

MARC
67062
R 17439

T
V422c
2015



**Universidad
de Valparaíso**
CHILE
Escuela de Odontología

**COMPARACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Y
MOXIFLOXACINO EN CÉLULAS MADRE DE LA PAPILA APICAL DE
DIENTES PERMANENTES INMADUROS ESTUDIO IN VITRO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumna: Alexandra Vega Cáceres

Docente Guía: Prof. Dra. Alicia Caro Molina
Cátedra de Endodoncia

Valparaíso - Chile
2015

Dedicatoria

A mis padres, Sandra y Alexis.
A mi hermano, Diego.
A mi compañero de vida, Rodrigo.
A mi familia.
A Héctor y Norma.

Agradecimientos

A la Dra. Caroline Weinstein Oppenheimer por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar esta gran investigación, sin su apoyo esta tesis no podría haber sido realizada.

A Mauricio Reyna Jeldes por su paciencia y ayuda, por entregar sin recelo sus conocimientos y técnicas. Gracias por permitirme realizar este trabajo y conocer el maravilloso mundo de la investigación celular.

Al Dr. Carlos Henríquez Roldán por su invaluable apoyo en el análisis estadístico. Gracias por dedicar tiempo de su ajetreada agenda para realizar una de las partes más complejas de este trabajo.

A Miguel, Maily, Nicole, Rocío, Sara y Chistopher por su acogida, apoyo y gran ayuda. Gracias por los buenos momentos.

A Verito y Marco, gracias por tanto durante todos estos años. Son lo mejor de la U.

A Rodrigo y mi familia, en especial a mi madre, por su entrega y apoyo incondicional. Este logro no lo hubiese conseguido sin ustedes, son el pilar fundamental de mi vida.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
1. ANATOMIA DENTARIA	2
2. FUNCIONES DE LA PULPA	4
3. FACTORES ETIOLÓGICOS DE ALTERACIONES PULPARES	5
4. CLASIFICACIÓN DE LOS TRASTORNOS PULPARES	5
5. ENDODONCIA	6
6. INGENIERÍA TISULAR	8
ENDODONCIA REGENERATIVA (REVASCULARIZACIÓN)	9
PROTOCOLO CLINICO DE REVASCULARIZACIÓN	14
ANTIBIOTERAPIA EN ENDODONCIA REGENERATIVA.....	16
OTRAS ALTERNATIVAS ANTIBIÓTICAS EN REVASCULARIZACIÓN	17
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i>	20
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. DISEÑO DE ESTUDIO	23
2. UNIVERSO	23
3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	23
4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	23
5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	23
6. VARIABLES.....	24
7. UNIDAD DE ESTUDIO	24
8. CALIBRACIÓN	24
IV. DESARROLLO DEL ESTUDIO	25
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS	29
VI. DISCUSIÓN	40
VII. LIMITACIONES Y SUGERENCIAS	42
VIII. CONCLUSIONES	43
IX. RESUMEN	44
X. BIBLIOGRAFIA	45
XI. ANEXOS	1

I. INTRODUCCIÓN

En endodoncia, el tratamiento de la necrosis pulpar siempre ha sido un desafío, especialmente cuando se trata de dientes permanentes inmaduros donde debido a su incompleta formación radicular, un tratamiento conservador es poco viable ya que las probabilidades de fractura son altas y no se cuenta con paredes radiculares suficientes contra las que se pueda condensar el material de relleno endodóntico.

Las primeras alternativas terapéuticas consistían en rellenar los conductos radiculares con hidróxido de calcio para inducir la formación de una barrera calcificada apical que permitiera el cierre de la raíz dentaria y poder de esta manera sellar el sistema de conductos radiculares con un material de obturación, procedimiento llamado apexificación. Lamentablemente, es prolongado el tiempo requerido para la inducción y la recontaminación del conducto radicular se dio en múltiples casos debido a la infiltración de la restauración temporal del diente.

Posteriormente se propuso la utilización de agregado de trióxido mineral (MTA) como barrera apical, otorgando un resultado más rápido pero que no soluciona la problemática derivada del incompleto desarrollo radicular.

Las estrategias terapéuticas más recientes apuntan a utilizar ingeniería de tejidos, mediante un procedimiento denominado revascularización. Se compone de tres elementos: células madre, factores de crecimiento y matriz de andamiaje.

El éxito de esta terapia depende considerablemente de la correcta desinfección del sistema de conductos radiculares en su etapa inicial. Con este fin, se introdujo una triple pasta antibiótica (TAP) formada por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina en proporción 1:1:1⁽¹⁾⁽²⁾ desafortunadamente, su uso tuvo como consecuencia decoloración dentaria debido a la minociclina⁽¹⁾. Se propuso entonces, la utilización de una bipasta antibiótica (DAP) sin la minociclina⁽²⁾ o una triple pasta antibiótica modificada (mTAP) compuesta por Ciprofloxacino, Metronidazol y Cefaclor.

Sin embargo, se ha reportado citotoxicidad –efecto nocivo sobre células madre mediadoras de la regeneración- y posible resistencia bacteriana de estos antibióticos^{(3) (4) (5) (6)}, lo que motiva la búsqueda de nuevas alternativas para medicación intraconducto en terapia de revascularización.

Adquiere relevancia por su amplio espectro y su acción sobre bacterias resistentes, el moxifloxacino. Una 8-metoxiquinolona que ha demostrado muy buena acción sobre infecciones persistentes.⁽⁷⁾

Recientemente, Kenneth Hargreaves⁽⁸⁾ y la Asociación Americana de Endodoncia (AAE)⁽⁹⁾ considerando los efectos secundarios de los antibióticos utilizados actualmente han propuesto el hidróxido de calcio, una base alcalina ampliamente utilizada en endodoncia, como medicación intraconducto para procedimientos de endodoncia regenerativa.

El presente trabajo de investigación tiene como propósito comparar *in vitro* la citotoxicidad de Hidróxido de calcio y Moxifloxacino en células madre de la papila apical de dientes permanentes inmaduros, con la finalidad de buscar nuevas alternativas para medicación intraconducto en protocolos de revascularización.

II. MARCO TEÓRICO

1. ANATOMIA DENTARIA

Desde el punto de vista anatómico, el diente se compone de cuatro tejidos: esmalte, dentina y cemento, en orden decreciente de dureza, y un tejido blando, la pulpa dentaria. (Fig.1)

ESMALTE

También denominada sustancia adamantina, es una matriz extracelular altamente mineralizada de escaso metabolismo, que se forma por síntesis y secreción de unas células llamadas ameloblastos, que desaparecen cuando el diente hace su erupción en la cavidad bucal. Consta de un 95% de materia inorgánica y está constituido fundamentalmente por cristales de hidroxiapatita. Estos cristales son más grandes que los de otros tejidos mineralizados del organismo; se organizan formando los prismas, que representan la unidad estructural básica. ⁽¹⁰⁾

DENTINA

Tejido mineralizado con un 70% de materia inorgánica, a diferencia del esmalte, es metabólicamente activo, permitiendo que se forme tejido dentinario durante toda la vida y que pueda repararse ante algún daño (dentina reparativa) Constituida fundamentalmente por fibras colágenas y sustancia amorfa, corresponde al eje estructural del diente, su origen es ectomesenquimático, está cubierta en la zona coronaria por esmalte, mientras que la dentina radicular se encuentra protegida por cemento. Se van a constituir distintos tipos de dentina, según el momento en que ésta se forma y la disposición que adquieran sus fibras. ⁽¹¹⁾

CEMENTO

Tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares. Si bien tiene muchos rasgos en común con el tejido óseo, el cemento no encierra vasos, no posee inervación, no experimenta resorción ni remodelación fisiológica pero se caracteriza por estar depositándose durante toda la vida. ⁽¹²⁾

PULPA

Es parte del complejo dentino-pulpar, siendo el único tejido blando del diente, el cual se caracteriza por ser de tipo conectivo especial laxo, ubicado en la cavidad pulpar. Dicho tejido está ricamente vascularizado e inervado y se encuentra conformado por distintos tipos de células, dentro de las cuales la más importante o principal es el odontoblasto, que se ubica en la periferia del tejido conectivo, es el responsable de formar dentina primaria y secundaria, y a su vez de reparar la dentina formando dentina terciaria. ⁽¹²⁾

El espacio pulpar se divide en dos regiones: coronal y radicular. En general, la forma y el tamaño del espacio pulpar dependen de la forma y el tamaño de la superficie dental. La pulpa coronal se subdivide en el asta o las astas pulpares y la cámara pulpar (Fig 2). Las astas pulpares se prolongan desde la cámara hasta la región cuspídea. En los dientes jóvenes, las astas son muy extensas y pueden quedar expuestas de manera inadvertida durante la preparación rutinaria de una cavidad. Debido a la producción ininterrumpida (aunque más lenta) de dentina, el espacio pulpar se va reduciendo asimétricamente una vez que se completa la elongación radicular.

La anatomía del conducto radicular varía de unos dientes a otros y también dentro de un mismo tipo de diente. Aunque en cada raíz debe existir por lo menos un conducto, algunas raíces poseen varios de diferentes tamaños. La parte más estrecha del conducto recibe el nombre de constricción apical. Sin embargo, en la práctica clínica no se identifica esta constricción en todos los dientes ⁽¹³⁾.

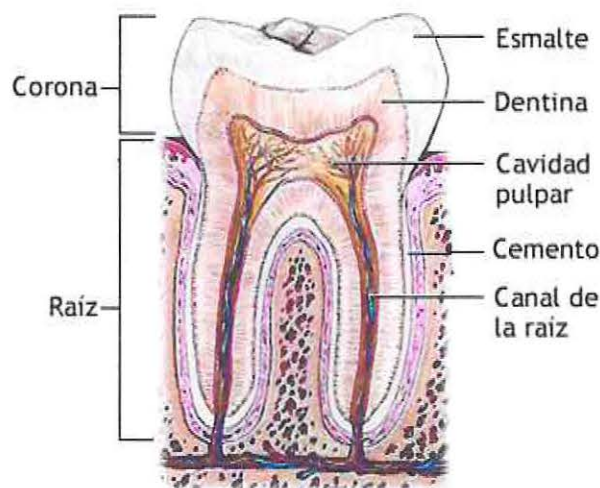


Figura 1: Anatomía dentaria. A.D.A.M.S. ⁽⁵⁰⁾

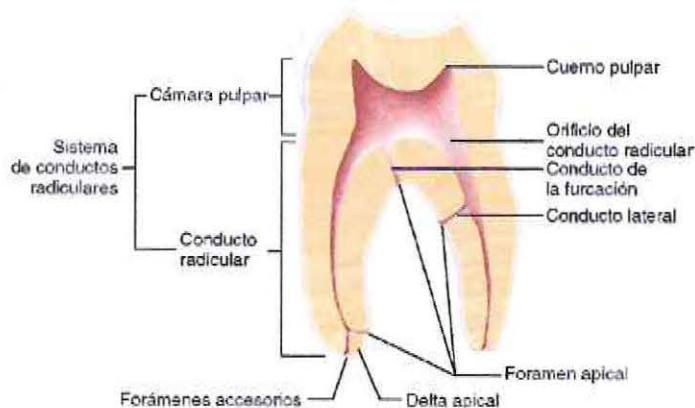


Figura 2: Principales componentes anatómicos del sistema de conductos radiculares. Cohen ⁽⁵¹⁾

2. FUNCIONES DE LA PULPA

La pulpa cumple 5 funciones, algunas formativas y otras de soporte.

INDUCCIÓN

La pulpa interviene en el inicio y el desarrollo de la dentina. Cuando se ha formado la dentina, colabora con la formación del esmalte. Estos procesos son interdependientes: el epitelio del esmalte induce la diferenciación de los odontoblastos, y los odontoblastos y la dentina inducen la formación del esmalte. Estas interacciones entre epitelio y mesénquima constituyen los procesos fundamentales de la formación de los dientes. ⁽¹³⁾

FORMACIÓN

Los odontoblastos forman dentina. Estas células superespecializadas intervienen en la formación de la dentina de tres modos:

1. Sintetizando y secretando la matriz inorgánica;
2. Transportando inicialmente los componentes inorgánicos a la matriz recién formada.
3. Creando condiciones que permitan la mineralización de la matriz. ⁽¹³⁾

NUTRICIÓN

La pulpa aporta nutrientes esenciales para formar la dentina y mantener la integridad de la propia pulpa ⁽¹³⁾.

