

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**EFFECTO DEL COLÁGENO HIDROLIZADO SOBRE CÉLULAS MADRE DE
PAPILA APICAL EXPUESTAS A UNA PASTA DOBLE ANTIBIÓTICA IN
VITRO**

POR

IRIS LILIÁN ESPINOZA GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA
DE ENDODONCIA**

OCTUBRE, 2018

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

**EFFECTO DEL COLÁGENO HIDROLIZADO SOBRE CÉLULAS MADRE DE
PAPILA APICAL EXPUESTAS A UNA PASTA DOBLE ANTIBIÓTICA IN
VITRO**

Comité de Tesis

DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA

Director de Tesis

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO

Co Director de Tesis

DRA. EYRA ELVYRA RANGEL PADILLA

Asesor metodológico

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Asesor estadístico

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

**EFFECTO DEL COLÁGENO HIDROLIZADO SOBRE CÉLULAS MADRE DE
PAPILA APICAL EXPUESTAS A UNA PASTA DOBLE ANTIBIÓTICA IN
VITRO**

Comité Académico

Presidente

Secretario

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al *Dr. Casiano Del Angel Mosqueda* por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo y por ser mi director de tesis, ya que sin su apoyo y dedicación esta investigación no habría sido posible y al *Dr. Jorge Jaime Flores Treviño* por su aportación a este proyecto de investigación y siempre alentarme a seguir adelante con mi tesis.

A mi esposo, que a pesar de que estábamos recién casados, me apoyó para seguir mi sueño de ser endodoncista, siempre brindándome su amor incondicional, dándome ánimos cuando más lo necesitaba y, cuando sufrí el accidente, darme todas las armas, para continuar con mi maestría y ser mi fuente de alegría, cada vez que llegaba cansada a nuestro hogar, poderlo ver sonriente y hacer que todas las preocupaciones se convirtieran en enseñanzas y desafíos.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado, por siempre ayudarme en mi casa y mi negocio, para que pudiera enfocarme en mis estudios. Por todas las veces que me trajeron al posgrado y me esperaron afuera para recogerme, por cada palabra de experiencia que compartieron conmigo y cada muestra de amor.

A Dios, que estoy segura que estuvo conmigo en cada momento, en cada paciente y en cada clase conmigo. Por estar conmigo en mi enfermedad y ayudarme de estar en una silla de ruedas a poder entrar a mi tercer semestre con mi andador y mi uniforme modificado y a pesar de estar más de un año con dolor y con medicamentos fuertes sé que gracias a Él pude terminar mi sueño y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Endodoncia.....	6
4.2 Microbiología pulpar.....	8
4.3 Medicamentos intraconducto	10
4.4 Células madre de la papila apical.....	12
4.5 Regeneración en endodoncia.....	18
4.6 Colágeno.....	21
4.7 Colágeno hidrolizado.....	23
5. METODOS.....	25
6. RESULTADOS.....	29
7. DISCUSIÓN.....	35
8. CONCLUSIONES.....	37
9. LITERATURA CITADA	38
10. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	
Página	
1.	Comparación entre grupo control y grupos experimentales sobre.....33 la viabilidad de células madre de papila apical (SCAPs)

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aislamiento y cultivo de células madre de la papila apical (SCAPs)	29
2. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble Antibiótica (DAP) sobre células madre de la papila apical (SCAPs)	30
3. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) 10 mg/mL con colágeno hidrolizado sobre células madre de la papila apical (SCAPs)	31
4. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) 1 mg/mL con colágeno hidrolizado a sobre células madre de la papila apical (SCAPs)	31
5. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) 0.5 mg/mL con colágeno hidrolizado a sobre células madre de la papila apical (SCAPs)	32
6. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) 0.25 mg/mL con colágeno hidrolizado a sobre células madre de la papila apical (SCAPs)	32
7. Citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) 0.125 mg/mL con colágeno hidrolizado a sobre células madre de la papila apical (SCAPs).	33
8. Grafica comparativa de citotoxicidad posterior a 24h de exposición a la pasta doble antibiótica (DAP) en diferentes concentraciones y diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado.	34

NOMENCLATURA

DAP	Pasta doble antibiótica
TAP	Pasta triple antibiótica
NaOCl	Hipoclorito de sodio
SCAPs	Células madre de papila apical
FMCA	Ensayo de citotoxicidad por fluorometría
FDA	Diacetato de fluoresceína
PBS	Buffer de fosfatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM-F12	Dulbecco's modified Eagle's medium-Ham's F12
FBS	Suero fetal bovino
CHX	Clorhexidina
PDLSCs	Células madre de ligamento periodontal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MSCs	Células madre mesenquimales
DPSCs	Células madre de pulpa dental

TESISTA: Iris Lilián Espinoza García
DIRECTOR DE TESIS: Dr. Casiano del Angel Mozqueda
CODIRECTOR DE TESIS: Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

RESUMEN

Introducción: La pasta doble antibiótica (DAP) se ha usado ampliamente durante los procedimientos de regeneración endodóntica, debido a su potencial antimicrobiano y bioinductivo, a pesar de estas propiedades, su biocompatibilidad no siempre es aceptable. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico de la DAP en presencia de colágeno hidrolizado sobre células madre de la papila apical (SCAPs) *in vitro*. **Metodología:** la toxicidad de la DAP con o sin colágeno se analizó en diferentes concentraciones (10, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg / mL) y con colágeno hidrolizado a (0, 0.1, 0.3, 0.5 mg /mL) sobre células madre de papila apical (SCAPs) utilizando microscopía de campo claro y el ensayo de citotoxicidad por fluorimetría (FMCA). **Resultados:** La exposición de las SCAPs a la DAP indujo la muerte celular de forma dependiente de la dosis ($P < 0.05$). La adición de colágeno hidrolizado tipo I DAP 0.25 y 0.125 con colágeno hidrolizado a 0.5 y 0.5 mg/mL se detectó un número significativo de células viables ($p < 0.05$). **Conclusiones:** Estos datos sugieren que el colágeno hidrolizado podría usarse como un coadyuvante para mejorar la biocompatibilidad de la DAP utilizada en endodoncia regenerativa.

Palabras clave: Biomateriales, Pasta doble antibiótica, Citotoxicidad, Células madre de papila apical, Colágeno hidrolizado.

THESIST: Iris Lilián Espinoza García
DIRECTOR OF THESIS: Dr. Casiano del Angel Mozqueda
CODIRECTOR OF THESIS: Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
FACULTY OF DENTISTRY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

ABSTRACT

Introduction: Double antibiotic paste (DAP) has been widely used during endodontic regeneration procedures, because of their antimicrobial and bioinductive potential, despite these proprieties their biocompatibility not always is acceptable **Objective:** The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effect of a DAP in the presence of hydrolyzed collagen paste on stem cells from the apical papilla (SCAPs) *in vitro*. **Methodology:** The toxicity of DAP with or without was analyzed in different concentrations (10, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL) with hydrolyzed collagen at 0, (0.1, 0.3, 0.5 mg/mL) apical papilla stem cells (SCAPs) using light-field microscopy and the fluorometry cytotoxicity assay (FMCA). **Results:** The exposure of SCAPs to DAP induced cell death in dosis -dependent manner ($P < 0.05$). The addition of hydrolyzed collagen type I DAP 0.25 and 0.125 with hydrolyzed collagen at 0.5 and 0.5 mg/mL a significantly number of viable cells was detected ($p < 0.05$). **Conclusions:** These data suggest that hydrolyzed collagen could be used as a coadjuvant to improve the biocompatibility of DAP used in regenerative endodontics.

Key words: Biomaterials, Double antibiotic paste, Cytotoxicity, Stem cells from the apical papilla, Hydrolyzed collagen.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica regenerativa ha demostrado relevancia clínica para tratar dientes inmaduros con pulpa necrótica (ChenSJ, ChenL.P., 2016). El objetivo principal de este tratamiento es continuar con el desarrollo de la raíz, reduciendo el riesgo de fracturas asociadas con una apexificación con hidróxido de calcio. (Adel *et al.*, 2014).

La medicación intraconducto en procedimientos regenerativos es un factor crítico para obtener resultados exitosos (McTigue *et al.*, 2013). Al respecto, la mezcla tradicional de antibióticos (pasta triple antibiótica) (TAP) que contiene ciprofloxacino, metronidazol y minociclina ha demostrado ser eficaz. Los medicamentos intraconducto utilizados son el Ca (OH), formocresol y la pasta doble antibiótica (DAP). La DAP está compuesta de los mismos antibióticos, excepto la minociclina, la cual ha demostrado efectos sobre la coloración del diente (Chuensombat *et al.*, 2013).

En este contexto, para obtener una consistencia aceptable de la DAP, se requiere una alta concentración de estos antibióticos (Daniel *et al.*, 2016). Algunas investigaciones han descrito su efecto citotóxico sobre las células madre de papila apical (SCAPs), (Ruparel *et al.*, 2012) y células madre de pulpa dental (DPSCs) (Sabrah *et al.*, 2015). por lo tanto, estudios recientes han recomendado el uso de concentraciones más bajas de estos medicamentos que varían de 0.1 a 2 mg /mL para disminuir su citotoxicidad (Daniel *et al.*, 2016).

Por otro lado, el colágeno hidrolizado tipo 1 se ha utilizado para aplicaciones biológicas en células mamíferas (De Almeida *et al.*, 2010). Esta molécula contiene péptidos de diferentes pesos moleculares que se extraen de tejidos conectivos animales. El colágeno hidrolizado contiene hidroxiprolina, prolina y glucina, y se considera seguro como un suplemento oral observándose efectos positivos regenerativos en el cartílago óseo y en la piel (De Almeida *et al.*, 2010).

