate cements on dental pulp cells: A systematic review. *J Dent*. 2018.

76. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem*. 2012;8(1):40-5.
77. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(2):230-4.
78. Valanezhad A, Odatsu T, Udoh K, Shiraishi T, Sawase T, Watanabe I. Modification of resin modified glass ionomer cement by addition of bioactive glass nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(1):3.
79. Del Angel-Mosqueda C, Hernandez-Delgadillo R, Rodriguez-Luis OE, Ramirez-Rodriguez MT, Munguia-Moreno S, Zavala-Alonso NV, et al. Hydroxyapatite decreases cytotoxicity of a glass ionomer cement by calcium fluoride uptake in vitro. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2018;16(1):42-6.
80. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967-78.
81. Wang S, Gao X, Gong W, Zhang Z, Chen X, Dong Y. Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2792-803.
82. Moonesi Rad R, Atila D, Akgun EE, Evis Z, Keskin D, Tezcaner A. Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;100:928-48.
83. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2004;15(4):543-62.
84. Gu Y, Bai Y, Zhang D. Osteogenic stimulation of human dental pulp stem cells with a novel gelatin-hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(7):1851-61.
85. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(3):789-95.

86. Gotz W, Tobiasch E, Witzleben S, Schulze M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics*. 2019;11(3).
87. Liu CH, Hung CJ, Huang TH, Lin CC, Kao CT, Shie MY. Odontogenic differentiation of human dental pulp cells by calcium silicate materials stimulating via FGFR/ERK signaling pathway. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;43:359-66.

Anexos.

Anexo n.1. Síntesis de nVB (nanopartículas de vidrio bioactivo)

Reactivos:

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
- Etanol 95%
- TEOS (tetra etil orto silicato)
- Ácido cítrico
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- amoniaco concentrado
- Agua destilada

Procedimiento:

1. Se prepararon tres soluciones:
 - 1.1. Solución A: Se disolvieron 8.32 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ en 120 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml, se dejaron en agitación con una barra magnética hasta que se disolvió todo el sólido.
 - 1.2. Solución B: Se hidrolizaron 9.7 ml de TEOS en 60 ml de Alcohol 96% y se agregó solución de ácido cítrico concentrado hasta estabilizar el pH a 2 en un vaso precipitado de 100 mL.
 - 1.3. Solución C: Se disolvieron 0,25 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en 1200 ml de agua destilada.
2. Se agregó la solución B sobre la solución A y se mantuvo el pH 2 con ácido cítrico concentrado.
3. Se agregó por goteo la mezcla de las soluciones A y B sobre la solución C, manteniendo siempre el pH en 10 con amoniaco concentrado usando barra magnética para mantener la agitación constante en la solución.
4. Se dejó la solución final en un baño de aceite de silicona a 40°C durante 48 hrs, luego se detuvo la agitación y se dejó sedimentar por 48 hrs.

5. Se centrifugó y re dispersó la suspensión con agua destilada mediante 3 ciclos a 12000 rpm para separar y purificar, se recuperó y traspasó el gel de los tubos de centrifugado a un tubo Falcon.
6. El tubo Falcon fue tapado con parafilm en el congelador a -80 °C y luego liofilizado.
7. La muestra en polvo liofilizada fue traspasada a un crisol de porcelana y llevada al horno mufla para calcinar a 700°C por 3hrs a velocidad de calentado de 10°/min
8. Al estar fría la muestra esta fue traspasada a un vial rotulado con el nombre y fecha de término de la síntesis.
9. El polvo obtenido debe ser de fino y de un color blanco.

Anexo n.2 Protocolo de aislamiento de Células Madre de Pulpa Dental

El momento de la aislación debe ser lo más cercano posible a la extracción del diente, esto es muy importante. Debe ser el mismo día.

Antes de iniciar el procedimiento, se pesan las enzimas: usamos 1.5 mg de Colagenasa I y 2mg de Dispasa II por cada diente a tratar.

- 1) Los dientes se mantuvieron y transportaron en medio de cultivo alfa-mem 90% suplementado con SFB 10% + 100 ug/mL de penicilina/estreptomicina 1% + 0,25 ug/mL de anfotericina B 1%. La solución se encontraba a 4°C. Se usó un frasco por cada paciente.
- 2) Se dispuso de tres tubos eppendorf de 2 mL. El primer tubo vacío recibió el tejido pulpar fragmentado (ver paso 6). El segundo tubo vacío recibió 500 uL de solución de 90% alfa-mem + 10% SFB con una concentración de 3mg/mL de Colagenasa I, y el tercer tubo vacío recibió 500 uL de solución de 90% alfa-mem + 10% SFB, con una concentración de 4mg/mL de Dispasa II.
- 3) Los dientes extraídos se limpiaron con gasa y alcohol 70°.
- 4) Se eliminó el ligamento periodontal con hoja de bisturí n° 15.
- 5) Los molares fueron seccionados horizontalmente a nivel de límite amelodentinario con motor eléctrico y discos carburundum desechables (evitar que disco toque el tejido pulpar) bajo irrigación constante con suero fisiológico estéril.
- 6) La pulpa dental se extrajo con pinza estéril y fue depositada en el tubo eppendorf estéril vacío.

7) El tejido pulpar se cortó en fragmentos pequeños (con tijera u hoja de bisturí estéril).

8) La solución del segundo y tercer tubo, ya dispuestos con las enzimas, se llevaron al primer tubo resuspendiendo suavemente.

*Recordar que las enzimas están en una concentración de 3 mg/ml (Colagenasa I) y 4 mg/ml (Dispasa II). Por lo tanto, usamos 500 ul de solución de cada enzima por cada diente a tratar. Total en cada tubo con tejido pulpar: 1000 ul.

9) El tubo eppendorf con las enzimas y tejido pulpar se posicionaron en la bandeja del Roller (o incubadora) y se mantuvieron en agitación por una hora a 37°C. Como alternativa a esto se puede hacer agitación manual cada 20 minutos.

10) Se prepararon 2 mL de 90% D-mem + 10% en un tubo falcon de 15 ml (por cada tubo eppendorf en proceso de digestión).

11) En cada tubo falcon de 15 mL preparado, se diluyó la solución de cada eppendorf en digestión, resuspendiendo suavemente.

12) Se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos. Resuspender.

13) Se centrifugaron nuevamente, esta vez a 1200 rpm por 7 minutos.

14) Se eliminó el medio por volteo.

15) Se sembraron en placas de 35 mm, 80% alfa-mem + 20% suero + 1% antibiótico (+ 100 ug/mL de penicilina/estreptomicina).

16) La incubación de las células se realizó por tres días. El medio se cambió cada 2-3 días y la placa según porcentaje de confluencia.