DEFENSA

En el diente maduro, los odontoblastos producen dentina en respuesta a las lesiones, especialmente cuando el espesor de la dentina original disminuye a causa de la caries, la atrición, los traumatismos o los tratamientos restauradores. También puede producirse dentina en aquellas zonas en la que ha perdido su continuidad, como en una zona de exposición pulpar. En estos casos, la nueva dentina se forma gracias a la inducción, la diferenciación y migración de nuevos odontoblastos a la zona expuesta. ⁽¹³⁾

SENSIBILIDAD

Los nervios pulpaes pueden responder a los estímulos que actúan directamente sobre el propio tejido, o que llegan al mismo a través del esmalte y la dentina. La estimulación de los nervios sensitivos mielinizados de la pulpa provoca un dolor inmediato y agudo. La activación de las fibras dolorosas amielínicas da lugar a un dolor más lento y amortiguado. ⁽¹³⁾

3. FACTORES ETIOLÓGICOS DE ALTERACIONES PULPARES

La irritación de los tejidos pulpaes o perirradiculares puede dar lugar a inflamación. Los principales factores son:

IRRITANTES MICROBIANOS

Los microorganismos presentes en la caries dental constituyen la principal fuente de irritación de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares. En respuesta a la presencia de los microorganismos y sus subproductos en la dentina, se produce una infiltración local de la pulpa, fundamentalmente por células inflamatorias crónicas como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Cuando la caries avanza hacia la pulpa, cambian la intensidad y características del infiltrado ⁽¹³⁾.

IRRITANTES MECÁNICOS

Aparte de la irritación bacteriana, los tejidos pulpaes o perirradiculares pueden irritarse también por causas mecánicas. Los principales irritantes térmicos y físicos del tejido pulpar son las preparaciones cavitarias profundas, la supresión de estructura dental sin una refrigeración adecuada, el raspado periodontal profundo y el movimiento ortodóncico de los dientes.

Las lesiones por impacto, con o sin fractura coronal, pueden también dañar la pulpa. ⁽¹³⁾

IRRITANTES QUÍMICOS

Entre las sustancias químicas que pueden irritar la pulpa cabe destacar distintos productos para limpiar, esterilizar y desensibilizar la dentina, y algunas sustancias que contienen los materiales para restauraciones provisionales y permanentes. ⁽¹³⁾

4. CLASIFICACIÓN DE LOS TRASTORNOS PULPARES

PULPA NORMAL

Un diente con pulpa normal no manifiesta ningún síntoma clínico y responde normalmente a las pruebas de vitalidad. Además, no muestra signos radiográficos de patosis. ⁽¹³⁾

PULPITIS REVERSIBLE

Alteración clínica que produce signos subjetivos e indicativos de la presencia de una inflamación leve del tejido pulpar. Si se elimina la causa, la inflamación remite y la pulpa vuelve a su estado normal. ⁽¹³⁾

PULPITIS IRREVERSIBLE

Alteración clínica que se acompaña de signos objetivos y subjetivos que indican la presencia de una inflamación grave del tejido pulpar. Suele ser una secuela y una consecuencia de la progresión de una pulpitis reversible. La pulpitis irreversible puede ser sintomática o asintomática, la inflamación pulpar no remite aunque se suprima la causa. ⁽¹³⁾

NECROSIS PULPAR

Trastorno clínico que se acompaña de manifestaciones subjetivas y objetivas que indican la muerte de la pulpa dental. Cese de los procesos metabólicos. ⁽¹³⁾

5. ENDODONCIA

La endodoncia es ciencia y arte, comprende la etiología, prevención, diagnóstico y tratamiento de las alteraciones patológicas de la pulpa dentaria y sus repercusiones en la región periapical.

En resumen, es la especialidad que atiende la prevención y el tratamiento del endodonto y de la región apical y periapical. El endodonto comprende la dentina, la cavidad pulpar y la pulpa, mientras que la región apical y periapical comprende los tejidos de sustentación del diente, que incluyen y rodean el apice radicular. ⁽¹⁴⁾

A. TRATAMIENTO PULPAR DE DIENTES PERMANENTES MADUROS

Pulpa vital con inflamación reversible.

1. Recubrimiento pulpar indirecto.

Consiste en la aplicación de un material odontológico, como hidróxido de calcio, sobre un tabique fino de dentina remanente para facilitar la formación de dentina reparadora y en mantenimiento de una pulpa vital. ⁽¹³⁾

2. Recubrimiento pulpar directo o capping.

Consiste en la aplicación de un material odontológico directamente sobre una exposición mecánica o traumática de la pulpa vital. ⁽¹³⁾

3. Pulpotomía.

Supresión quirúrgica de una pequeña parte afectada de pulpa vital con el objeto de preservar el resto de la pulpa coronal y radicular. ⁽¹³⁾

Pulpa con inflamación irreversible o necrosis.

1. Biopulpectomía

Remoción quirúrgica de la pulpa cameral y radicular de un diente, debido a que se encuentra en un estado inflamatorio irreversible.

2. Necropulpectomía

Remoción quirúrgica de la pulpa cameral y radicular de un diente, debido a que se encuentra con muerte celular patológica, cese de procesos metabólicos.

B. TRATAMIENTO PULPAR DE DIENTES PERMANENTES INMADUROS

La afectación pulpar en dientes permanentes inmaduros, requiere especial cuidado. Al no tener una raíz completamente desarrollada, el enfoque terapéutico en estos casos está orientado a lograr la continuidad del desarrollo de la raíz, hasta obtener una longitud y grosor de paredes adecuado o lo más cercano posible al ideal de desarrollo esperado.⁽¹³⁾

Tratamientos en casos de pulpa vital.

· Apexogénesis

Consiste en una técnica de tratamiento de la pulpa vital para estimular el desarrollo fisiológico continuado y la formación del extremo radicular, con el objeto de mantener la vitalidad de la pulpa radicular. Por consiguiente, la pulpa debe ser vital y capaz de autorrepararse, como sucede cuando un diente inmaduro sufre una pequeña exposición coronal tras un traumatismo. Se debe eliminar el tejido pulpar inflamado y conservar el resto de la pulpa, luego se recubre la pulpa remanente con hidróxido de calcio de fraguado rápido o agregado de trióxido mineral (MTA). Cuando el resultado es plenamente satisfactorio, la apexogénesis permite el crecimiento apical continuado de la raíz con un ápice normal.⁽¹³⁾

Tratamientos en casos de pulpa necrótica.

· Apexificación

La apexificación se define como el proceso de crear posteriormente a la muerte pulpar, un ambiente en el sistema de conductos radiculares y los tejidos periapicales que permita la formación de una barrera calcificada en los ápices abiertos de las raíces inmaduras⁽¹⁵⁾.

La técnica de apexificación que tradicionalmente más se empleaba eran los recambios de pasta de hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$ por un periodo de tiempo de entre 6 a 24 meses. No obstante, esta técnica presentó diversas desventajas:

- La impredecible formación del nuevo tejido duro apical.
- Posible re-contaminación bacteriana.
- Dificultad en lograr el seguimiento de los casos.
- Nulo incremento tanto en grosor como en longitud de las paredes del conducto radicular.
- Debilitamiento de la estructura radicular por el uso prolongado de pasta de hidróxido de calcio [Ca(OH)₂].
- Extenso periodo de tiempo necesario para concluir el tratamiento. ⁽¹⁶⁾

Ante estas situaciones adversas, hubo necesidad de buscar otra alternativa de tratamiento para este tipo de casos. En 1999, Shabahang y cols. mostraron que con el uso de agregado de trióxido mineral (MTA) como barrera apical artificial en los casos de apexificación, es posible obtener una contención muy consistente en un modelo realizado *in vivo* en perros. Esta técnica evolucionó y tuvo tal aceptación, que en el Segundo Simposio del *Manejo Contemporáneo de Lesiones Traumáticas de la Dentición Permanente*, llevado a cabo en noviembre de 2012 en colaboración conjunta entre la Asociación Americana de Endodoncia y la Academia Americana de Odontología Pediátrica, se estableció que la barrera apical con MTA constituye la mejor opción de tratamiento para los casos de apexificación. ⁽¹⁶⁾

Sin embargo, la apexificación puede fracasar durante el tratamiento siendo la causa más frecuente la contaminación bacteriana, que se debe habitualmente a la pérdida de la restauración coronal o a un desbridamiento incorrecto del conducto ⁽¹³⁾. O incluso después del procedimiento, debido a que estos dientes tienen un elevado riesgo de fractura cervical posterior ⁽¹⁷⁾. Esto se traduce en un problema de restauración ya que los implantes están generalmente contraindicados en pacientes jóvenes con un esqueleto craneofacial en desarrollo ⁽⁹⁾.

Por ende un enfoque alternativo es el de proporcionar un tratamiento en condiciones donde se promueva la formación continua de dentina ⁽¹⁸⁾.

6. INGENIERÍA TISULAR

Es la ciencia que se dedica al diseño y la elaboración de tejidos nuevos para reemplazar los tejidos perdidos a causa de enfermedades o traumatismo ⁽¹³⁾.

Comprende tres elementos esenciales:

- Células madre / progenitoras
- Factores de crecimiento (morfogénesis).
- Matriz de andamiaje

CÉLULAS MADRE

Las fuentes de células utilizadas para la ingeniería de tejidos incluyen:

- Células autólogas: del mismo paciente, son la fuente ideal.

- Células alogénicas: de un donante humano que no es inmunológicamente idéntico al paciente.
- Células xenogénicas: de una especie diferente.

Las células madre se definen como una célula que tiene la capacidad de dividirse de forma continua y producir células descendientes que se diferencian en varios otros tipos de células o tejido ⁽¹⁹⁾.

Se subdividen en:

- Totipotentes (cada célula puede convertirse en un nuevo individuo).
- Pluripotentes (puede formar cualquier tipo de células).
- Multipotentes (puede formar otros tejidos).

Las características más importantes de las células madre son las propiedades de auto-renovación, que es la capacidad de proliferar en un estado indiferenciado pero pluripotentes y la plasticidad, capacidad de una célula madre para producir células de diferentes tejidos ⁽¹⁹⁾.

Actualmente, se ha prestado mucha atención a las células madre post-natales (adulto). Son células no diferenciadas que derivan del tejido en que residen, son multipotentes, poseen plasticidad, pero sólo pueden formar tejidos específicos limitados ⁽¹⁹⁾.

FACTORES DE CRECIMIENTO (MORFÓGENOS)

Corresponden a proteínas que se unen a los receptores celulares con el fin de inducir proliferación y/o diferenciación. Muchos de estos factores son capaces de estimular división celular de numerosos tipos celulares, mientras otros son célula-específico.

MATRIZ DE ANDAMIAJE

Son estructuras degradables, porosas, fabricadas tanto con materiales naturales, polímeros sintéticos o materiales cerámicos.

Proveen un microambiente 3D para la migración, adhesión y diferenciación celular. Están destinados a degradarse lentamente después de la implantación y ser reemplazados por tejido nuevo ⁽¹⁹⁾.

ENDODONCIA REGENERATIVA (REVASCULARIZACIÓN)

Los procedimientos regenerativos en endodoncia pueden ser definidos como procedimientos biológicamente diseñados para reemplazar estructuras dañadas del diente (dentina y raíz) y células del complejo dentino-pulpar ⁽¹⁹⁾.

La revascularización es un tratamiento regenerativo alternativo, basado en tratar dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica por caries o por trauma, que

permite el desarrollo radicular y la deposición de tejido duro. Se basa en el concepto de que las células madre vitales que pueden sobrevivir a la necrosis pulpar son capaces de diferenciarse en odontoblastos secundarios y contribuir a la conformación del tejido radicular ⁽²⁰⁾.