La ingestión de colágeno hidrolizado puede estimular la proliferación de fibroblastos, estimulando así la producción de colágeno. En estudios *in vitro* y realizados en ratones e *in vivo* han demostrado que, los péptidos de colágeno hidrolizado tienen propiedades quimiotácticas sobre los fibroblastos o una influencia en el crecimiento de los fibroblastos. (Shigemura *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que el colágeno hidrolizado ha aumentado la densidad y el diámetro de los fibroblastos y la densidad de las fibrillas (Tanaka *et al.*, 2009).

Oros efectos de esta molécula ha demostrado tener una actividad antihipertensiva, que inhibe el efecto de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y promueve la inhibición del daño cardiovascular a las células endoteliales a través de su actividad inhibitoria de la ECA y la regulación del óxido nítrico y la molécula de adhesión intercelular-1. (Saiga-Egusa *et al.*, 2009).

Algunos estudios han demostrado que la DAP induce citotoxicidad de forma dependiente de la concentración en células humanas (Labban *et al.*, 2014). Informes anteriores han mostrado cómo la DAP induce efectos citotóxicos in vitro, sin embargo, la influencia del colágeno hidrolizado no ha sido investigados.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del colágeno hidrolizado tipo 1 para disminuir la citotoxicidad del DAP in vitro. La hipótesis es que el colágeno hidrolizado ejerce una influencia positiva en la viabilidad de (SCAPs). Los resultados proporcionan evidencia de que el colágeno hidrolizado es un excelente coadyuvante para la regeneración endodóntica.

2. HIPÓTESIS

El colágeno hidrolizado disminuye la toxicidad de la pasta doble antibiótica (DAP) sobre células madre de papila apical (SCAPs) in vitro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos General

Evaluar el efecto del colágeno hidrolizado sobre células madre de papila apical (SCAPs) expuestas a una pasta doble antibiótica (DAP) in vitro.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar y cultivar una población de SCAPs derivadas de premolares humanos utilizando disgregación enzimática.
- Determinar la tasa de viabilidad celular de las SCAPs expuestas a la DAP y diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado utilizando el método de FMCA.

4. ANTECEDENTES

4.1 Endodoncia

La endodoncia engloba un diagnóstico diferencial y tratamiento del dolor orofacial (Barnes y Patel, 2011), tratamiento de conducto que implica eliminar la pulpa dental infectada y exudados peris radicales (Rajeswari *et al.*, 2016) para posteriormente conformar, limpiar y obturar los conductos radicales (Wong *et al.*, 2014) o tratamiento mediante endodoncia quirúrgica (Segura Egea *et al.*, 2015)

El objetivo principal consiste en conservar la dentición, aliviar el dolor y reestablecer la capacidad funcional y el aspecto estético de los pacientes. (Walton y Torabinejad, 2010).

Juega un papel importante para proporcionar a los pacientes la atención dental integral de alta calidad (Schilder, 2006).

Dentro de esta rama se reduce la carga bacteriana de los conductos con diferentes técnicas de irrigación (Alderson *et al.*, 2004).

El examen clínico incluye diferentes procedimientos tales como inspección, sensibilidad de la pulpa a estímulos térmicos o eléctricos y dolor a la palpación o percusión. Aparentemente, estos procedimientos no cambiaron mucho en el último siglo (Majare *et al.*, 2012).

Las causas más frecuentes de la muerte de la pulpa son las caries extensas, las obturaciones profundas, el traumatismo, la fractura de un diente, y la enfermedad periodontal o de la encía. Cuando la pulpa entra en contacto con bacterias procedentes de las caries o saliva se puede infectar el interior del diente y, en ausencia de tratamiento, la infección se puede acumular en la punta de la raíz para formar un absceso. Con el paso

del tiempo, el hueso que proporciona soporte al diente se destruye, y es frecuente que la infección se acompañe de dolor de tumefacción. (Cohen y Hargreaves 2011).

La inflamación de la pulpa dental (pulpitis) se ha visto como una secuencia estrechamente regulada de eventos vasculares y celulares mediados por factores moleculares (Ahlquist y Franzen, 1994).

La pulpitis es causada típicamente por una infección oportunista del espacio pulpar por microorganismos orales (Hahn *et al.*, 1994).

Con base en los signos, los síntomas y el examen de los pacientes, se describen cuatro condiciones pulpares clínicas: normal, reversible, inflamada, irreversiblemente inflamada o necrótica (Levin *et al.*, 2009).

La principal diferencia clínica entre la pulpitis reversible e irreversible es la respuesta de la pulpa al estímulo térmico. La pulpitis reversible presenta una respuesta exagerada pero no prolongada al estímulo frío. Por otra parte, la pulpitis irreversible se caracteriza por un dolor constante y espontáneo con una respuesta exagerada y prolongada al estímulo frío (Michaelson y Holland G, 2002).

En la pulpitis reversible, se espera que la pulpa se recupere después de la eliminación del estímulo causante. Por el contrario, si la pulpa se inflama irreversiblemente, no se espera la cicatrización y se indica pulpectomía (es decir, extracción completa de la pulpa dental) (Staquet *et al.*, 2011).

El dolor o la sensibilidad a la percusión generalmente se interpreta como un signo de inflamación apical. Dado que esto generalmente es causado por una infección bacteriana de tejido pulpar necrótico, la sensibilidad a la percusión puede indicar indirectamente una pulpa no vital (Hasler y Mitchell, 1970).

4.2 Microbiología pulpar

La infección endodóntica puede ser primaria o secundaria. En general, la infección primaria implica inflamación de la pulpa e infección del conducto radicular después de la invasión de microbios o subproductos microbianos, que eventualmente da como resultado la inflamación de los tejidos de soporte, es decir, la periodontitis apical. La infección secundaria (o infección posterior al tratamiento) ocurre como reinfección, infección remanente (persistente) o infección recurrente en dientes que han sido previamente tratados del conducto radicular (Haapasalo *et al.*, 2003).

Las infecciones endodónticas primarias son polimicrobianas, son predominantemente especies de *Bacteroides*, *Prophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Camphylobacter* (Rocas *et al.*, 2010).

La enfermedad posterior al tratamiento asociada con un tratamiento de endodoncia deficiente puede ser causada como resultado de no usar dique de goma, acceso deficiente que da como resultado canales radiculares no tratados, instrumentos inadecuados, desinfección inadecuada, llenado inadecuado del conducto radicular o errores iatrogénicos, instrumento fracturado, perforación (Patel y Barnes., 2011).

El retratamiento del conducto radicular se considera más difícil en comparación con el tratamiento primario del conducto radicular, ya que generalmente hay obstáculos intracanales a superar, p. remoción de gutapercha, materiales intracanales tales como puntas de plata, postes o instrumentos fracturados, corrigiendo errores iatrogénicos como perforaciones (Roding *et al.*, 2012).

Con los años, la mayoría de los estudios han demostrado que la microbiota recuperada de los dientes resistentes al tratamiento endodóntico predominantemente consistía en bacterias gram-positivas, especialmente *Enterococcus faecalis* (Murad *et al.*, 2014).

E. faecalis es un patógeno oportunista asociado con diferentes formas de enfermedades peri radiculares, incluidas las primarias e infecciones endodónticas persistentes (Ròçaset *et al.*, 2004).

Esto se debe a su capacidad de adherirse a la dentina y penetrar a lo largo de los túbulos dentinarios y colonizar la dentina en forma de biofilm (Distel *et al.*, 2002).

Son capaces de producir estructuras de superficie celular (por ejemplo, cápsula) o secreciones extra celulares por ejemplo, polisacárido extracelular, puede ofrecer protección a todas las bacterias residentes de diversas tensiones ambientales, como cambios de pH, choque osmótico, radiación. También alivia el efecto de cualquier sustancia nociva que se difunda a través de la matriz EPS antes de llegar a los microorganismos (Davey y O´ Toole, 2000).

Las bacterias y los hongos del microbioma oral humano pueden invadir el sistema de conductos de los dientes. La penetración de bacterias en los túbulos dentinarios puede alcanzar hasta 300 micras (Siqueira y Rôças, 2002).

Además de bacterias, varios estudios han informado sobre la aparición de hongos en las infecciones primarias del conducto radicular. (Sen *et al.*, 1995).

Dentro de estos hongos se encuentra *Cándida albicans* en el 21% de las muestras tomadas de los conductos radiculares utilizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa. También se han encontrado microorganismos similares a la levadura en los conductos radiculares de los dientes obturados en los que el tratamiento ha fallado (Nair *et al.*, 1990).

Debido a que tenemos dentro del conducto tanto bacterias como hongos, es crucial explorar las diluciones óptimas de medicamentos antibióticos que tienen un efecto antibacteriano contra la biopelícula bacteriana establecida sin comprometer la supervivencia de las células madre de la pulpa dental humana (Sabrah *et al.*, 2015).

Uno de los pasos importantes al realizar el tratamiento de endodoncia es la irrigación del conducto radicular, ya que disuelve tejidos de pulpa vitales o necróticos, interrumpe biofilms endodónticos, neutraliza endotoxinas y elimina la capa de barrillo dentinario (Neelakantan *et al.*, 2017).

Dentro de los irrigantes, otro muy importante es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un agente quelante recomendado como adyuvante en la terapia del conducto radicular. Muchos autores han demostrado su eficacia para eliminar la porción inorgánica de la capa de frotis (Haapasalo *et al.*, 2014).

Algunos estudios concluyeron que la aplicación combinada de EDTA al 17% y 2.5% NaOCl reduce significativamente la cantidad de biopelícula intraconducto (Ozdemir *et al.*, 2010).

Uno de los medicamentos más estudiados es el hipoclorito de sodio (NaOCl) se considera el desinfectante más potente en endodoncia debido a su excelente capacidad para disolver tejidos vitales y necróticos, además de su efecto antimicrobiano (Zehnder, 2006).

4.3 Medicamentos intraconducto

Los protocolos clínicos para la endodoncia de visitas múltiples incluyen el uso rutinario de pastas de medicamentos colocadas en el conducto para lograr la desinfección (Kiran *et al.*, 2016)

Uno de estos medicamentos es el hidróxido de calcio que se utiliza entre las citas para mejorar la incidencia de conductos libres de bacterias; tiene propiedades terapéuticas, es biocompatible, inhibe la actividad osteoclástica, puede disolver el tejido orgánico y tiene propiedades regenerativas. A pesar de estas ventajas, es insuficiente para eliminar completamente las bacterias de los conductos radiculares (Kvist, 2004).

Se cree que la desinfección del sistema de conducto radicular es esencial para el éxito de la regeneración endodóntica ya que la infección previene la regeneración, la reparación y la actividad de las células madre (Lin *et al.*, 2014).

El medicamento intraconducto más utilizado procedimientos de revascularización y endodoncia regenerativa es la mezcla de ciprofloxacino, metronidazol, y minociclina (TAP), que también se llama pasta triple antibiótica (Sato *et al.*, 1996).

Esta combinación ha demostrado ser altamente eficaz contra las bacterias comúnmente encontradas en sistemas de conductos radiculares infectados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Reynolds *et al.*, 2009).

También se ha demostrado que tienen una excelente actividad contra *E. faecalis* (Maniglia *et al.*, 2016).

La razón para el uso de TAP fue una serie de estudios de infecciones endodónticas en dientes temporales donde una combinación de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina a una concentración de 100 µg / mL de cada fármaco eliminó completamente las bacterias cultivables de los conductos infectados *in vitro* y *in vivo* (Takushige *et al.*, 2004).

Se han usado otros medicamentos intraconducto incluyendo Ca (OH) 2; formocresol; la combinación de metronidazol y ciprofloxacino (doble pasta antibiótica, DAP); y la combinación de metronidazol, ciprofloxacino, y cefaclor (pasta triple antibiótica modificada) (Thibodeau *et al.*, 2007).

Para superar el problema de decoloración asociado con la presencia de minociclina en TAP, se propuso DAP y se utilizó con éxito en la regeneración endodóntica (Iwaya *et al.*, 2001).

Aunque el uso de TAP ha sido reportado en el 51% de los casos publicados de regeneración endodóntica (Diogenes *et al.*, 2013).

Uno de los problemas de estos medicamentos es que el medicamento debe eliminarse por completo del sistema de conductos antes de la obturación. Los investigadores han demostrado que los restos de medicamentos impiden la penetración de selladores o cementos en las paredes de la dentina del conducto radicular, ya que actúan como una barrera física a lo largo del interfaz sellador / dentina (Guiotti *et al.*, 2014).

Además, las concentraciones clínicas de DAP y TAP pueden conducir a una reacción inflamatoria moderada en los tejidos subcutáneos y son citotóxicas para las células madre de la pulpa dental humana. Por lo tanto, la eliminación completa de medicamentos del conducto radicular es un paso importante en el tratamiento exitoso del conducto radicular (Kamocki *et al.*, 2015).

El protocolo AAE recomienda TAP en concentraciones no mayores a 0.1 mg / mL. A esta concentración, TAP es propicio para la supervivencia y proliferación de células madre (Marthin *et al.*, 2013).

4.4 Células madre de la papila apical (SCAPs)

El término ruso fue propuesto para uso científico por el histólogo ruso Alexander Maksimov en 1909. Alexander Maximov fue el primero en sugerir la existencia de células madre hematopoyéticas (HSC) con la apariencia morfológica de un linfocito, capaz de migrar a través de la sangre a nichos microecológicos eso les permitiría proliferar y diferenciarse a lo largo de (Ramalho y Willenbring H, 2007).

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las células madre se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener, por un lado, su autorrenovación, con producción de otras semejantes a ellas y, por otro, generar células hijas que se diferencian en diversos tipos de unidades

especializadas, tanto morfológica como funcionalmente. Además de lo anterior se le han añadido otras propiedades, atribuibles a sus capacidades para la implantación persistente en tejidos sanos y dañados (Hernandez, *et al.*, 2004).

Las células madre se han definido como células clonogénicas, con un amplio potencial de auto *renovación* (definida como la capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen, manteniéndose al mismo tiempo en un estado indiferenciado), así como la elevada capacidad de *proliferación* (posibilidad de la célula para dividirse sin cambiar su fenotipo celular indiferenciado) y su potencial de *diferenciación* (potencial para modificar el fenotipo de la célula de origen en distintos tipos celulares diferentes al tejido embrionario original en varias líneas celulares como médula ósea, sangre periférica, pulpa dental y ligamento periodontal, entre otros) (Verfaillie, 2002)

Las células madre de la cavidad bucal poseen un potencial de multidiferenciación y, por ende, pertenecen al grupo de las unidades adultas, capaces de formar células con carácter osteodontogénico, adipogénico y neurogénico. han dedicado especial atención al estudio de las principales células madre en dicha cavidad e identificado 4 grupos: células madre en pulpa de dientes temporales (SHED), células madre en pulpa de dientes permanentes, células madre presentes en espacios periodontales y células madre de la mucosa bucal (González *et al.*, 2011).

Según su origen, existen dos tipos principales de células madre: las células madre embrionarias y las células madre postnatales o adultas. Las células madre embrionarias se cosecharon a partir de embriones, son células derivadas de la masa celular interna del blastocisto (embrión en etapa temprana, 4-5 días de vida, consta de 50-150 células) de embrión en estadio de mórula anterior. Estas son las células que forman las tres capas germinales y son capaces de desarrollar más de 200 tipos de células (Thomson *et al.*, 1998).

La biología de células madre se ha convertido en un campo importante para la comprensión de la regeneración tisular. En general, las células madre se definen por tener dos propiedades principales. Primero, ellos son capaces de autorrenovación. En segundo lugar, cuando se dividen, algunas células hijas dan lugar a células que mantienen el carácter de células madre o dan lugar a células diferenciadas. Las MSCs se han identificado en muchos tejidos y son capaces de diferenciarse en muchos linajes de células cuando se cultivan en condiciones definidas, incluyendo linajes osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos, miogénicos y neurogénicos (Wei *et al.*, 2008).

Pueden clasificarse según sus capacidades para diferenciarse como totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Las células madre totipotentes son aquellas que se pueden implantar en el útero de un animal vivo y dar lugar a un organismo completo. Las células madre pluripotentes son aquellas que pueden dar lugar a todas las células de un organismo, excepto sus tejidos extra embrionarios, como la placenta. Las células madre multipotentes son células madre adultas que sólo generan linajes específicos de células (Nadig, 2009).

Normalmente se usan dos criterios para definir las células madre: (1) capaz de autorrenovación y (2) dan lugar a células progenitoras que eventualmente diferencian en células especializadas (Sonoyama *et al.*, 2006).

El diente es un órgano multiestructural compuesto por los tejidos altamente mineralizados del esmalte, la dentina y el cemento, así como los tejidos conectivos blandos, incluida la pulpa dental y el periodonto asociado (Needleman *et al.*, 2006).

La pulpa dental se encuentra en la cavidad pulpar central de cada diente, llamada "cámara pulpar", y contiene una población heterogénea representada por fibroblastos, células endoteliales, neuronas, odonto-osteoprogenitores, células inflamatorias e inmunes (Ledesma *et al.*, 2016).

Esta compleja estructura proporciona rigidez y estabilidad; sin embargo, los dientes siguen siendo vulnerables al daño causado por traumatismos mecánicos, productos químicos, cáncer e infecciones bacterianas. A diferencia del hueso, que puede remodelar y reparar, los dientes no experimentan una regeneración completa y demuestran procesos reparativos limitados (Shi *et al.*, 2005).

En general, se cree que la formación de dentina de raíz es el resultado de la señalización de forma la vaina epitelial de Hertwig a las células mesenquimales indiferenciadas adyacentes, que luego se convierten en odontoblastos que son responsables de la formación de la raíz (Tziafas *et al.*, 1995).

Los factores de crecimiento y las moléculas de señalización tienen la capacidad de estimular la proliferación celular y la diferenciación celular. Los miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (Scheller *et al.*, 2009).

La capacidad de crear nuevos odontoblastos a lo largo de la vida en respuesta al daño sugirió una fuente de células madre dentro de la pulpa dental (Gronthos *et al.*, 2000).

Como la terapia de endodoncia regenerativa que se ha convertido en una alternativa viable en el tratamiento de dientes inmaduros con necrosis pulpar. Desde su inicio, varios casos exitosos y se han publicado informes con avances sustanciales en comprensión de los principios biológicos implicados en la regeneración del complejo pulpodentinario, incluida la evaluación de células madre, factores de crecimiento y señalización moléculas implicadas en la diferenciación de células madre en diversos tipos de células (Huang *et al.*, 2009).

Además, se ha hecho evidente a partir de estudios preclínicos y de informes de casos clínicos que un procedimiento regenerativo exitoso de un diente con pulpa necrótica requiere una adecuada desinfección del sistema de conducto radicular.

Hasta la fecha, se han aislado varios tipos de células madre adultas de los dientes, incluidas las células madre de la pulpa dental (DPSCs), las células madre de los dientes deciduos humanos exfoliados (SHED), las células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), células madre progenitoras del folículo dental (DFPC) y (SCAPs) (Sonoyama *et al.*, 2006).

La papila apical es apical al diafragma epitelial, y hay una zona apical rica en células situada entre la papila apical y la pulpa. Es importante destacar que existen células madre / progenitoras localizadas tanto en la pulpa dental como en la papila apical, pero tienen características algo diferentes (Sonoyama *et al.*, 2008).