CÉLULAS MADRE

En los dientes y sus tejidos vecinos podemos encontrar células madres autólogas (Fig. 3-4.):

- Células madre de la pulpa dental (DPSC)
- Células madre de dientes temporales exfoliados (SHED)
- Células madre del ligamento periodontal (PDLSC)
- Células madre del folículo dental (DFPC)
- Células madre de la papila apical (SCAP) ⁽⁹⁾

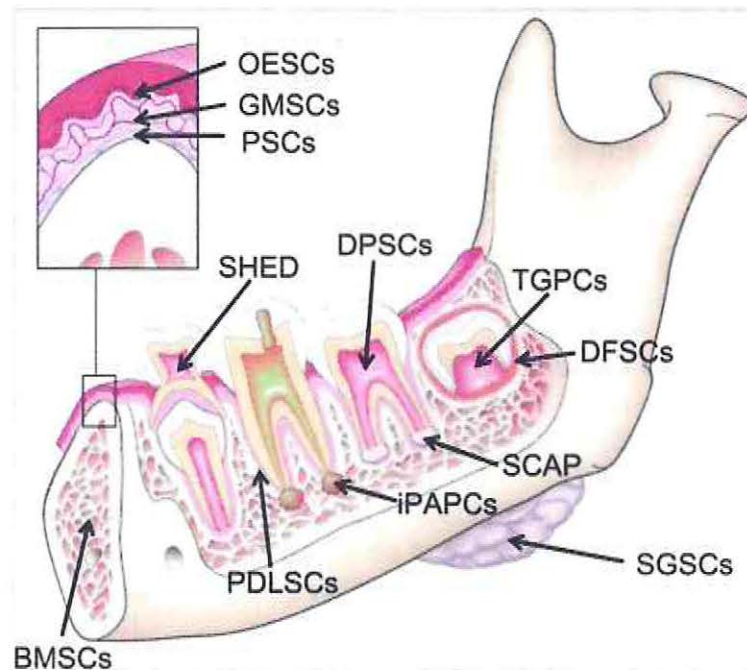


Figura 3: Dibujo esquemático que ilustra las posibles fuentes de células madre postnatales en el medio bucal. Hargreaves K. ⁽⁴⁸⁾

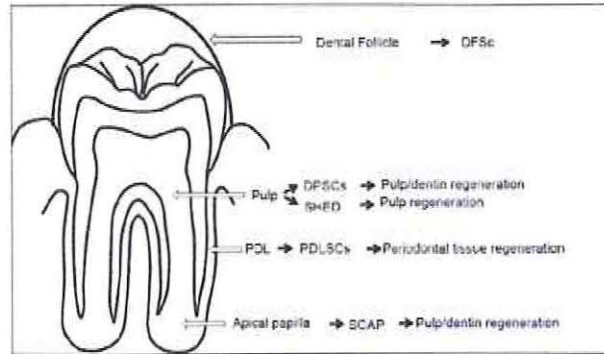


Figura 4: Fuente de células madre de tejidos dentales. Ranganathan⁽⁴⁶⁾

DPSC / SCAP EN ENDODONCIA REGENERATIVA

Entre las células madre dentales anteriormente mencionados, las células madre de la pulpa dental (DPSC), células madre de dientes temporales exfoliados (SHED) y células madre de la papila apical (SCAP) son fuentes potenciales de células madre adecuadas para la regeneración dentino-pulpar, ya que derivan de tejido pulpar o del precursor de la pulpa⁽²¹⁾.

Sin embargo en un estudio experimental, las células madre de la pulpa dental (DPSC) y células madre de la papila apical (SCAP) formaron un complejo dentino-pulpar cuando fueron trasplantadas en ratones inmunocomprometidos, mientras que las células madre de dientes temporales exfoliados (SHED) formaron un tejido mineralizado distinto⁽²²⁾.

Un estudio comparativo entre las células madre de la pulpa dental (DPSC) y células madre de la papila apical (SCAP), se demostró que SCAP presenta:

- Mayor tasa de absorción de bromodesoxiuridina (detección de proliferación celular).
- Mayor número de duplicación de la población.
- Mayor capacidad de regeneración de los tejidos.
- Mayor número de células positivas STRO-1 (marcador de células madre mesenquimáticas).
- Mayor nivel de survivina (proteína anti-apoptótica)^{(23) (21) (24)}

Durante el desarrollo radicular, la papila apical se encuentra apicalmente al diafragma epitelial, y existe una zona rica en células entre la papila y la pulpa. (Fig.5) Su rol en la formación radicular se ha observado en diferentes casos clínicos^{(23) (24)}.

Se trató un paciente con fractura coronaria complicada de un incisivo, realizando la extirpación completa de la pulpa pero manteniendo la papila apical indemne. Se observó continuidad en la formación radicular después del tratamiento. (Fig. 6).

En otro estudio piloto con cerdos, para verificar el rol funcional de la papila apical, se realizó la remoción quirúrgica de ésta en un estadio temprano de la formación

radicular, lo que detuvo el desarrollo de la raíz, aún teniendo la pulpa dental intacta. En contraste, las otras raíces del diente que contenían la papila apical, mostraron un crecimiento y desarrollo radicular normal.⁽²⁵⁾ (Fig. 6).

Es tentador especular que SCAP y no DPSC son una fuente para los odontoblastos primarios que producen dentina radicular.⁽²³⁾ (Fig. 7-8.)

Estas líneas de evidencia sugieren que las células madre de papila apical (SCAP) derivadas de un tejido en desarrollo representarían una población de células madre tempranas, que pueden ser una fuente superior de células para la regeneración de tejidos. Además, estas células también resaltan un hecho importante, que los tejidos en desarrollo pueden contener células madre distintivas de las células madre de tejidos maduros.

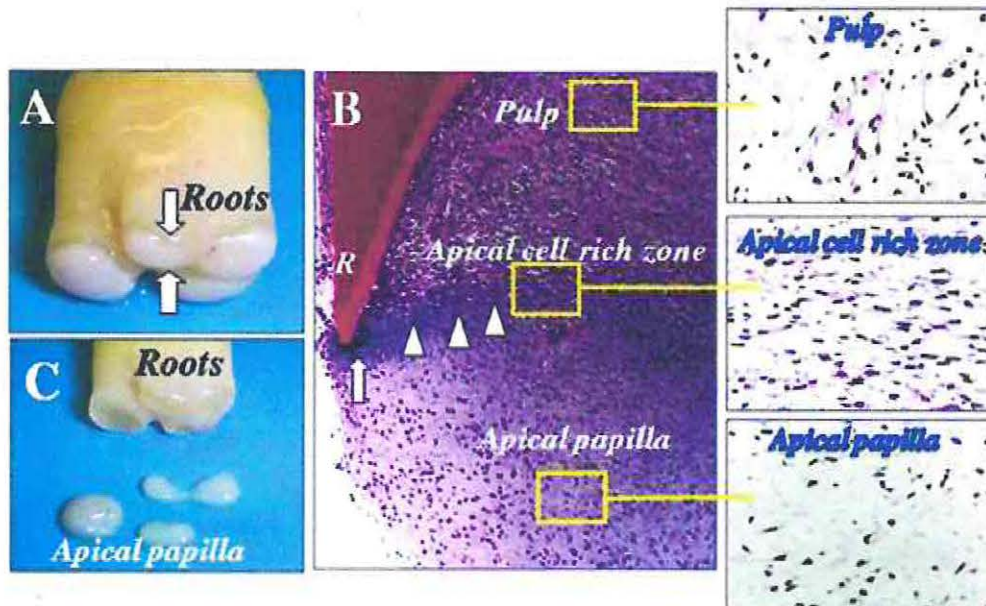


Figura 5: Anatomía de la Papila Apical. Sonoyama⁽²³⁾



Figura 6: Papel potencial de la papila apical en el desarrollo radicular (A) Fractura coronaria complicada en incisivo permanente inmaduro. (B) El tejido pulpar se retiró por completo y el conducto radicular fue sellado con material de relleno. (C) Tres meses después del tratamiento endodóntico, la punta de la raíz continuó su desarrollo. (D) Siete meses después del tratamiento, se formó una cantidad significativa de punta de la raíz. (E) Cuando se removió quirúrgicamente la papila apical de la raíz disto-vestibular del primer molar inferior, ésta dejó de desarrollarse (flechas negras), pero las otras raíces mostraron crecimiento y desarrollo normales. (flechas rojas).⁽²⁵⁾

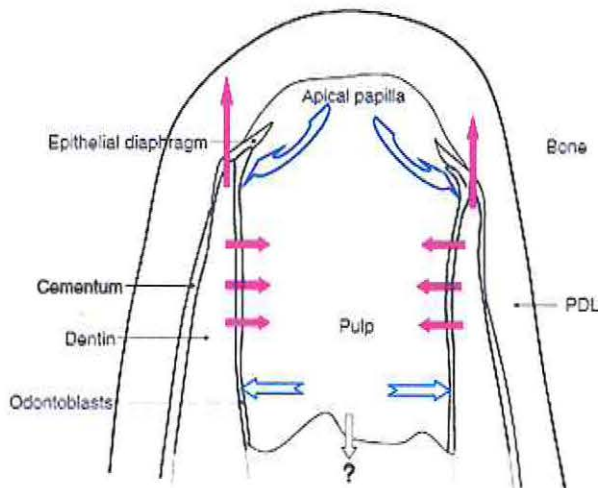


Figura 7: Mecanismo hipotético de regeneración. Huang GT.⁽⁴⁷⁾

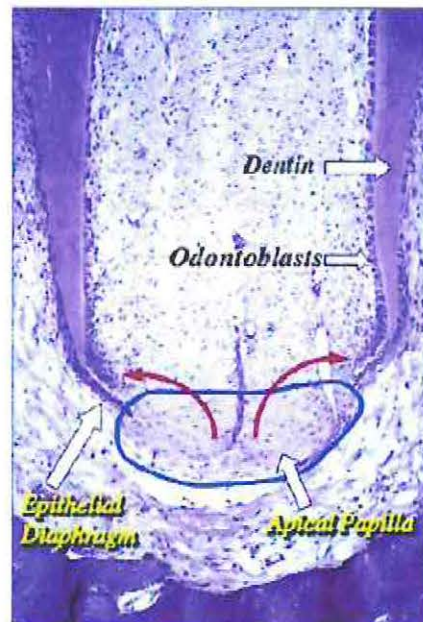


Figura 8: Diagrama de la fuente de células hipotética para el desarrollo de la dentina radicular. Sonoyama.⁽²³⁾

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores más relevantes en esta terapia son:

- Factor de transformación de crecimiento (TGF).
- Proteína morfogenética ósea (BMP).

Para la diferenciación odontoblástica:

- TGF- β_1 y β_3 (diferenciación y secreción de dentina)
- BMP (formación mayor y más homogénea de dentina reparativa)

En relación a angiogénesis:

- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
- Factor de crecimiento endotelial (EGF)⁽²⁶⁾

MATRIZ DE ANDAMIAJE

Plasma rico en plaquetas (PRP) [Primera generación de plaquetas].

Introducido por Whitman y cols, 1997, es un componente sanguíneo con alto contenido de plaquetas en un volumen limitado de plasma. El conteo normal de plaquetas sanguíneas está en un rango entre 150.000/ul a 350.000/ul, el uso de PRP en zonas quirúrgicas las aumenta hasta 1.000.000/ul.⁽²⁶⁾

Fibrina rica en plaquetas [Segunda generación de plaquetas].

Desarrollada inicialmente en Francia por Choukroun y colaboradores el año 2001. Este concentrado plaquetario de segunda generación elimina el riesgo asociado al uso de trombina bovina⁽²⁶⁾.

PROTOCOLO CLINICO DE REVASCULARIZACIÓN

Existen numerosos protocolos en cuanto al procedimiento clínico de revascularización. En este trabajo se considera como pauta, el protocolo entregado por la Asociación Americana de Endodoncia⁽⁹⁾.

SELECCIÓN DEL CASO.

- Diente con pulpa necrótica y un ápice inmaduro.
- Espacio pulpar que no necesite poste para su restauración final.
- Adhesión del paciente/padre al tratamiento.
- Pacientes no alérgicos a los medicamentos y antibióticos necesarios para completar el procedimiento (ASA 1 o 2).