Debido a la ubicación apical de la papila apical, este tejido puede verse beneficiado por su circulación colateral, que le permite sobrevivir durante el proceso de necrosis pulpar (Huang *et al.*, 2008).

Se encuentran en las papilas apicales del ápice de la raíz del diente en desarrollo, con las características de potencial altamente proliferativo, migratorio y regenerativo, y son capaces de formar dentina in vivo (Sonoyama *et al.*, 2006).

Las SCAPs aisladas de un precursor de pulpa radicular, expresan marcadores mesenquimatosos y pueden diferenciarse en células de tipo odontoblastos y producir tejido similar a la dentina en sistemas de estudio tanto in vitro como in vivo (Sonoyama *et al.*, 2006).

Las características histológicas en la unión de la pulpa y la papila apical no han sido bien descritas. La papila apical parece ser histológicamente distinta de la pulpa y contiene células madre mesenquimales humanas (Gronthos *et al.*, 2002).

Se sabe que la papila dental contribuye a la formación de los dientes y finalmente se convierte en tejido de pulpa porque la raíz continúa desarrollándose después la etapa de la campana, la ubicación de la papila dental se vuelve apical para el tejido de la pulpa (Sonoyama *et al.*, 2007).

La papila apical parece ser histológicamente distinta de la pulpa y contiene células mesenquimales (MSC) potentes únicas (Sonoyama *et al.*, 2008).

También SCAPs junto con PDLSCs pueden formar una estructura de raíz cuando se siembran en el andamio basado en hidroxiapatita y se implantan en las mandíbulas de cerdo (Rodríguez *et al.*, 2011).

Existen trabajos que informaron que SCAPs expresan una amplia gama de proteínas angiogénicas reguladoras, que incluyen, pero no se limitan al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), angiopoyetina-1, metaloproteinasas de matriz, endostatina, trombospondina-1 y proteína-3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (Ratajczak *et al.*, 2016).

Los procedimientos de endodoncia regenerativa aplicados actualmente (REP) comprenden la inducción de un coágulo de sangre, causando la liberación de factores de crecimiento secuestrados y la atracción de células endógenas, como las SCAPs (Kahler *et al.*, 2017).

Se ha formulado la hipótesis de que las células madre en la pulpa vital restante o la papila apical median en la regeneración tisular (Lovelace *et al.*, 2011).

Los procedimientos de endodoncia regenerativa clínica dependen principalmente de sustancias químicas desbridamiento del espacio del canal con mínima o ninguna instrumentación mecánica (Thibodeau *et al.*, 2004).

Las SCAPs también han sido usadas con efectos sorprendentes en la revascularización de dientes inmaduros con necrosis pulpar. Este proceder incluye la desinfección del canal radicular y la inducción del sangrado intracanal, el cual introduce células madre originadas en la papila apical, de donde se forma un coágulo sanguíneo que favorece la producción de una matriz de tejido estéril, a la que se le han proporcionado nuevas células, capaces de crecer y restablecer la vitalidad pulpar (Cohenca *et al.*, 2013).

La disciplina emergente de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa se esfuerza por utilizar un enfoque racional basado en señales morfogenéticas para la inducción tisular, las células madre / progenitoras que responden y el andamio para mantener y preservar el microambiente (Scheller *et al.*, 2009).

4.5 Regeneración en Endodoncia

La endodoncia regenerativa es un campo emocionante y en desarrollo en el tratamiento de dientes inmaduros con conductos radiculares y puede dar como resultado la maduración de la raíz y el cierre apical (Huang *et al.*, 2008).

Se define como la reconstitución del tejido dañado por tejido similar al tejido original y la restauración de las funciones biológicas (Kumar *et al.*, 2014).

La reparación es la sustitución del tejido dañado por tejido diferente del tejido original y la pérdida de funciones biológicas (Majno y Joris, 2004)

Se ha definido como "procedimientos basados en la biología diseñados para reemplazar las estructuras dañadas, incluidas las estructuras de la raíz y la dentina, así como las células del complejo pulpa-dentina" (Diogenes *et al.*, 2016).

Las consideraciones clínicas para los protocolos de endodoncia regenerativa son: (1) desinfección del sistema de conductos radiculares (2), provisión de un andamio que a menudo implica laceración del tejido periapical para inducir un coágulo sanguíneo e introducir actividad de células madre dentro del conducto radicular (3) y un sello coronal adecuado para prevenir la reinfección (Bezgin y Sonmez ,2015).

Las consideraciones clínicas de la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) para procedimientos endodónticos regenerativos definen el éxito por tres medidas: Meta principal (esencial): la eliminación de síntomas y la evidencia de curación ósea Objetivo

secundario (deseable): aumento del grosor de la pared de la raíz y / o aumento de la longitud de la raíz Objetivo terciario: respuesta positiva a las pruebas de vitalidad (AAE).

Se han reportado varios casos de formación incompleta de raíces. Estos han demostrado que el desarrollo de la raíz puede ser un proceso continuo, con deposición de tejido mineralizado en continuidad con las paredes del conducto radicular. Una modalidad de tratamiento relativamente nueva conocida como revascularización (Bezgin *et al.*, 2015).

Este tratamiento incluye antisepsia de la cavidad pulpar con instrumentación suave e irrigación copiosa con solución antiséptica, seguido de la colocación de un medicamento intraconducto que no inhibe el crecimiento celular (Jung *et al.*, 2008).

Las técnicas de regeneración endodóntica han recibido una gran retención en años recientes. Estas técnicas pueden ayudar a prolongar el desarrollo radicular y mejorar el pronóstico del tratamiento de dientes neonatos inmaduros (Nosrat A *et al.*, 2011).

La regeneración de los tejidos se produce de forma natural debido a la existencia de células madre con la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse (Rodriguez *et al.*, 2011).

Uno de los elementos esenciales para un protocolo de regeneración endodóntica exitosa es la creación de un entorno biológico libre de bacterias dentro de la raíz mediante el uso de medicamentos antibacterianos intracanal (Yassen *et al.*, 2013)

En los procedimientos de endodoncia regenerativa, muchos factores de crecimiento incrustados en la matriz de la dentina se liberan en el espacio del conducto después del tratamiento con EDTA (Galler *et al.*, 2015)

Las pautas sugieren irrigación copiosa con 20 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl)

irrigantes en el espacio periapical. Se recomiendan concentraciones más bajas de NaOCl (hipoclorito de sodio al 1,5% (20 mL / 5 min) y luego se irriga con solución salina o EDTA (20 mL / 5 min) con la aguja de irrigación colocada a aproximadamente 1 mm del extremo citotoxicidad para las células madre en los tejidos apicales (AAE).

EDTA actúa para desmineralizar la dentina y exponer la matriz de la dentina que actúa para liberar factores de crecimiento de la matriz de la dentina. El acondicionamiento EDTA de la dentina promovió la adhesión, migración y diferenciación de las células madre de la pulpa hacia o sobre la dentina (Galler *et al.*, 2015).

Se recomienda un enjuague final con EDTA antes de la creación de un coágulo de sangre (Galler *et al.*, 2016).

La revascularización de la pulpa dental generalmente depende de inducir que las células del huésped de la región apical migren hacia el conducto radicular y se diferencien en un tejido de pulpa vascularizado. El espacio del conducto radicular debe desinfectarse, y los coágulos sanguíneos resultantes inducen la migración celular e inician la formación de tejido pulpar. Otro enfoque es el andamio y / o la regeneración de pulpa basada en células madre. Desde el primer estudio de Mooney y sus colegas sobre ingeniería de tejidos pulpares (Mooney *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que estos factores de crecimiento pueden indicar a las células madre de la pulpa que se diferencien en células de tipo odontoblastos y produzcan dentina reparadora (Tzaifas *et al.*, 1998).

La terapia tradicional para la pulpitis es la terapia del conducto radicular, mediante la eliminación de la pulpa inflamada y su sustitución por material inorgánico. Sin embargo, este tratamiento generalmente conduce a fragilidad y fractura de los dientes (Ricketts, 2001).

Debido al papel crítico de las células madre en la regeneración endodóntica, su viabilidad en presencia de pastas antibióticas es esencial para el éxito. Recientemente, los estudios sugirieron que los medicamentos intracanal (TAP, DAP) son directamente tóxicos para las SCAPs, fibroblastos del ligamento periodontal humano, células de pulpa dental humana y células papilares apicales (Srisuwan *et al.*, 2014).

Una vez que un coágulo de sangre o un andamio está en su lugar dentro del conducto, se coloca una barrera coronal para prevenir la fuga coronal de microorganismos. Los protocolos actuales recomiendan que cuando se forme un coágulo de sangre, y se coloque sobre él aproximadamente 3 mm de MTA blanco (Dentsply, Tulsa, OK) seguido de una capa de 3-4 mm de capa de ionómero de vidrio. A continuación, se coloca una restauración de resina compuesta reforzada unida sobre el ionómero de vidrio (AAE).

Se describieron 5 tipos de respuestas para dientes tratados con regeneración endodóntica. Tipo 1 donde aumenta el engrosamiento de las paredes del conducto y la maduración de la raíz continúa. Tipo 2 donde no hay una continuación significativa del desarrollo de la raíz con el vértice de la raíz que se vuelve romo y cerrado. Tipo 3 donde hay un desarrollo continuo de la raíz con el foramen apical abierto. Tipo 4 donde hay una calcificación severa (obliteración) del espacio del conducto. Tipo 5 donde hay una barrera de tejido duro formada en el conducto entre el tapón MTA coronal y el ápice de la raíz (Chen *et al.*, 2012).

Desde el futuro, la regeneración de tejido de pulpa parece ser un objetivo alcanzable, basado en el concepto de ingeniería de tejido pulpar basado en células madre (Conde *et al.*, 2016).