PRIMERA SESIÓN

- Anestesia local, aislamiento absoluto y acceso.
- Copiosa y gentil irrigación con 20mL de Hipoclorito de Sodio (NaOCl), usando un sistema de irrigación que minimice la posibilidad de extrusión del irrigante hacia el espacio periapical. (Por ejemplo, EndoVac™.) Se aconseja el uso de concentraciones más bajas de hipoclorito [1.5%] (20 mL/canal, 5 min) y luego irrigación con suero o EDTA (20 mL/canal, 5 min) con la jeringa de irrigación ubicada aproximadamente a 1mm del extremo radicular, para minimizar la citotoxicidad a las células madre ubicadas en los tejidos apicales.
- Secar los canales con conos de papel.
- Poner hidróxido de calcio o una baja concentración de triple pasta antibiótica. Si se utiliza tripasta antibiótica: 1) considerar el sellado de la cámara pulpar con un agente adhesivo [para minimizar el riesgo de tinción] y 2) mezclar 1:1:1, ciprofloxacino: metronidazol: minociclina a una concentración final de 0.1 mg/mL.
- Llevar al canal mediante una jeringa.
- Si se utiliza triple pasta antibiótica, asegurar su ubicación bajo el límite amelocementario (minimiza la tinción coronaria)
- Sellar con 3-4 mm de material de restauración temporal como Cavit™, IRM™, ionómero de vidrio u otro.

SEGUNDA SESIÓN (1-4 semanas después de la primera sesión)

- Evaluar la respuesta al tratamiento inicial. Si hay signos / síntomas de infección persistente, considerar tiempo de tratamiento adicional con antibióticos o antimicrobianos alternativos.
- Anestésiar con mepivacaina al 3% sin vasoconstrictor, aislamiento absoluto.
- Copiosa, gentil irrigación con 20 mL de EDTA 17%.
- Secar con conos de papel
- Inducir sangramiento en el canal mediante sobreinstrumentación [endo file, explorador] (mediante la utilización de una lima-K precurvada traspasando 2 mm el foramen apical con el objetivo de que todo el canal se llene de sangre hasta el nivel de la unión cemento-esmalte). Una alternativa a la creación de un coágulo de sangre es el uso de plasma rico en plaquetas (PRP), fibrina rica en plaquetas (PRF) o matriz de fibrina autóloga (AFM).
- Detener el sangrado en un nivel que permita 3-4 mm de material de restauración.
- Coloque una matriz reabsorbible como CollaPlug™, Collacote™, CollaTape™ u otro material sobre el coágulo de sangre si es necesario y MTA como material de recubrimiento.
- Se coloca una capa de ionómero de vidrio de 3-4 mm (por ejemplo Fuji IX™, GC América, Alsip, IL) sobre el material de recubrimiento y se fotocura durante 40 s. El MTA se ha asociado con decoloración, alternativas al MTA (tales como ionómero de vidrio modificado con resina [RMGI] o biocerámicas [por

ejemplo, Biodentine®)) deben ser considerados en los dientes donde hay una preocupación estética.

SEGUIMIENTO

- Examen clínico y radiográfico
- Ausencia de dolor, hinchazón de los tejidos blandos o tracto sinusal (a menudo se observa entre la primera y segunda citas).
- Resolución de radiolucidez apical (a menudo observados 6-12 meses después del tratamiento)
- Aumento del ancho de las paredes de la raíz (esto se observa en general antes de aumento aparente de la longitud de la raíz y, a menudo se produce 12 a 24 meses después del tratamiento).
- Mayor longitud de la raíz.
- Respuesta positiva al test de vitalidad pulpar. ⁽⁹⁾

El grado de éxito de los procedimientos de endodoncia regenerativa se mide en gran parte por el grado en que es posible alcanzar los objetivos primarios, secundario, y terciario:

- **Objetivo principal:** Eliminación de los síntomas y evidencia de cicatrización ósea.
- **Objetivo secundario:** Aumento del espesor de la pared radicular y/o aumento de la longitud de la raíz (deseable, pero quizás no esencial)
- **Objetivo Terciario:** Respuesta positiva a las pruebas de vitalidad (que si se logra, podría indicar tejido pulpar vital más organizado) ⁽⁹⁾

ANTIBIOTERAPIA EN ENDODONCIA REGENERATIVA

La eliminación de microorganismos procedentes de conductos radiculares infectados es un reto. Se han descrito numerosas medidas para reducir el número de microorganismos en el sistema de conductos radiculares, incluyendo el uso de diferentes técnicas de instrumentación, regímenes de irrigación y medicamentos intraconducto. Debido a la complejidad de las infecciones, el uso de un único antibiótico puede no resultar en una desinfección eficaz del sistema de conductos radiculares. Puede ser necesaria entonces, una combinación de antibióticos para tratar la diversidad de flora encontrada, lo que también podría disminuir la probabilidad de desarrollo de cepas bacterianas resistentes.

La medicación intraconducto más utilizada en revascularización es una combinación propuesta por Hoshino et al. ⁽²⁷⁾, compuesta por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina en proporción 1:1:1, también conocida como triple pasta antibiótica (TAP). Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado su alta eficacia contra bacterias habituales en infecciones del sistema de conductos radiculares ⁽⁴⁾.

Sin embargo tuvo como efecto secundario tinción dentaria debido a la minociclina⁽²⁸⁾ (1). Por esto se propuso la utilización de una bipasta (DAP) que eliminaba la micociclina, causante de la tinción, utilizando solo ciprofloxacino y metronidazol⁽²⁾ (29). También se ha utilizado una combinación de metronidazol, ciprofloxacino y cefaclor, conocida como triple pasta antibiótica modificada (mTAP). La eficacia del poder antibacteriano de estos medicamentos es conocida, sin embargo, se han presentado importantes desventajas:

- Posible resistencia bacteriana⁽³⁰⁾ (31)
- Citotoxicidad⁽³⁾ (4) (5) (6)

La citotoxicidad es la cualidad de ser tóxico para las células. Cuando las células son expuestas a un compuesto citotóxico pueden responder de diferentes maneras. Pueden sufrir necrosis, en el que pierden integridad de la membrana y mueren rápidamente como resultado de la lisis celular; pueden dejar de crecer y dividirse; o pueden activar un programa genético de muerte celular controlada, denominado apoptosis.

Ruparel et al (2012)⁽⁴⁾, en un estudio *in vitro* demuestra la citotoxicidad que presentan la triple pasta antibiótica (TAP), bipasta antibiótica (DAP) y triple pasta antibiótica modificada (mTAP) sobre las células madre de la papila apical (SCAP), teniendo un efecto perjudicial en la supervivencia celular.

Chuensombat et al (2013)⁽⁵⁾, también en un estudio *in vitro*, evaluó la citotoxicidad de la triple pasta antibiótica (TAP), y de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina por separado, en cultivos de células madre de la pulpa dental (DPSC) y en células madre de la papila apical (SCAP). Todos los antibióticos, excepto el metronidazol fueron citotóxicos, siendo mayor la citotoxicidad cuando se utilizó la triple pasta antibiótica, que utilizando los antibióticos por separado.

OTRAS ALTERNATIVAS ANTIBIÓTICAS EN REVASCULARIZACIÓN

HIDRÓXIDO DE CALCIO

Fue introducido en la endodoncia como un agente de recubrimiento pulpar directo por Hermann en 1920. El hidróxido de calcio puro tiene un pH aproximado de 12.5 – 12.8 y es insoluble en alcohol⁽³²⁾. Está clasificado químicamente como una base fuerte, sus principales acciones provienen de la disociación iónica en Ca^{2+} y OH^- y su efecto en los tejidos vitales, induciendo la deposición de tejido duro y efecto antibacteriano⁽³³⁾.

La actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ se relaciona con la liberación de iones hidroxilo en un entorno acuoso⁽³⁴⁾. Los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que muestran reactividad extrema con varias biomoléculas. Los efectos letales de iones hidroxilo en células bacterianas son probablemente debido a los siguientes mecanismos⁽³³⁾:

- Daño a la membrana citoplasmática bacteriana;

- Desnaturalización de las proteínas;
- Daños en el ADN.

En su estudio in vivo, Bystrom et al. ⁽³⁵⁾ reportaron que los conductos radiculares tratados con hidróxido de calcio tenían menos bacterias que los medicados con fenol alcanforado o monoclorofenol alcanforado. Ellos atribuyen esto al hecho de que el hidróxido de calcio podría ser empacado en el sistema de conductos radiculares permitiendo que los iones hidroxilo se liberaran en el tiempo.

Sjogren et al. (1991) ⁽³⁶⁾ demostraron que una aplicación de 7 días de medicación intraconducto con hidróxido de calcio era suficiente para reducir las bacterias del canal radicular a un nivel que dio un cultivo negativo.

Shuping et al. (2000) ⁽³⁷⁾ mostraron que la colocación de hidróxido de calcio durante al menos 1 semana mostró un 92,5% de los canales radiculares libres de bacterias.

En relación a endodoncia regenerativa, Ruparel et al (2012) ⁽⁴⁾ evaluó la citotoxicidad del hidróxido de calcio en células madre de la papila apical, interesantemente, hubo supervivencia de células madre de papila apical (SCAP) en todas las concentraciones utilizadas [100mg/mL – 0.01mg/mL].

Recientemente la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) ⁽⁹⁾ y Kenneth Hargreaves ⁽⁸⁾, han propuesto la utilización de hidróxido de calcio como medicación del sistema de conductos radiculares en endodoncia regenerativa.

MOXIFLOXACINO

Es una 8-metoxiquinolona de amplio espectro antibacteriano que incluye a patógenos respiratorios típicos, atípicos e intracelulares, Gram-negativos y bacterias anaerobias estrictas. También es activo frente a microorganismos resistentes a penicilinas, macrólidos, tetraciclinas y algunas quinolonas.

Ha sido estudiado, mostrando una excelente biodisponibilidad, prolongada vida media y buena penetración tisular. Además tiene muy buena tolerancia. ⁽³⁸⁾

El moxifloxacino presenta buena actividad *in vitro* contra *E. Faecalis* y parece ser una buena alternativa para pacientes alérgicos a la penicilina o aquellos que muestran resistencia a los antibióticos prescritos normalmente. ⁽⁷⁾

Limeres J. (2007) ⁽³⁹⁾, investigó el espectro de acción *in vitro* del moxifloxacino, se exponen a continuación los resultados

· BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

El moxifloxacino es muy activo contra *Streptococcus pneumoniae*. En un estudio realizado en aislamientos, que incluían cepas altamente resistentes a penicilina, se obtuvo una actividad antibacteriana resultó 5 veces superior a la de levofloxacino. También es muy activo frente a estafilococos y *Mycobacterium tuberculosis*.

· BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

El moxifloxacino ha demostrado una importante actividad frente a bacterias Gramnegativas responsables de infecciones de las vías respiratorias, como *Haemophilus influenzae*, *Moxarella catarrhalis* y *Klebsiella pneumoniae*. Su espectro

incluye también bacterias resistentes a ampicilina, ceftazidima, bacterias productoras de betalactamasas y ha mostrado una actividad moderada frente a *Pseudomonas*.

· GÉRMENES ATÍPICOS

Se han obtenido resultados satisfactorios frente a microorganismos como *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia pneumoniae*

· ANAEROBIOS.

Se obtuvo sensibilidad bacteriana frente a moxifloxacino en los géneros: *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., así como *Propionibacterium acnes* y algunas cepas de *Bacteroides* spp.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*.

MÉTODO RESAZURÍN.

El Resazurín (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) fue introducido como indicador de viabilidad celular no tóxica, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad.

En particular, este colorante -azul no fluorescente- se reduce en dos pasos, primero irreversiblemente a resorufina -rosado altamente fluorescente- en respuesta a la reducción química del medio de cultivo resultante del crecimiento celular. El crecimiento continuo de células mantiene un ambiente reducido -fluorescente, color rojo- mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un ambiente oxidado -no fluorescente, color azul-.

En una segunda etapa reversible, la resorufina es convertida a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables. (Fig.9) ^{(40) (41)}

La señal fluorescente tiene una longitud de onda de excitación de 530 nm – 560 nm y de emisión de 590 nm. La absorbancia tiene una longitud de onda entre 570nm – 600nm.

La señal fluorescente y colorimétrica generada a partir del ensayo de proliferación es proporcional al número de células vivas en la muestra.

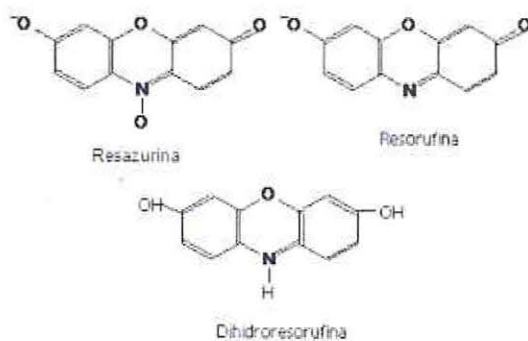


Figura 9: Conversión de Resazurín a resorufina (fluorescente), y posteriormente a dihidroresorufina (no fluorescente) por acción metabólica de células viables. ⁽⁴⁰⁾

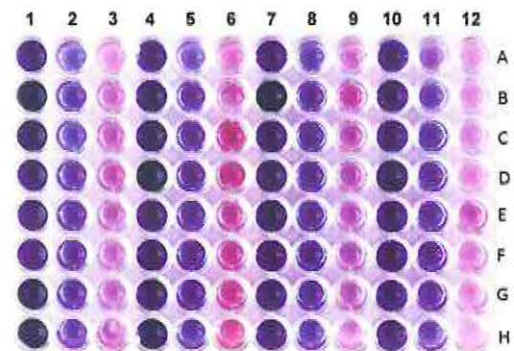


Figura 10: Placa de microtitulación con tres cepas de *E. coli* para demostrar el cambio de color del Resazurín. ⁽⁴⁹⁾

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1. OBJETIVO GENERAL

Comparar *in vitro* la citotoxicidad de moxifloxacino e hidróxido de calcio sobre células madre de papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las distintas concentraciones de los medicamentos sobre la proliferación de células madre de papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.
- Evaluar la acción de los medicamentos sobre la proliferación de células madre de papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros en el transcurso de siete días.

3. HIPÓTESIS

Se postula que la citotoxicidad de Hidróxido de Calcio sobre células madre de papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros es mayor que la exhibida por Moxifloxacino.

H_0 : No existe diferencia estadísticamente significativa entre la citotoxicidad exhibida por Hidróxido de Calcio y Moxifloxacino sobre células madre de la papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.

H_1 : Existe diferencia estadísticamente significativa entre la citotoxicidad exhibida por Hidróxido de Calcio y Moxifloxacino sobre células madre de la papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio experimental analítico *in vitro*, también conocido como ensayo clínico controlado (ECC), consistente en comparar la citotoxicidad de hidróxido de calcio y moxifloxacino en células madre de papila apical de dientes permanentes inmaduros. Esta elección está basada conforme a las normas de bioética de la ley del Estado de Chile, que exigen evidencia *in vitro* significativa para experimentar en humanos.

2. UNIVERSO

Dientes permanentes inmaduros extraídos en pabellón quirúrgico de la Escuela de Odontología, Universidad de Valparaíso, Chile durante el mes de Abril de 2015.

3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Al tratarse de un estudio piloto, se carece de información suficiente para poder determinar estadísticamente, un tamaño de muestra apropiado para la investigación. Se tomó como referencia estudios realizados sobre células madre de papila apical con anterioridad. Sonoyama *et al* ⁽²³⁾ realizó la caracterización de células madre de papila apical (SCAP) utilizando 10 terceros molares de 6 pacientes cuyas edades oscilan entre 16 y 24 años, (tamaño de muestra n=6). Ruparel *et al*. ⁽⁴⁾ en su estudio de citotoxicidad sobre células madre de papila apical (SCAP) utilizó 2 terceros molares de una paciente de género femenino de 17 años (tamaño de muestra n=1).

La muestra del presente estudio corresponde a 8 terceros molares, pertenecientes a 4 pacientes cuyas edades oscilan entre 17 y 26 años (tamaño de muestra n=4).

4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Dientes permanentes inmaduros. (Raíz en desarrollo)
- Dientes con o sin destrucción coronaria pero con raíz en desarrollo indemne.
- Dientes que no hayan sido sometidos a terapias pulpares.

5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Dientes permanentes maduros.
- Dientes con terapia pulpar.
- Dientes que necesiten odontosección para su extracción.

6. VARIABLES

- INDEPENDIENTES
Hidróxido de Calcio
Moxifloxacino
- DEPENDIENTES
Proliferación celular.

6.1. DEFINICIONES CONCEPTUALES / OPERACIONALES

- HIDRÓXIDO DE CALCIO

Conceptual: Base fuerte, sus principales acciones provienen de la disociación iónica en Ca^{2+} y OH^- .

Operacional: Sustancia química que se aplica sobre cultivos para evaluar su acción citotóxica sobre las células.

- MOXIFLOXACINO

Conceptual: Es una 8-metoxiquinolona de amplio espectro antibacteriano que incluye a patógenos respiratorios típicos, atípicos e intracelulares, Gram-negativos y bacterias anaerobias estrictas.

Operacional: Sustancia química que se aplica sobre cultivos para evaluar su acción citotóxica sobre las células.

- ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR [RESAZURIN].

Conceptual: Método indicador de viabilidad celular no tóxica, útil para evaluar proliferación celular y la citotoxicidad *in vitro*.

Operacional: Colorante que se aplica en cultivos celulares para cuantificar unidades de fluorescencia compatibles con actividad mitocondrial asociada a viabilidad celular.

7. UNIDAD DE ESTUDIO

Células madre de papila apical de dientes permanentes inmaduros que cumplan los criterios de inclusión/exclusión y que se encuentren inoculadas en medio de cultivo para estudio de laboratorio.

8. CALIBRACIÓN

Se realizará calibración por consistencia (autocalibre), ya que solo un operador ejecutará la etapa de laboratorio. (Cultivo/ensayo de proliferación celular).

IV. DESARROLLO DEL ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de Abril - Junio de 2015 en las dependencias del Laboratorio de Química Fisiológica e Inmunología perteneciente al Departamento de Química, Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Dirigido por la profesora Caroline Weinstein Oppenheimer, Químico-Farmacéutico y PhD en microbiología e inmunología en East Carolina University. Se contó con la supervisión e instrucción del profesor Mauricio Reyna Jeldes, Químico-Farmacéutico, para realizar los procedimientos de laboratorio de acuerdo a protocolos establecidos para manejo y trabajo con cultivos celulares.

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS.

Mediante consentimiento informado verbal y escrito (Anexo1), se obtuvo la papila apical de dientes permanentes inmaduros correspondientes a terceros molares (1.8 y 2.8) de cuatro pacientes, tanto hombres como mujeres, cuyas edades se encuentran entre 17 y 26 años. Después de la extracción dental en pabellón quirúrgico, se obtuvo la papila apical de las raíces manteniéndolas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF; Biological Industries, Israel, 2015) y 1% de solución antibiótica de penicilina 10 UI/mL y estreptomina 10mg/mL (Gibco®, Grand Island, NY, EEUU, 2015) hasta el momento del procesamiento a una temperatura de 4°C.

Se procesaron las biopsias de papila apical siguiendo un protocolo estructurado a partir de los trabajos realizados por Chuensombat *et al.* en 2013 y Sonoyama *et al.* en 2008 con células madre de la papila apical (SCAP).^{(5) (23)} Se trabajó en gabinete de bioseguridad clase II tipo B2 donde se lavaron las biopsias con buffer fosfato salino (PBS) estéril. Posteriormente, las muestras biológicas fueron cortadas con bisturí n°22 en placas Petri estériles y tratadas con colagenasa 3 mg/mL e incubadas por 1 hora a 37°C. Tras la incubación, las papilas disgregadas se traspasaron a tubos de centrifuga de 15 mL para posteriormente centrifugarse por 5 minutos a 1500 rpm. Los precipitados obtenidos tras la centrifugación –y luego de haber descartado los sobrenadantes- se redispersaron en 1 mL de medio DMEM suplementado y se transfirieron a frascos de cultivo de 25 cm² (T25), adicionándose 3mL de medio DMEM suplementado para cubrir el área de cultivo. Los frascos se mantuvieron en incubadora Thermo Forma a 37° C y 5% de CO₂, y fueron rotulados como Papila I, Papila II, Papila III y Papila IV.

Se evaluó adhesión al frasco de cultivo y proliferación celular transcurrida una semana, esperando de allí en adelante un 80% de confluencia para obtener el número de células adecuado para los ensayos de proliferación.

2. CULTIVO CELULAR, TRIPSINIZACIÓN Y MONTAJE DE PLACAS.

Tras obtener un porcentaje de confluencia celular apropiado (80%), se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS estéril. Luego se adicionaron 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®, Grand Island, NY, EEUU, 2015) y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Tras verificar el adecuado desprendimiento de las células de la superficie de cultivo a través de microscopio óptico, se retiró la suspensión celular del frasco tripsinizado y se traspasó a tubos de centrifuga de 15 mL, adicionando un volumen equivalente de medio de cultivo DMEM suplementado. La dispersión resultante se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm, retirando el sobrenadante al término de este proceso.

Sobre el precipitado de células obtenido se adicionó un volumen conocido de medio de cultivo y se resuspendió para homogeneizar las células en el medio. De esta suspensión celular, se tomó alícuota de 20 µL para conteo celular y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL que posee previamente 20 µL de tinción azul de tripán 0,4% (p/v) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.). Se efectuó el conteo de células en cámara de Neubauer (hematocitómetro) por medio de una alícuota de 10 µL. La fórmula empleada para determinar el número de células presentes en la suspensión de origen fue la que se detalla a continuación:

$$\left(\frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{4}\right) \times 2 \times 10000 \times Y = \text{Nro de células} / Y \text{ mL de suspensión}$$

donde n corresponde al número de células contabilizadas en cada cuadrante de la cámara de Neubauer, e Y al volumen de medio empleado para crear la suspensión celular.

Tras determinar el número de células totales presentes en la suspensión, se sembraron 150.000 células en placas de 24 pocillos siguiendo una proporción de 5.000 células por pocillo. Una vez adicionadas las células, se mantuvieron las placas por 24 horas en incubadora a 37°C y 5% CO₂ en espera de la adición de las condiciones experimentales.

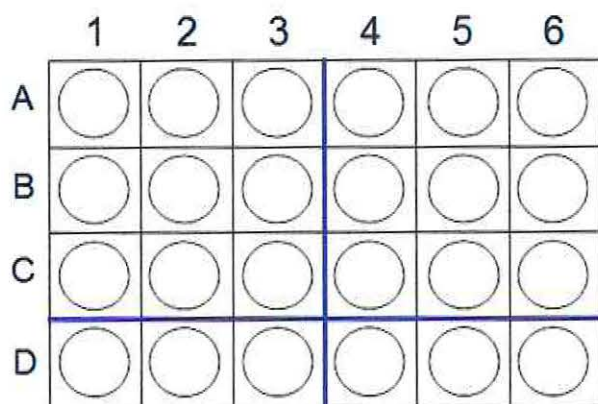
3. ADICIÓN DE CONDICIONES.

Se prepararon soluciones de Hidróxido de Calcio (CaOH₂) (Hertz Santiago, Chile, 2015) y Moxifloxacino (Moxaval® Laboratorio Saval Santiago, Chile, 2014) las que fueron formuladas a una concentración de 213 mg/mL y 200 mg/mL respectivamente, empleando como solvente medio DMEM suplementado. Para este efecto, se utilizó mortero y pistilo para pulverizar los respectivos fármacos, y se agregaron 5 mL de medio de cultivo para lograr una adecuada suspensión.

En tubos de centrifuga de 15 mL se prepararon diluciones de ambos medicamentos para obtener concentraciones de 100 mg/mL, 10 mg/mL y 1 mg/mL, empleando medio DMEM suplementado como solvente.

Tras la elaboración de las diluciones, las placas de 24 pocillos que contienen las células de papila apical fueron tratadas de acuerdo al esquema presentado en la

figura 11, conservando un volumen final de 800 μ L pocillo e incubando a 37°C y 5% de CO₂ para los distintos tiempos de evaluación al término de la siembra:



A1, A2, A3: Hidróxido de Calcio 100 mg/mL

B1, B2, B3: Hidróxido de Calcio 10 mg/mL.

C1, C2, C3: Hidróxido de Calcio 1 mg/mL.

A4, A5, A6: Moxifloxacino 100 mg/mL.

B4, B5, B6: Moxifloxacino 10 mg/mL.

C4, C5, C6: Moxifloxacino 1 mg/mL.

D1, D2, D3, D4, D5, D6: Controles DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, 1% solución de penicilina/estreptomicina.

Figura 11: Diseño de placa 24 pocillos para adición de condiciones en estudio

4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.