4.6 Colágeno

El colágeno, en todas sus formas, representa la proteína más abundante en los animales. Los colágenos representan una familia heterogénea de glicoproteínas de la

matriz extracelular que contienen al menos un dominio de triple hélice y generalmente participan en la formación de redes supramoleculares (Myllyharju *et al.*, 2004).

Los colágenos pueden agruparse en clases según su organización supraestructural, algunos colágenos son formadores de fibrillas; por ejemplo, colágenos I, II y III (Frank *et al.*, 2007).

El colágeno se ha considerado como un conveniente transportador de células pulpares y podría inyectarse convenientemente en el espacio del canal para regenerar la pulpa clínicamente, aunque se ha encontrado que el colágeno se contrae significativamente al transportar células pulpares (Huang *et al.*, 2006)

El tipo I, el primer colágeno que se identifica, se conoce comúnmente como un heterotrímero, con dos $\alpha 1$ cadenas y cadenas $\alpha 2$ idénticas en la forma molecular de $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ (Dasong *et al.*, 2015).

Es ampliamente conocido como el principal colágeno fibrilar, debido a su infinidad de fibras insolubles in vitro con alta resistencia a la tracción y estabilidad. Cada cadena α de colágeno forma una hélice con la mano izquierda por sí misma, y luego tres cadenas α se entrelazan más para formar una estructura triplesuperhelical diestra (Dasong *et al.*, 2015).

El colágeno de tipo I y III son los principales subtipos de colágeno de la pulpa y el tipo I es el que se encuentra en gruesas fibrillas estriadas por todo el tejido pulpar (Cohen, 2011).

En la dentina predominan el colágeno tipo I mientras que en la pulpa se encuentra colágeno de los dos tipos tipo I y III en una proporción 55:45, aproximadamente. Los odontoblastos producen sólo colágeno de tipo I que se incorpora a la matriz dentinaria, mientras que los fibroblastos producen los tipos I y III (Butler, 1997).

Los colágenos tipo I y tipo III se han aislado de la papila dental y la pulpa dental de tejidos bovinos por digestión enzimática con pepsina y precipitación diferencial de sal (Shuttleworth *et al.*, 1974).

Algunos estudios han demostrado que el colágeno tipo III constituía el 24% de papila apical los especímenes bovinos (Shuttleworth *et al.*, 1974).

El contenido es más alto en la parte radicular de la pulpa que en la parte coronal. De las moléculas de colágeno que se encuentran en la pulpa, los tipos I y III representan la mayor parte del colágeno tisular (Uitto VJ y Antila R, 1971).

El colágeno tipo III generalmente forma fibrillas más delgadas que el tipo I. En la pulpa propiamente dicha, el colágeno tipo III aparece como filamentos finos ramificados, cuya distribución es similar a la de las fibras reticulares (Magloire *et al.*, 1981).

4.7 Colágeno hidrolizado

El colágeno hidrolizado se produce a partir del colágeno que se encuentra en los huesos, la piel y el tejido conectivo de los animales. El proceso de hidrólisis implica romper los enlaces moleculares entre las cadenas de colágeno individuales y los péptidos mediante combinaciones de medios físicos, químicos o biológicos (Iwai *et al.*, 2005).

Para que el colágeno nativo pase a ser un nutriente proteico asimilable es necesario someterlo a un proceso denominado hidrolización (es un procesado del colágeno nativo mediante cocción o tratamiento con ácidos o alcalis, los cuales consiguen una separación de cada una de las 3 cadenas polipeptídicas de tropocolágeno), posteriormente se realiza una hidrólisis avanzada. (Matsuda *et al.*, 2006).

Tras la separación de las cadenas polipeptídicas de tropocolágeno, éstas son fragmentadas en segmentos más pequeños, utilizando productos químicos (hidrólisis química) o enzimas proteolíticas (hidrólisis enzimática). (Matsuda *et al.*, 2006).

Hay estudios en los cuales el colágeno hidrolizado in vitro aumenta significativamente la biosíntesis del colágeno tipo II en condrocitos en cultivos de células bovinas y humanas (Oesser y Seifert 2003). También se ha demostrado que el colágeno hidrolizado in vitro aumenta significativamente la biosíntesis de proteoglicanos en condrocitos en humanos (Oesser *et al.*, 2006).

El contenido de aminoácidos del colágeno hidrolizado es el mismo que el del colágeno, contiene 19 aminoácidos, predominantemente glicina, prolina e hidroxiprolina, que en conjunto representan alrededor del 50% del contenido total de aminoácidos (Bello *et al.*, 2006).

Los estudios sobre cultivos de condrocitos animales y humanos muestran que la presencia de colágeno hidrolizado estimula la síntesis de colágeno tipo II, y de proteoglicanos y ácido hialurónico los otros componentes de la matriz extracelular. Este efecto no se produce con colágeno no hidrolizado (Oesser S. and Seifert, 2003).

5. MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de SCAPs

Las muestras se obtuvieron de 4 premolares humanos inmaduros extraídos con fines de ortodoncia de un paciente sano. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y se realizó de acuerdo con los estándares éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964. Además, se obtuvo el consentimiento informado del donante.

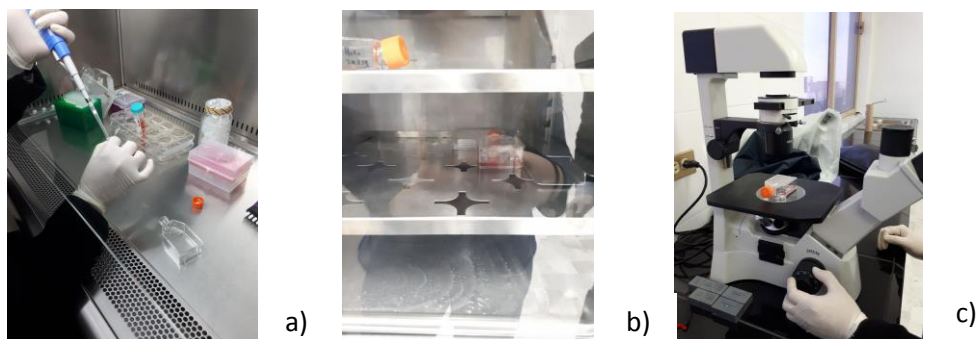


4 premolares humanos



Se retira la papilla apical de los 4 premolares

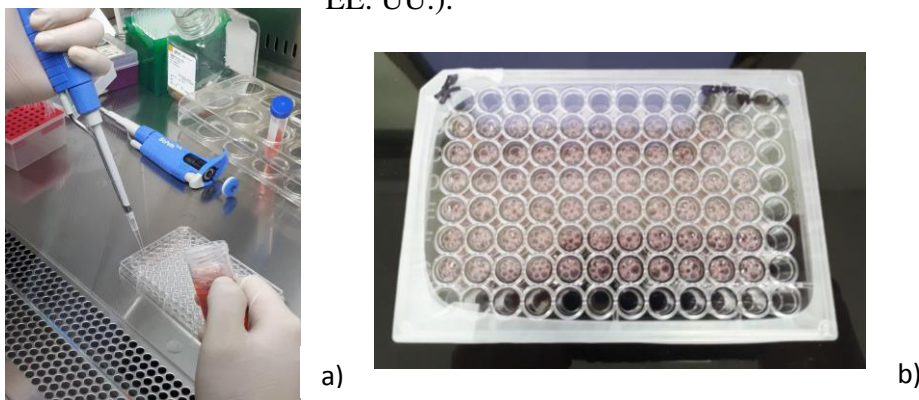
Los explantes de papila apical se digirieron con 3 mg/mL de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 37 ° C durante 1 h. La suspensión celular se centrifugó a 300 g durante 10 min, se lavó y luego se filtró a través de un filtro de nailon de 70 μm (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.). Las células se mantuvieron en medio de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), L-glutamina 2 mM, 100 U /mL de penicilina, 100 μg /mL de estreptomina y 0.25 μg /mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 3 semanas. El medio se renovó cada 3 días.



a) Los explantes de papila apical se digirieron con 3 mg/mL de colagenasa tipo I. b) Las células se mantuvieron en medio de (DMEM) , (DMEM/F12) suplementado con (FBS) ,L-glutamina 2 mM, 100 U /mL de penicilina, 100 µg /mL de estreptomicina y 0.25 µg /mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO2 durante 3 semanas. c) se observan las células en un microscopio de campo claro.

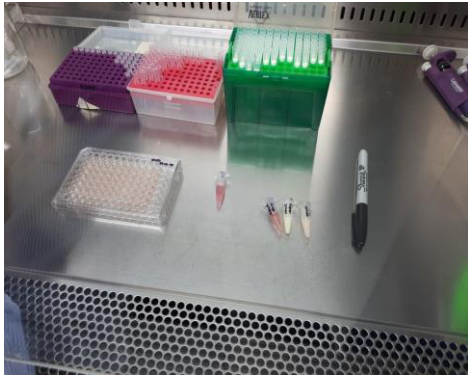
Ensayo de citotoxicidad en microcultivos fluorométricos (FMCA)

Las SCAPs se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de $\sim 2 \times 10^4$ células por pozo, manteniéndolas en medio de crecimiento durante 24 h (Corning Inc., Corning, NY EE. UU.).



a) Se siembran las SCAPs en una placa de 96 pozos. b) placa de 96 pozos con las SCAPs

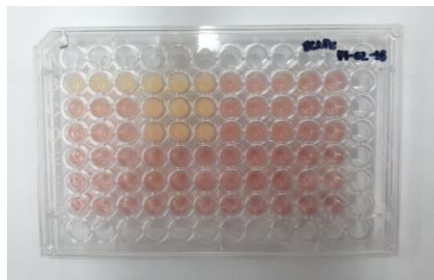
Para obtener la DAP se mezclaron 50 mg de ciprofloxacino y 50 mg de metronidazol (stock 100 mg/mL). Primeramente, las SCAPs fueron expuestas a la DAP en concentraciones de 10, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL con y sin colágeno hidrolizado a una concentración de 0.01, 0.3, 0.5 mg/mL.



a)



b)



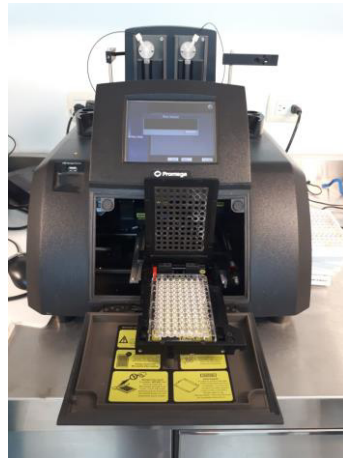
c)



d)

- a) Placa de 96 pozos y los mrdicamentos para el experimento. b) se colocan las diferentes concentraciones de DAP y Colageno hidrolizado en la placa de 96 pozos. c) placa de 96 pozos con las diferentes concentraciones experimentales. d) se incuba por 24 horas.