Se realizaron ensayos de proliferación celular los días 1, 5 y 7 después de agregar las condiciones de cultivo experimentales.

Para cada una de las mediciones, se lavaron los pocillos con PBS estéril hasta eliminar todos los residuos de las suspensiones de los fármacos. Se agregó a cada pocillo 800 μ L de una solución de Resazurín 4 mg/L (Sigma®, St. Louis, EEUU, 2013) en medio de cultivo DMEM suplementado y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por cuatro horas.

Transcurrido el tiempo mencionado, se homogenizaron tres veces cada pocillo y se traspasaron 200 μ L de cada pocillo de la placa de 24 a una placa Microtiter (Thermo Scientific™) de 96 pocillos para medición fluorométrica en lector de placas Appliskan (Thermo Scientific™, modelo 3230000), usando un filtro de excitación de 540 nm y un filtro de emisión de 590 nm. El diseño de la placa Microtiter de 96 pocillos empleada para la medición se dividió de acuerdo a la figura 12, los resultados se obtuvieron en unidades relativas de fluorescencia (RFU) que representan actividad metabólica celular.

Después de las mediciones fluorométricas de los días 1 y 5, se lavaron con PBS estéril los pocillos de las placas de 24 hasta eliminar los residuos de Resazurín y se condicionaron nuevamente los medios como indica la figura 11 para realizar los ensayos de proliferación celular posteriores.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 12: Diseño de placa Microtiter 96 pocillos para medición de fluorescencia.

Papila I y Papila III.

A1, A2, A3: Hidróxido de calcio 100 mg/mL.

B1, B2, B3: Hidróxido de calcio 10 mg/mL.

C1, C2, C3: Hidróxido de calcio 1 mg/mL.

A4, A5, A6: Moxifloxacino 100 mg/mL.

B4, B5, B6: Moxifloxacino 10 mg/mL.

C4, C5, C6: Moxifloxacino 1 mg/mL.

D1, D2, D3, D4, D5, D6: Controles DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina.

Papila II y Papila IV.

A7, A8, A9: Hidróxido de calcio 100 mg/mL.

B7, B8, B9: Hidróxido de calcio 10 mg/mL.

C7, C8, C9: Hidróxido de calcio 1 mg/mL.

A10, A11, A12: Moxifloxacino 100 mg/mL.

B10, B11, B12: Moxifloxacino 10 mg/mL.

C10, C11, C12: Moxifloxacino 1 mg/mL.

D7, D8, D9, D10, D11, D12: Controles DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina.

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se registraron las unidades relativas de fluorescencia (RFU) utilizando el software ScanIt™ (Thermo Scientific™) de cada uno de los cultivos celulares, los días 1, 5 y 7. Obteniéndose por cada cultivo la siguiente cantidad de datos:

- **Controles medio de cultivo DMEM:** 6 valores RFU por día de medición.
- **Hidróxido de Calcio 100 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.
- **Hidróxido de Calcio 10 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.
- **Hidróxido de Calcio 1 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.
- **Moxifloxacino 100 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.
- **Moxifloxacino 100 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.
- **Moxifloxacino 100 mg/mL:** 3 valores RFU por día de medición.

Se calculó el valor promedio de unidades relativas de fluorescencia (RFU) por cada variable en medición obteniendo luego el índice porcentual de proliferación celular al compararlas con el valor promedio de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de los respectivos controles.

Los siguientes gráficos expresan los resultados obtenidos:

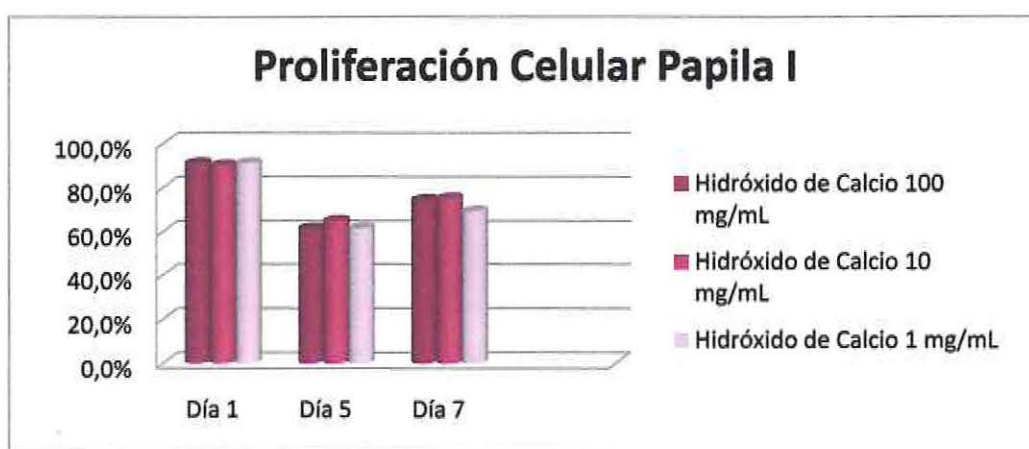


Figura 13: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Hidróxido de Calcio en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 13):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 90% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -9,1%; para 10 mg/mL: -10% y para 1 mg/mL: -9,0%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 10 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 60% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -38,6%; para 10 mg/mL: -35,2% y para 1 mg/mL: -38,4%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 10mg/mL.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical I.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 70% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -25,6%; para 10 mg/mL: -24,9% y para 1 mg/mL: -30,7%.

A diferencia de lo ocurrido en las otras mediciones, se observó un aumento en el índice de proliferación celular en comparación a los índices obtenidos el día 5. Este aumento para cada concentración fue: 100mg/mL: +13%; para 10 mg/mL: +10,3% y para 1 mg/mL: +7,7%.

Proliferación Celular Papila I

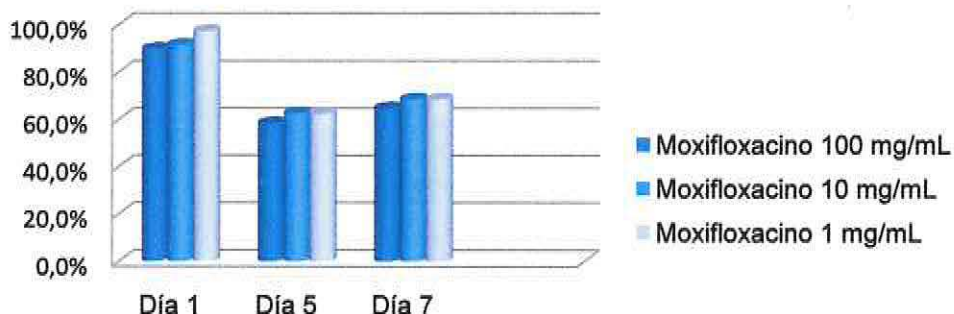


Figura 14: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Moxifloxacino en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 14):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 90% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -10,2%; para 10 mg/mL: -8,4% y para 1 mg/mL: -2,6%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 60% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -41,4%; para 10 mg/mL: -37,2% y para 1 mg/mL: -37,5%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 10 mg/mL.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical II.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 65% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -35,1%; para 10 mg/mL: -31,3% y para 1 mg/mL: -31,7%.

A diferencia de lo ocurrido en las otras mediciones, se observó un aumento en el índice de proliferación celular en comparación a los índices obtenidos el día 5. Este aumento para cada concentración fue: 100mg/mL: +6,3%; para 10 mg/mL: +5,9% y para 1 mg/mL: +5,8%.

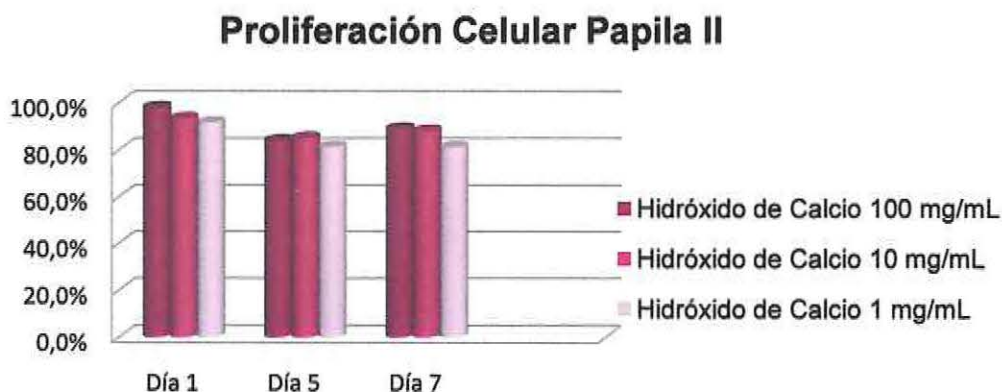


Figura 15: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Hidróxido de Calcio en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 15):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 90% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -2,0%; para 10 mg/mL: -6,7% y para 1 mg/mL: -8,4%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una

concentración de 1 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 100 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 80% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -16,1%; para 10 mg/mL: -15% y para 1 mg/mL: -18,7%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 1 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 100 mg/mL.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical II.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 80% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -11,1%; para 10 mg/mL: -12% y para 1 mg/mL: -18,8%.

A diferencia de lo ocurrido en las otras mediciones, se observó un aumento en el índice de proliferación celular en comparación a los índices obtenidos el día 5. Este aumento para cada concentración fue: 100mg/mL: +6,3%; para 10 mg/mL: +5,9% y para 1 mg/mL: +5,8%.

Proliferación Celular Papila II

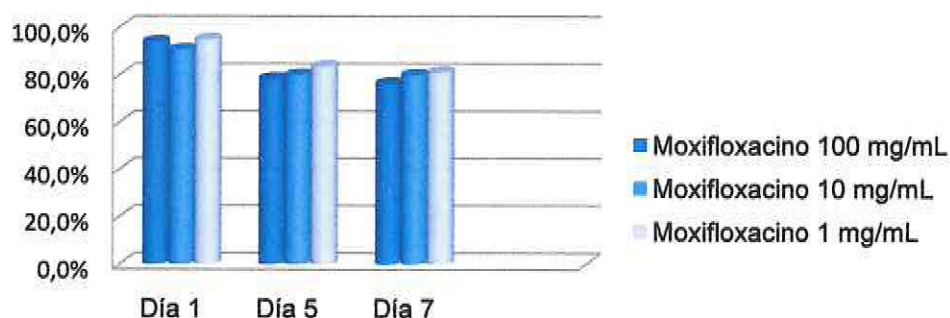


Figura 16: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Moxifloxacino en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 16):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 90% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación

celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: **-6,0%**; para 10 mg/mL: **-9,3%** y para 1 mg/mL: **-5,0%**. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 10 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 80% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: **-21,5%**; para 10 mg/mL: **-19,9%** y para 1 mg/mL: **-16,4%**. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 80% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: **-23,5%**; para 10 mg/mL: **-19,9%** y para 1 mg/mL: **-19,9%**.

En comparación con los índices obtenidos el día 5, se observó una leve disminución en el índice de proliferación celular en dos concentraciones, 100mg/mL: **-2,0%** y 1 mg/mL: **-3%**. Para la concentración de 10 mg/mL, no se observó cambio en el índice de proliferación celular entre los días 5 y 7.

Proliferación Celular Papila III



Figura 17: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Hidróxido de Calcio en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 17):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 55% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: **-48,7%**; para 10 mg/mL: **-47,8%** y para 1 mg/mL: **-37,8%**. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una

concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 7,5% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -92,7%; para 10 mg/mL: -92,6% y para 1 mg/mL: -91,9%. En términos generales las tres concentraciones farmacológicas estudiadas afectaron los cultivos celulares de manera muy similar, siendo el más afectado el expuesto a una concentración de 10 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 7,0% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -93,7%; para 10 mg/mL: -93,6% y para 1 mg/mL: -92,3%.

En comparación con los índices obtenidos el día 5, se observó una leve disminución en el índice de proliferación celular en todas las concentraciones, siendo la variación del índice de proliferación de 100mg/mL: - 1,0% 10mg/mL: -1,0% y 1 mg/mL: -0,4%.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical III.

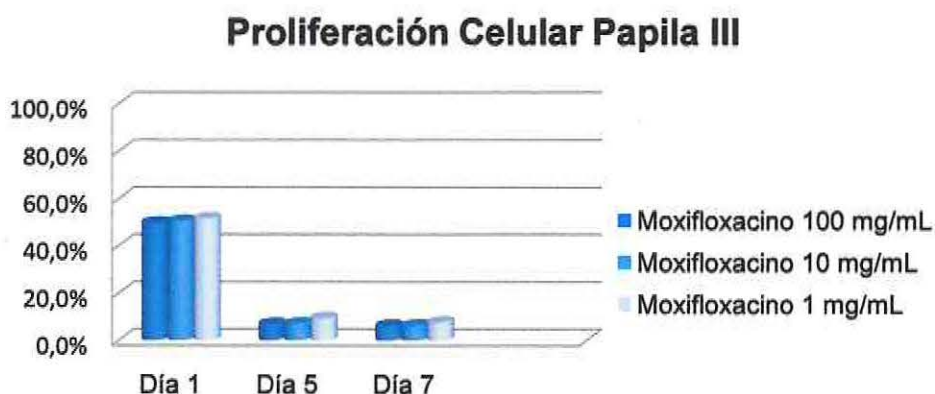


Figura 18: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Moxifloxacino en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 18):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 50% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación

celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -50,2%; para 10 mg/mL: -49,4% y para 1 mg/mL: -48,4%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 8,0% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -93%; para 10 mg/mL: -92,8% y para 1 mg/mL: -90,5%. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 100 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 6,5% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -94,2%; para 10 mg/mL: -94,1% y para 1 mg/mL: -92,6%.

En comparación con los índices obtenidos el día 5, se observó una leve disminución en el índice de proliferación celular en todas las concentraciones, siendo la variación del índice de proliferación de 100mg/mL: - 1,2% 10mg/mL: -1,3% y 1 mg/mL: -2,1%.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical III.

Proliferación Celular Papila IV



Figura 19: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Hidróxido de Calcio en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 19):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 75% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación

celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: **-23,3%**; para 10 mg/mL: **-23%** y para 1 mg/mL: **-24,3%**. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 1 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 10 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 50% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: **-48,3%**; para 10 mg/mL: **-47,3%** y para 1 mg/mL: **-49,8%**. Siendo el cultivo más afectado el expuesto a una concentración de 1 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 10 mg/mL.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 28% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: **-70,7%**; para 10 mg/mL: **-71,8%** y para 1 mg/mL: **-73,7%**.

En comparación con los índices obtenidos el día 5, se observó una leve disminución en el índice de proliferación celular en todas las concentraciones, siendo la variación del índice de proliferación de 100mg/mL: **- 22,4%** 10mg/mL: **-24,5%** y 1 mg/mL: **-23,9%**.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical IV.

Proliferación Celular Papila IV



Figura 20: Índice porcentual de proliferación celular inducido por cada dilución de Moxifloxacino en el transcurso del tiempo de medición.

Resultados (Figura 20):

Día 1

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 70% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación

celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -30,6%; para 10 mg/mL: -30,6% y para 1 mg/mL: -29,5%. Siendo afectados de igual manera los cultivos expuestos a concentraciones de 100 mg/mL y 10 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg/mL.

Día 5

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 50% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100 mg/mL: -51,8%; para 10 mg/mL: -50,6% y para 1 mg/mL: -50,6%. Siendo afectados de igual manera los cultivos expuestos a concentraciones de 10 mg/mL y 1 mg/mL. Y el menos afectado el cultivo expuesto a una concentración de 100 mg/mL.

Día 7

Se observan índices de proliferación celular cercanos al 26% para las tres concentraciones farmacológicas utilizadas. La variación del índice de proliferación celular para cada concentración fue: 100mg/mL: -74,7%; para 10 mg/mL: -74,6% y para 1 mg/mL: -72,5%.

En comparación con los índices obtenidos el día 5, se observó una leve disminución en el índice de proliferación celular en todas las concentraciones, siendo la variación del índice de proliferación de 100mg/mL: - 22,9% 10mg/mL: -24% y 1 mg/mL: -21,9%.

En términos generales, esta medición corresponde a los porcentajes más bajos de proliferación celular obtenidos en el transcurso de la investigación para la muestra Papila Apical IV.

Se observó en todos los cultivos celulares – Papila I, Papila II, Papila III y Papila IV - y para todas las concentraciones – 1 mg/mL, 10 mg/mL y 100 mg/mL – tanto de hidróxido de calcio como moxifloxacino, un efecto perjudicial sobre la proliferación de células madre de papila apical.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este estudio piloto corresponde a un experimento de tipo pareado, donde se utilizaron tres concentraciones - 1 mg/mL, 10 mg/mL y 100 mg/mL - de dos medicamentos - Moxifloxacino e Hidróxido de Calcio -, y cuatro cultivos de células madre de papila apical (SCAP), correspondientes a pacientes independientes con edades entre 17 y 26 años, rotulados como Papila I, Papila II, Papila III, Papila IV.

Se registró la acción de los medicamentos sobre la proliferación celular los días 1, 5 y 7. Para cada concentración farmacológica utilizada, se calculó el índice porcentual de proliferación celular utilizando las unidades relativas de fluorescencia obtenidas en los ensayos de proliferación. Luego, se calculó la variación del índice porcentual de proliferación celular mediante la comparación de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de cada una de las concentraciones de ambos medicamentos en estudio versus las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de los controles respectivos - medio de cultivo sin medicación - para cada uno de los cuatro cultivos. Debido a que la hipótesis primaria es comparar la citotoxicidad entre los dos medicamentos, se calcularon las pendientes de la variación del índice porcentual de proliferación (VIP) para cada día de medición de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de los cultivos celulares - días 1, 5 y 7 -, de las 24 combinaciones (4 pacientes, 3 concentraciones y 2 medicamentos). Luego, se promediaron las pendientes resultantes para las tres concentraciones utilizadas de cada medicamento. Finalmente, se calculó para cada cultivo celular - Papila I, Papila II, Papila III y Papila IV - la diferencia entre las pendientes promedio anteriormente mencionadas, donde se observaron cuatro diferencias.

La hipótesis general en términos estadísticos, se postula de la siguiente manera.

$$H_0: \mu_D = 0$$

Versus,

$$H_1: \mu_D \neq 0;$$

donde, μ_D representa la diferencia entre el promedio de las pendientes de la variación del índice porcentual de proliferación (VIP) versus día de medición de unidades relativas de fluorescencia de los cultivos celulares de las tres concentraciones de ambos medicamentos estudiados en los cuatro cultivos. (Figura 21)

Debido a la cantidad de datos, se supuso que la diferencia entre pendientes proviene de una distribución gaussiana, aplicándose el procedimiento paramétrico *t* de **Student** para datos pareados.

El resultado del *t* de **Student** arroja un valor $p= 0,8149$, lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la citotoxicidad exhibida por Hidróxido

de Calcio y Moxifloxacino sobre células madre de la papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros. (Anexo 2)

Todos los cálculos y gráfica de los datos se realizaron utilizando el software Stata, versión 14 (StataCorp, 2015) ⁽⁴²⁾.

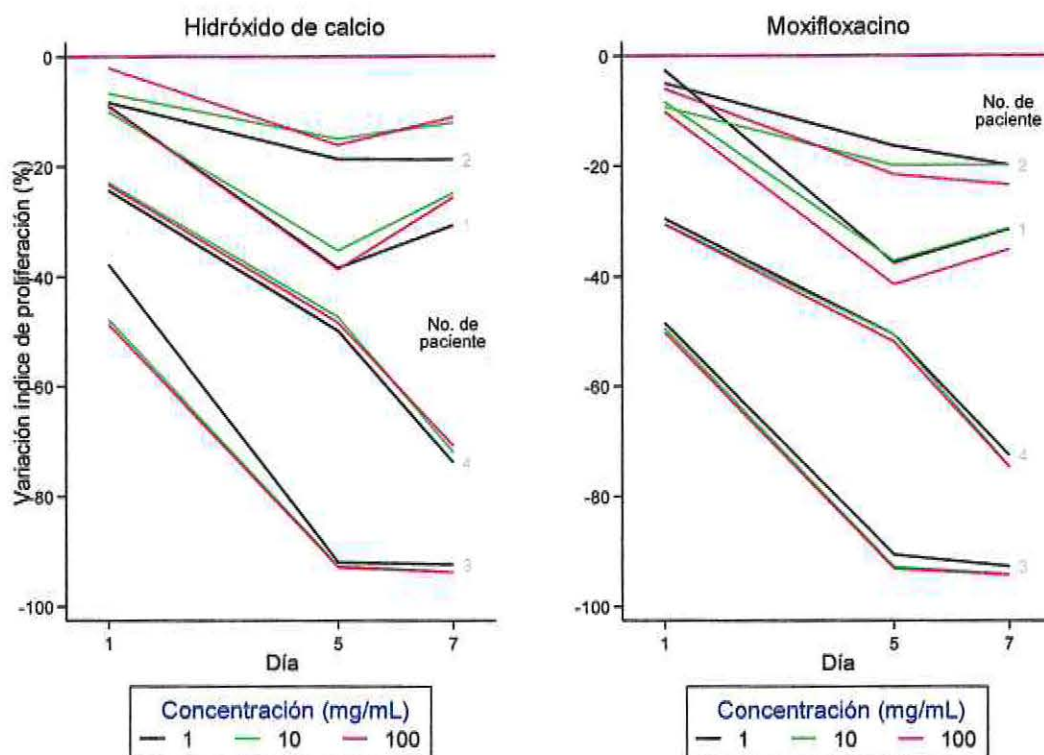


Figura 21: Variación porcentual del índice de proliferación celular para las tres concentraciones de ambos medicamentos en los días de medición de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de los cultivos de células madre de papila apical (SCAP).

VI. DISCUSIÓN

A pesar del aumento en el número de casos publicados de endodoncia regenerativa ^{(43) (44) (1) (2)}, no se ha establecido un protocolo estandarizado para estos procedimientos. Sin embargo, una característica común es el esfuerzo en el control de la infección como primer paso hacia un procedimiento regenerativo exitoso. La medicación intraconducto es la intervención farmacológica clave para lograr este objetivo. Con esta finalidad, se han propuesto diferentes combinaciones de antibióticos que no han estado libres de efectos secundarios indeseados, entre ellos, la decoloración dentaria y citotoxicidad. ^{(3) (1)}

La endodoncia regenerativa consta de tres pilares fundamentales, células madre, matriz de andamiaje y moléculas de señalización. La citotoxicidad afecta directamente la viabilidad de las células madre encargadas de la regeneración, por ende, es imperiosa la necesidad de buscar alternativas inofensivas para las células.

Los resultados del presente trabajo de investigación muestran que tanto Hidróxido de Calcio como Moxifloxacino tienen efectos nocivos sobre la proliferación celular de células madre de papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.

En relación a la citotoxicidad exhibida por el Hidróxido de Calcio, los resultados se contradicen con lo expuesto por Ruparel et al. ⁽⁴⁾ donde se observó una acción promotora de la proliferación celular en células madre de la papila apical utilizando concentraciones farmacológicas idénticas a las de este estudio. Esta diferencia puede deberse a que en el trabajo de Ruparel, la muestra analizada consiste en un único cultivo de células madre de papila apical por lo que se carece de datos suficientes para poder considerarlo parámetro de comparación, pues no tiene potencia estadística. También es importante considerar la variabilidad en la respuesta a los medicamentos debido a factores genéticos propios de cada donante.

Respecto a la citotoxicidad exhibida por Moxifloxacino, no se cuenta con otros trabajos de investigación sobre su acción en la proliferación de células madre de la papila apical de dientes permanentes inmaduros, impidiendo la comparación de los resultados obtenidos. Por lo que este trabajo de investigación sería un estudio piloto para investigaciones posteriores.

Se debe tener presente que la variabilidad en la respuesta a las diferentes concentraciones farmacológicas exhibidas para ambos medicamentos en los distintos cultivos de células madre de papila apical puede deberse principalmente a las características genéticas propias de cada individuo y también al comportamiento relacionado con la diferencia etaria que existe entre los donantes.

La investigación científica sobre células madre de papila apical es escasa y los resultados obtenidos en la evaluación de citotoxicidad exhibida para las alternativas farmacológicas utilizadas actualmente en procedimientos de endodoncia regenerativa han sido desfavorables. Por lo que es indispensable continuar investigando para encontrar alternativas farmacológicas que permitan conjugar los dos factores más importantes al momento de lograr el éxito terapéutico en

endodoncia regenerativa, que son en primer lugar, una correcta desinfección del sistema de conductos radiculares pero también la mantención y viabilidad de las células madre presentes en el ápice radicular de dientes permanentes inmaduros.