Después de 24 h de incubación, se eliminó el medio y las células se lavaron tres veces con PBS. El ensayo de citotoxicidad se realizó según lo descrito por Larsson y Nygren (Larsson y Nygren, 1989; Laredo-Naranjo *et al.*, 2016) (Del Angel-Mosqueda *et al.*, 2018). En resumen, se disolvió diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma-Aldrich) en DMSO (Sigma-Aldrich) y se mantuvo congelado a -20°C como una solución stock (10 mg /mL). El FDA se diluyó en PBS a $10\ \mu\text{g} /\text{mL}$ y se agregaron $200\ \mu\text{L}$ a cada pozo. Las placas se incubaron luego durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Se utilizó un lector de placas de 96 pozos GloMax® Multi + Microplate Multimode (Promega, Madison, WI, EE. UU.) A 495 nm. Los datos fueron analizados para determinar la viabilidad celular (%).



Maquina GLOMAX

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando la prueba ANOVA y Tukey; Los valores de $p < 0,01$ se consideraron estadísticamente significativos en todos los tratamientos. El análisis se realizó utilizando las estadísticas de SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6. RESULTADOS

Aislamiento y cultivo celular

Las células adherentes mostraron diferentes tamaños y morfologías después de 3 semanas en condiciones de crecimiento. También se observó una apariencia espigada alargada con núcleos ovales y centrales. Adicionalmente, varias unidades formadoras de colonias (CFUF) fueron observadas hasta el pase 3.

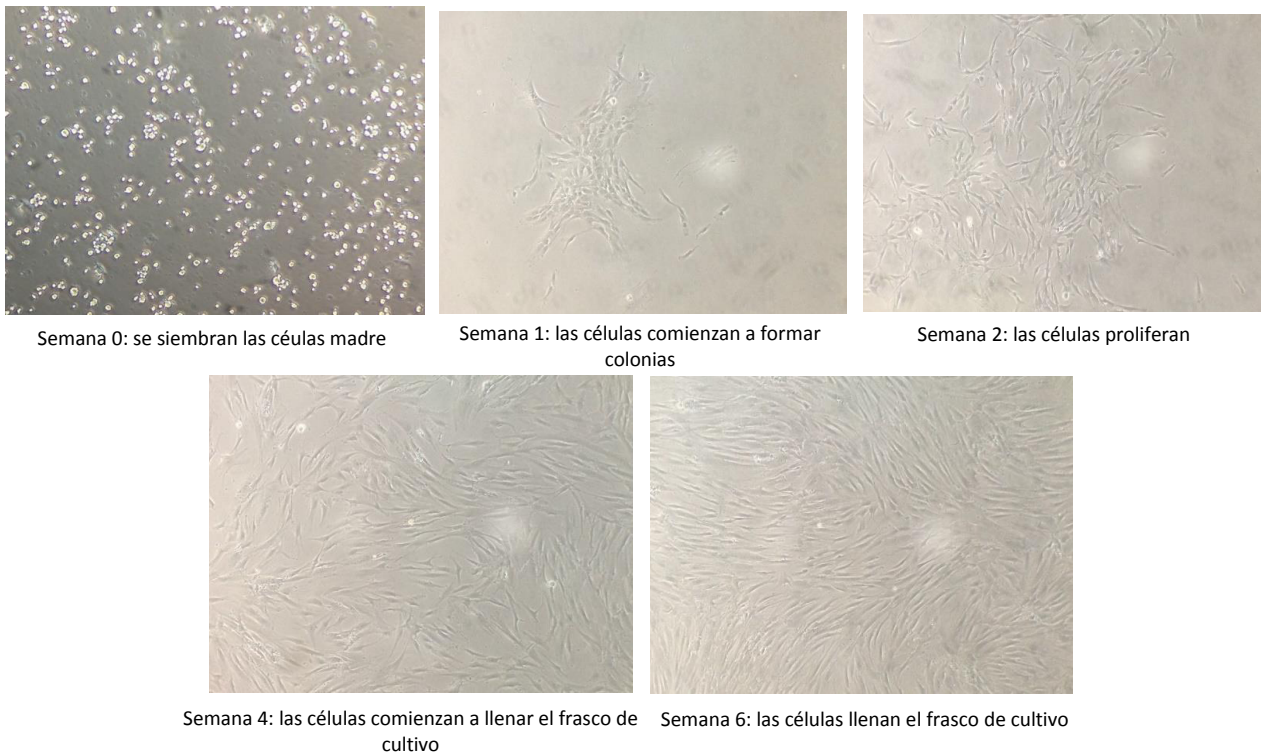


Figura 1. Aislamiento y cultivo de las SCAPs en frascos in vitro, se cultivaron desde la semana 0 hasta la semana 6 hasta formar colonias y llenar el frasco hasta hacer el pase 3, magnificación original 10x.

Comparación de la viabilidad celular

La citotoxicidad de las SCAPs expuestas a diferentes diluciones de la DAP (10, 1, 0.5, 0.25, 0.125) mg/mL y la combinación de estos a diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado (0, 0.1, 0.3, 0.5) mg/mL se evaluaron mediante un ensayo de FMCA. En general, las células expuestas a DAP sufrieron daño o muerte celular dependiente de la dosis. Al aplicar la DAP sin colágeno hidrolizado, se mantuvo un aumento gradual de la viabilidad celular (3.66%, 25.66%, 43.33%, 60% y 76.66%) (Fig.2). Por el contrario, el colágeno hidrolizado fue capaz de aumentar el número de células vivas como se muestra en las siguientes gráficas.

En las diferentes disoluciones de la DAP se observó que entre menor sea la concentración de la DAP, más viabilidad celular (fig.2).

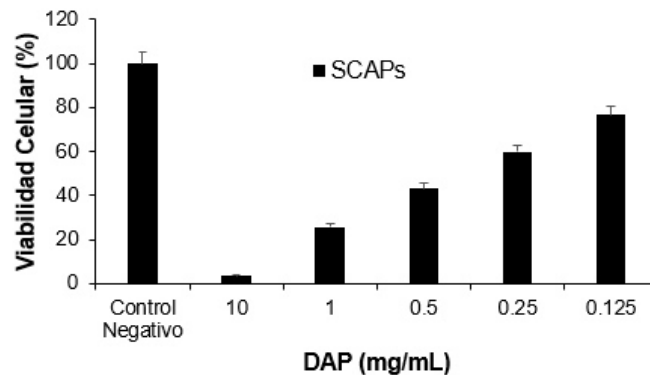


Fig. 2. La toxicidad fue determinada por FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico de la DAP 0.125 mg/mL fue significativamente mayor en comparación con las otras concentraciones ($p < 0.001$). Las barras de error indican SD ($n = 3$).

La disolución de la DAP 10 mg/mL en todas sus combinaciones con colágeno hidrolizado muestra una viabilidad celular constante de 3.66%. (Fig.3)

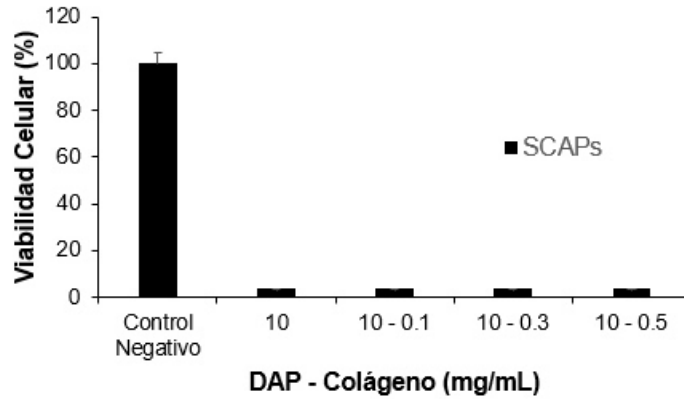


Fig. 3. La toxicidad fue determinada por método de FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico se mantuvo en un 3.66% ($p < 0.001$). Las barras de error indican SD ($n = 3$).