VII. LIMITACIONES Y SUGERENCIAS

La principal limitación del presente trabajo de investigación es que corresponde a un estudio *in vitro*, por lo que sus resultados no pueden ser comparados con un estudio *in vivo*.

Por otro lado, clínicamente en endodoncia la concentración de la medicación intraconducto no está estandarizada, por lo que no se cuenta con datos concretos para establecer los parámetros farmacológicos a investigar *in vitro*, se utilizó por ende, una estimación de concentraciones cercanas a las utilizadas actualmente en la práctica clínica.

En relación a los procedimientos de laboratorio, debido a la naturaleza de la siembra celular *in vitro*, no es posible aplicar las condiciones farmacológicas en consistencia de pasta como se realiza *in vivo* debido a que el contacto directo con las células provocaría inviabilidad del cultivo celular. Se limitó a registrar la citotoxicidad de los fármacos durante siete días para evitar la confluencia celular de los controles, estado en el que las células detienen su división debido a inhibición por contacto. De esta manera, la proliferación celular de los controles no es alterada y permite tener un parámetro de comparación apropiado para la proliferación celular presentada en las condiciones farmacológicas estudiadas.

Los resultados de este estudio piloto pueden ser útiles para determinar un tamaño de muestra apropiado, ya que las publicaciones utilizadas como referencia para realizar este trabajo de investigación, tienen tamaños de muestra muy pequeños, estadísticamente no son significativos.

Se sugiere por lo tanto, realizar nuevos estudios con tamaños de muestra mayor que permitan resolver el problema de potencia del presente trabajo de investigación, además de acotar el rango etario de los pacientes para eliminar variabilidad en los resultados por esta causa.

Se propone continuar la investigación con moxifloxacino, comparando su citotoxicidad con las pastas antibióticas utilizadas actualmente en la terapia de regeneración endodóntica. Además de determinar su concentración mínima inhibitoria contra los principales patógenos asociados a necrosis pulpar y fracasos endodónticos.

VIII. CONCLUSIONES

El objetivo general del presente trabajo de investigación consistió en comparar la citotoxicidad de Moxifloxacino e Hidróxido de Calcio sobre células madre de la papila apical de dientes permanentes inmaduros. Para esto se realizaron ensayos de proliferación celular *in vitro*, utilizando concentraciones farmacológicas de 1 mg/mL, 10 mg/mL y 100 mg/mL. Mediante lectura fluorométrica de placas se registraron los días 1, 5 y 7, las unidades relativas de fluorescencia (RFU) compatibles con viabilidad celular de los cultivos, para cada concentración farmacológica estudiada, cuyos valores promedio de unidades relativas de fluorescencia, fueron comparados con los valores promedios de unidades relativas de fluorescencia de los controles para determinar la variación del índice porcentual de proliferación celular.

Se observó en todos los cultivos celulares – Papila I, Papila II, Papila III y Papila IV - y para todas las concentraciones – 1 mg/mL, 10 mg/mL y 100 mg/mL – tanto de hidróxido de calcio como moxifloxacino, un efecto perjudicial sobre la proliferación de células madre de papila apical.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos, determinó mediante la aplicación del test *t de Student*, un valor $p = 0,8149$. Lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la citotoxicidad exhibida por Hidróxido de Calcio y Moxifloxacino sobre células madre de la papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros. Por lo tanto no se valida la hipótesis de investigación.

IX. RESUMEN

I. MARCO TEÓRICO

El tratamiento de la necrosis pulpar siempre ha sido un desafío, sobre todo cuando se trata de dientes permanentes inmaduros, donde debido a su incompleta formación radicular la probabilidad de fractura es alta y no se cuenta con paredes contra las que se pueda compactar un material de sellado endodóntico. Una apuesta de tratamiento innovador consiste en la utilización de la ingeniería de tejidos mediante un procedimiento denominado revascularización. Tiene tres elementos fundamentales que son las células madre, matriz de andamiaje y moléculas de señalización. En su etapa inicial, requiere de una óptima desinfección del sistema de conductos radiculares, se utiliza con este fin pastas antibióticas que han tenido efectos secundarios como tinción dentaria y citotoxicidad, afectando las células madre precursoras de la regeneración. La Asociación Americana de Endodoncia propone para evitar los efectos secundarios de las pastas antibióticas, la utilización de hidróxido de calcio como medicación intraconducto, destaca por otra parte, el moxifloxacino debido a su amplio espectro antibacteriano y acción sobre bacterias resistentes.

El siguiente trabajo de investigación tiene como propósito comparar *in vitro* la citotoxicidad de hidróxido de calcio y moxifloxacino sobre células madre de la papila apical de dientes permanentes inmaduros, con la finalidad de buscar nuevas alternativas farmacológicas en endodoncia regenerativa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante consentimiento informado escrito y verbal se obtuvo la papila apical de dientes permanentes inmaduros (1.8 y 2.8) de cuatro pacientes entre 17 y 26 años. Se procesaron las biopsias y cultivaron sus células madre en medio de cultivo DMEM suplementado, incubándolas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez obtenida confluencia celular (80%) se sembraron 5.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se condicionaron medios con diluciones de hidróxido de calcio y moxifloxacino en concentraciones de 1, 10 y 100 mg/mL, y sus respectivos controles con medio de cultivo DMEM suplementado sin fármaco. Se realizaron ensayos de proliferación celular en los días 1, 5 y 7, utilizando Resazurin 4 mg/L, mediante lectura fluorométrica de placas se obtuvieron las unidades relativas de fluorescencia (RFU), que representa actividad metabólica de las células.

RESULTADOS: Se calculó la variación del índice de proliferación celular, comparando los valores promedio RFU de los cultivos celulares condicionados a las diferentes concentraciones farmacológicas, con los valores promedio RFU de los controles sin condición farmacológica. Se realizó análisis estadístico aplicando el test *t de student* resultando un valor $p = 0,8149$.

CONCLUSIONES: No existe diferencia estadísticamente significativa entre la citotoxicidad exhibida por Hidróxido de Calcio y Moxifloxacino sobre células madre de la papila apical (SCAP) de dientes permanentes inmaduros.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Kim et al. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *Journal of Endodontics*. 2010 June.
2. Iwaya et al. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract.. *Dental Traumatology*. 2001.
3. Yadlapati et al. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal*. 2013.
4. Ruparel N. et al. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem of the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*. 2012.
5. Chuensombat et al. Cytotoxic Effects and Antibacterial Efficacy of a 3-Antibiotic. *Journal of Endodontics*. 2013 June; 39(6).
6. Diogenes . Translational Science in Disinfection for Regenerative. *Journal of Endodontics*. 2014 April ; 40.
7. Pinheiro et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*. 2004.
8. Hargreaves K. 6° Congreso Internacional de la Sociedad Brasileña de Endodoncia (SBENDO) y 3° Encuentro de la Sociedad de Endodoncia Latino Americana (SELA). 2014..
9. Endodontics AAo. AAE. [Online].; 2015. Available from: www.aae.org.
10. Barrancos J. *Operatoria Dental*. 4th ed.: Ed. Médica Panamericana; 2006.
11. Ferraris G. *Histología y embriología bucodental*. 2nd ed.: Editorial Médica Panamericana; 2003.
12. Lindhe. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5th ed.: Ed. Médica Panamericana; 2000.
13. Torabinejad W. *Endodoncia. Principios y Práctica*. 4th ed.: Elsevier; 2010.
14. Leonardo MR. *Endodoncia. Tratamiento de conductos radiculares. Principios técnicos y biológicos*. 1st ed.: Artes Médicas Latinoamérica; 2009.

15. Mohammadi. Calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011; 44(697-730).
16. Plascencia. Apexificación mediante creación de barrera apical con MTA: serie de 5 casos. *Revista Tamé*. 2014; 2 (6)(184-189.).
17. Cvek. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*. 1992; 8.
18. Hargreaves K. Biologically based treatment of immature teeth with pulpal necrosis. A case series. *Journal of Endodontics*. 2008; 34.
19. Neeraj M. Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: Past, current and future. *Australian Endodontic Journal*. 2012; 38.
20. González. Revascularización en dientes permanentes con ápice inmaduro y necrosis pulpar: Revisión bibliográfica. *Revista ADM*. 2014.
21. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative medicine*. 2009.
22. Miura M,GS,ZM,LB,FLW,RPG,&SS. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003.
23. Sonoyama. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *Journal of Endodontics*. 2008 February.
24. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration.. *J Dent*. 2008.
25. Huang GT. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*.. 2008 June; 34(6)(645–651.).
26. Chartier. Seminario Protocolos de Revascularización utilizados desde el inicio a la actualidad. Valparaíso: Universidad de Valparaíso; 2013.
27. Sato H. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *International Endodontic Journal*. 1996; 29(118).

28. Cheek. Dental and Oral Discolorations Associated with Minocycline and Other Tetracycline Analogs. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 1999; 11.
29. Thibodeau. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatric Dentistry*. 2007 February.
30. Vijayaraghavan. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*.. 2012..
31. Fouad. The Microbial Challenge to Pulp Regeneration. *Advances in Dental Research*. 2011.
32. Mohammadi. Calcium hydroxide: a review. *International Dental Journal*. 2005.
33. Siqueira. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *Journal of Endodontics*. 1999.
34. Siqueira. Antifungal effects of endodontic medicaments. *Australian Endodontic Journal*. 2001.
35. Bystrom. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol, and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics & Dental Traumatology*. 1985.
36. Sjogren. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*. 1991.
37. Shuping. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications.. *Journal of Endodontics*. 2000.
38. Krasemann. Moxifloxacin in acute exacerbations of chronic bronchitis – a bacteriological and clinical meta-analysis. In ; 1999; Berlín.
39. Limeres J. Aplicación del moxifloxacino en el ambito de la Odontología. Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
40. Biotium I. - Resazurin Cell Viability Assay Kit. [Online].; 2011 [cited 2015]. Available from: Website: www.biotium.com.
41. Escobar. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación en líneas celulares tumorales. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2010..

42. StataCorp (2015). Stata: Release 14. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP..
43. Jung. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod.* 2008; 34(876-87).
44. Chueh. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod.* 2009; 35(160-4).
45. Sato. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth.. *Oral Microbiology & Immunology.* 1993.
46. Ranganathan. Stem cells of the dental pulp. *Indian Journal of Dental Research.* 2012.
47. Huang GT. Apexification: the beginning of its end. *International Journal of Endodontics.* 2009.
48. Hargreaves K. Treatment Options: Biological Basis of Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of Endodontics.* 2013.
49. Hudman. Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity. SpringerPlus. 2013 Febrero.
50. A.D.A.M..[Online].; 2015 [cited 2015. Available from: www.interactiveanatomy.com.
51. Cohen. *Vías de la pulpa.* 10th ed. Barcelona: Elsevier; 2011.

XI. ANEXOS

Anexo N°1:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....

RUT.....

Dono voluntariamente el/los diente/s que me han extraído para llevar a cabo la investigación "Comparación *in vitro* de la citotoxicidad del Hidróxido de Calcio y Moxifloxacino en células madre de la papila apical" que se realizará en la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso - Chile, año 2015.

He sido informado acerca del procedimiento a efectuar, comprendiendo que la finalidad de éste es mejorar alternativas terapéuticas actuales y no perjudica la salud de los donantes, puesto que será realizado en laboratorio.

Se me garantiza confidencialidad de todos los datos obtenidos, teniendo acceso a los resultados conseguidos en la investigación. Éstos podrán eventualmente ser utilizados en forma anónima en medios científicos.

.....

Firma

Valparaíso..... de..... de 2015.

Anexo N°2:

Prueba *T de Student*

```
. ttestd_moxi_hidro == 0
```

```
One-sample t test
```

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
d_moxi-h	4	-.1404761	.54997	1.09994	-1.890726	1.609774

```
mean = mean(d_moxi_hidro)
```

```
Ho: mean = 0
```

```
t = -0.2554
```

```
degrees of freedom = 3
```

```
Ha: mean != 0
```

```
Pr(|T| > |t|) = 0.8149
```