La disolución de la DAP 1 mg/mL junto con en la concentración de colágeno hidrolizado 0.1 mg/mL muestra poca viabilidad celular (27%) y en la concentración de DAP 1 mg/mL con colágeno 0.5 solo aumento (30.33%). (Fig.4)

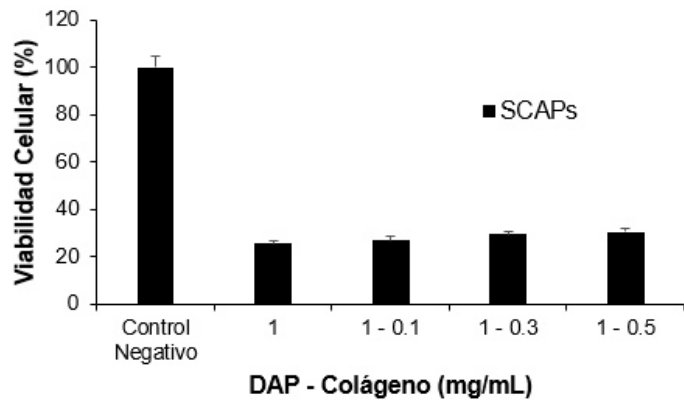


Fig.4. La toxicidad fue determinada por método de FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico aumentó en la concentración de la DAP 1 Col. 0 (25.66%), DAP 1 Col. 0.1 (27%), DAP 1 Col. 0.3 (29.35%), DAP 1 Col. 0.5 (30.33%) ($p < 0.001$). Las barras de error indican SD ($n = 3$).

La disolución de la DAP 0.5 mg/mL y colágeno hidrolizado 0.1 mg/mL la viabilidad celular aumentó (50%) a comparación del grupo anterior, y en la concentración máxima (66.66%). (Fig.5).

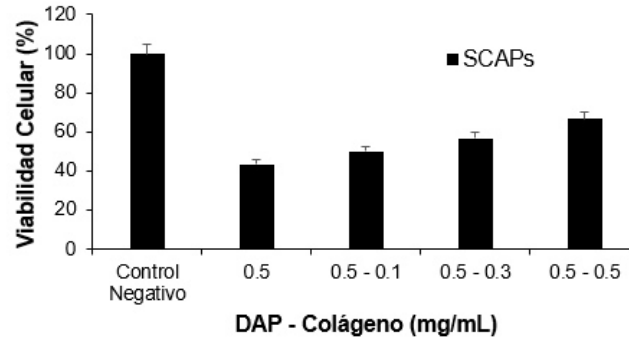


Fig.5. La toxicidad fue determinada por método de FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico aumentó en la concentración de la DAP 0.5 Col. 0 (43.33%), DAP 0.5 Col. 0.1 (50%), DAP 0.5 Col. 0.3 (56.66%), DAP 0.5 Col. 0.5 (66.66%) ($p < 0.001$). Las barras de error indican SD ($n = 3$)

En la concentración de la DAP 0.25 mg/mL con colágeno hidrolizado 0.1 mg/mL se mantuvo en comparación con el grupo anterior en su máxima concentración (66.66%), en la concentración máxima de colágeno hidrolizado 0.5mg/mL la viabilidad aumentó a (70%). (Fig.6)

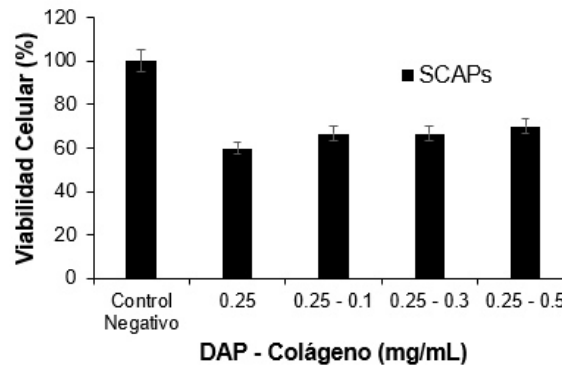


Fig. 6. La toxicidad fue determinada por método de FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico aumentó en la concentración de la DAP 0.25 Col. 0 (60%), DAP 0.25 Col. 0.1 (66.66%), DAP 0.25 Col. 0.3 (66.66%), DAP 0.25 Col. 0.5 (70%)

En la disolución de la DAP 0.125 mg/mL con la combinación de colágeno hidrolizado mantuvo la mayor viabilidad celular a comparación de todas las concentraciones anteriores, teniendo en su concentración máxima 0.5 mg/mL una viabilidad de (96.66%), muy similar a nuestro grupo control (100%) (Fig. 7).

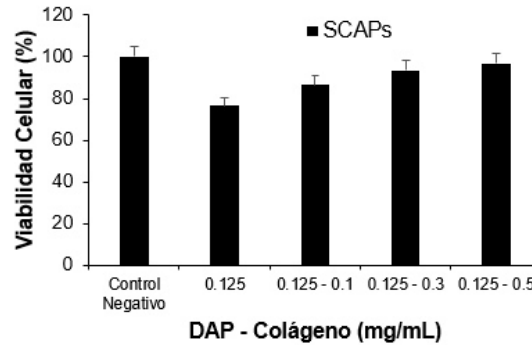


Fig.7 Citotoxicidad de la DAP 0.125 mg/mL con concentración de colágeno hidrolizado de 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL. La toxicidad fue determinada por método de FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico aumentó en la concentración de DAP 0.125 Col. 0 (76.66%), DAP 0.125 Col. 0.1 (86.66%), DAP 0.125 Col. 0.3 (93.33%), DAP 0.125 Col. 0.5 (96.66%).

La combinación de la DAP 0.125 mg/mL mostró la mayor cantidad de células vivas, incluso a la mayor dilución (76.66%, 86.66%, 93.33% y 96.66%) ($p < 0,001$) (Tabla 1).

	Colágeno Hidrolizado			
	0	0.1	0.3	0.5
CN0	100	100	100	100
DAP 10	3.66	3.66	3.66	3.66
DAP 1	25.66	27	29.35	30.33
DAP .5	43.33	50	56.66	66.66
DAP .25	60	66.66	66.66	70
DAP.125	76.66	86.66	93.33	96.66

Tabla 1. La citotoxicidad de las SCAPs expuestas a los medios condicionados en diferentes concentraciones de la DAP (10, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL) y la combinación de estos con colágeno hidrolizado (0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL) se muestran en la siguiente tabla comparados con

los grupos control, teniendo como resultado una mejor viabilidad celular en la combinación de DAP 0.125mg/mL con colágeno hidrolizado 0.5 mg/mL obteniendo una viabilidad celular de un 96.66%, muy similar a la del grupo control 100%

La citotoxicidad de las SCAPs expuestas a diferentes disoluciones de la DAP (10, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL) y la combinación de estos con colágeno hidrolizado (0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL) se evaluaron usando el método de FMCA. En la siguiente gráfica se muestra una comparación entre el grupo control y los grupos experimentales (fig.8).

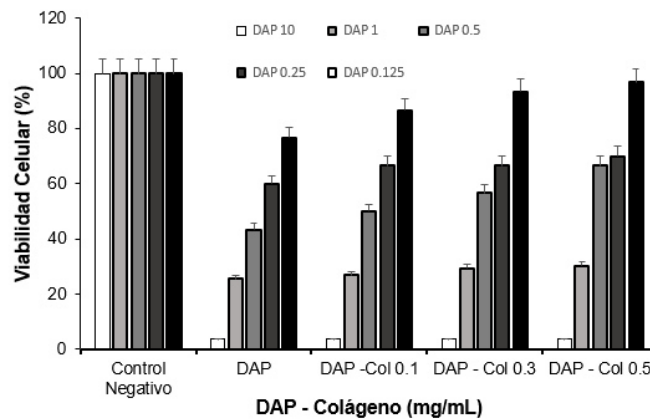


Fig. 8 y Tabla 1. La toxicidad fue determinada por FMCA. Cada columna representa el porcentaje medio de viabilidad celular donde el efecto citotóxico de la DAP con colágeno hidrolizado fue significativamente menor en comparación con la DAP sin colágeno hidrolizado ($p < 0.001$). Las barras de error indican SD ($n = 3$).

7. DISCUSIÓN

La DAP es reconocida por su amplia gama de aplicaciones en Endodoncia regenerativa y sus excelentes propiedades antibióticas (Huang *et al.*, 2008). A pesar de estas características, la biocompatibilidad de la DAP no siempre es la deseada, ya que varios estudios describen su citotoxicidad (McIntyre *et al.*, 2018). En este estudio, se proporcionó evidencia de que el colágeno hidrolizado es capaz de reducir la citotoxicidad de la DAP in vitro.

Una posible explicación para esta reducción de la toxicidad es una interacción molecular que se produce entre el colágeno y las células, lo que promueve un mejor medio de supervivencia para las SCAPs (Huang *et al.*, 2008).

Se sabe que la DAP produce daño celular, ya que este medicamento intraconducto se aplica en altas concentraciones. De acuerdo con nuestros hallazgos, la citotoxicidad de la DAP fue significativamente menor después del tratamiento con colágeno hidrolizado, lo que confirma su capacidad para reducir el efecto citotóxico sobre las SCAPs (Alghilan *et al.*, 2017).

En nuestro estudio el colágeno hidrolizado aumentó significativamente la viabilidad celular en todas las concentraciones analizadas. Curiosamente, cuando se observó la morfología celular, las células no mostraron ningún cambio aparente debido al efecto del colágeno hidrolizado, ya que mostraron un mayor contenido citoplásmico en comparación con el control negativo (Ruparel *et al.*, 2012).

Si bien nuestros resultados respaldan el concepto general de que la DAP con colágeno hidrolizado es biocompatible en circunstancias in vitro, existen algunas deficiencias asociadas con este método. Las pruebas in vitro para la evaluación o comparación de la citotoxicidad tienen características atractivas (Alyas *et al.*, 2016).

Se ha afirmado que la DAP tiene una alta toxicidad en el uso clínico (Trevino et al., 2011). Estos fármacos exhiben citotoxicidad en el estado recientemente establecido, pero esto disminuye sustancialmente y depende del tiempo. (Hirschman *et al.*; 2012).

Por lo que sabemos, este es el primer informe que evalúa el efecto citotóxico de la DAP combinada con colágeno hidrolizado in vitro. Aunque hemos encontrado resultados prometedores, para evaluar la influencia de otros factores como la interacción de las bacterias, los efectos del sistema inmunológico y las moléculas orgánicas, se requieren estudios adicionales (Alghilan *et al.*, 2017).

En conclusión, este estudio encontró evidencia para respaldar la hipótesis de que el colágeno hidrolizado disminuye el efecto citotóxico de la DAP in vitro. Además, el colágeno hidrolizado es capaz de reducir significativamente esta toxicidad debido a su interacción molecular con las SCAPs. En conjunto, estos datos explican la alta biocompatibilidad del colágeno hidrolizado con DAP.

8. CONCLUSIONES

- 1) Es posible aislar y cultivar una población de células madre de la papila apical (SCAPs) derivada de premolares humanos, aunque la cantidad de papila apical sea menor a comparación con otros tejidos.
- 2) El colágeno hidrolizado tipo I y III es capaz de interactuar con las células madre de la papila apical (SCAPs).
- 3) La pasta doble antibiótica (DAP) induce un alto porcentaje de citotoxicidad excepto en la concentración de .125% donde la viabilidad celular es similar al control negativo.
- 4) El colágeno hidrolizado es capaz de disminuir la citotoxicidad en las células madre de la papila apical (SCAPs) inducida por la pasta doble antibiótica (DAP).
- 5) Por lo tanto, el colágeno hidrolizado es recomendable durante procedimientos regenerativos en endodoncia debido a que disminuye la toxicidad inducida por la pasta doble antibiótica (DAP).

9. LITERATURA CITADA

1. Abuarqoub D, Awidi A, Abuharfeil N. Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. *Arch Oral Biol.* 2015 Oct;60(10):1545-53
2. Adel S, Alobaid, Lina M, Cortes, Jeffery Lo, Thuan T, Nguyen, Jeffery Albert, Abdulaziz S, Abu-Melha, Louis M, Lin, and Jennifer L. Gibbs. Radiographic and Clinical Outcomes of the Treatment of Immature Permanent Teeth by Revascularization or Apexification: A Pilot Retrospective Cohort Study. *J Endod.* 2014 Aug; 40(8): 1063–1070.
3. Ahlquist ML, Franzen OG. Inflammation and dental pain in man. *Endod Dent Traumatol.* 1994;10: 201–209.
4. Alghilan MA, Windsor LJ, Palasuk J, Yassen GH. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J.* 2017;50:667–675.
5. Alyas SM, Fischer BI, Ehrlich Y, Spolnik K, Gregory RL, Yassen GH. Direct and indirect antibacterial effects of various concentrations of triple antibiotic pastes loaded in a methylcellulose system. *J Oral Sci.* 2016; 58:575–582
6. American Association of Endodontists. AAE.
7. Antunes H.S., Rocas I.N., Alves F.R., Siqueira J.F., Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J. Endod.* 2015;41:1037–1042.
8. Ballal, NV; Kundabala, M; Bhat, S; Rao, N; Rao, BS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(4):633-8.
9. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196–200.
10. Bello AE, Oesser S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Curr Med Res Opin* 2006; 22 (11): 2221- 2232.
11. Bezgin T, Sonmez H. Review of current concepts of revascularization/revitalization. *Dent Traumatol* 2015;31(4):267-273.
12. Butler WT, Ritchie HH, Bronckers AL: Extracellular matrix proteins of dentine, *ciba Found Symp* 205:107,1997.
13. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod* 2011; 37: 1327-1330.
14. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/ abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45(3):294-305.
15. ChenSJ, ChenL. PRadiographic outcome of necrotic immature teeth treated with two endodontic techniques: A retrospective analysis. *Biomed J.* 2016 Oct;39(5):366-371.

16. Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod* 2013;39:813–9.
17. Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital Pulp Therapy. *Dental Clin N Am*. 2013;57:59-73.
18. Conde MC, Chisini LA, Demarco FF, Nor JE, Casagrande L, Tarquinio SB. Stem cell-based pulp tissue engineering: Variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. *Int Endod J* 2016;49(6):543-550.
19. Daniel G. Meeker, Karen E. Beenken, Weston B. Mills, Allister J. Loughran, Horace J. Spencer, William B. Lynn,^a and Mark S. Smeltzer. Evaluation of Antibiotics Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on Activity in an Established Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct; 60(10): 5688–5694.
20. Dasong Liu,¹ Mehdi Nikoo,² G'okhan Boran,³ Peng Zhou,¹ and Joe M. Regenstein⁴ *Annu. Rev. Food Sci. Collagen and Gelatin Technol*. 2015. 6:527–57.
21. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2000;64:847–867.
22. De Almeida J.E., Cuneo F., Amaya-Farfan J., de Assuncao J.V., Quintaes K.D. A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. *J. Med. Food*. 2010;13:1385–1390.
23. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. *J Am Dent Assoc* 2016;147(5):372-380.
24. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-693.
25. Frank CBS, Shrive CB, Frank IKY, Hart DA. Form and function of tendon and ligament. In: Einhorn TA, O'Keefe RJ, Buckwalter JA (eds) *Orthopaedic basic science*, 3rd edn. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, 2006; 199–222.
26. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod* 2015;41(3):363-368.
27. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod* 2015;41(3):363-368.
28. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, Schmalz G. Edta conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J* 2016;49(6):581-590.
29. González Orta LJ, Font Rytzner A, De Nova García MJ. Investigación con células madres de origen dentario. Actualización. *Gaceta Dental Digital*. 2011.
30. Gronthos S, Brahim J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531–5.
31. Gronthos S, Mankani M, Brahim J *et al*. 2000; Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 97: 13625–13630.

32. Guiotti FA, Kuga MC, Duarte MA, Sant'Anna AJ, Faria G. Effect of calcium hydroxide dressing on push-out bond strength of endodontic sealers to root canal dentin. *Braz Oral Res.* 2014;28.
33. Haapasalo M., Udnæs T., Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod. Top.* 2003;6:29–56.
34. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* 2014, 216, 299–303.
35. Hahn CL, Falkler WA Jr, Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol.* 1991;36: 147–153.
36. Hasler JE, Mitchell DF. Painless pulpitis. *J Am Dent Assoc.* 1970; 81:671–7.
37. Hernández Ramirez P, Dorticós Balea E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematol.* 2004.
38. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod* 2012;38:385–8.
39. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996;29:125–30.
40. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006;324:225–36.
41. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008;34(6):645651.
42. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008;34(6):645651.
43. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):645-51.
44. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 2009;16:605–15.
45. Iwai, K.; Hasegawa, T.; Taguchi, Y.; Morimatsu, F.; Sato, K.; Nakamura, Y.; Higashi, A.; Kido, Y.; Nakabo, Y.; Ohtsuki, K. "Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatine hydrolysates". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005; 53 (16): 6531–6536.
46. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M (2001) Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 17:185–187.
47. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod.* 2008;34:876–87.
48. Kahler B., Rossi-Fedele G., Chugal N., Lin L. M. An evidence-based review of the efficacy of treatment approaches for immature permanent teeth with pulp necrosis. *Journal of Endodontia.* 2017;43(7):1052.

49. Kamocki K, Nör JE, Bottino MC. Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. *Int Endod J.* 2015;48(12):1147–1156.
50. Kiran S., Prakash S., Siddharth P.R., Saha S., Geojan N.E., Ramachandran M. Comparative Evaluation of Smear Layer and Debris on the Canal Walls prepared with a Combination of Hand and Rotary ProTaper Technique using Scanning Electron Microscope. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2016;17:574–581.
51. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, PA: Saunders, 9th ed. 2014.
52. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod.* 2004;30(8):572–576.
53. Labban N, Yassen GH, Windsor LJ, Platt JA. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol.* 2014 Dec;30(6):429-34.
54. Labban N, Yassen GH, Windsor LJ, Platt JA. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol.* 2014 Dec;30(6):429-34.
55. Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V.M., and Santiago-Osorio, E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 1–12.
56. Lin LM, Shimizu E, Gibbs JL, Loghin S, Ricucci D. Histologic and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: A case report. *J Endod* 2014;40(2):291-295.
57. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod* 37:133–138.
58. Magloire H, Joffre A, Grimaud JA, Herbage D, Couble ML, Chavrier C. Distribution of type III collagen in the pulp parenchyma of the human developing tooth. Light and electron microscope immunotyping. *Histochemistry.* 1982;74(3):319-28.
59. Majno G, Joris I. Cells, tissues, and disease. Oxford, London: Oxford University Press, 2nd ed. 2004.
60. Maniglia-Ferreira C, de Almeida-Gomes F, Pinto MM, de Sousa Barbosa FT, de Farias Filho DM, Albuquerque NL. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of different intracanal medications in necrotic immature teeth. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2016 Aug;17(4):251-5.
61. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod* 2013;39(1):138-144.
62. Matsuda, N.; Koyama, Y., Hosaka, Y., Ueda, H., Watanabe, T., Araya, T., Irie, S. and Takehana K. «Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis». *Journal of nutrition vitaminology* 2006;52 (3): 211-215.
63. McIntyre PW, Wu JL, Kolte R, Zhang R, Gregory RL, Bruzzaniti A, Yassen GH. The antimicrobial properties, cytotoxicity, and differentiation potential of

- double antibiotic intracanal medicaments loaded into hydrogel system. *Clin Oral Investig*. 2018 Jun 25.
64. McTigue DJ, Subramanian K, Ashok K. Management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Pediatr Dent* 2013;35:55–60.
 65. Mejare IA, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, et al. Diagnosis of the condition of the dental pulp: A systematic review. *Int Endod J*. 2012;45: 597–613.
 66. Michaelson P, Holland G. Is pulpitis painful. *Int Endod J*. 2002;35: 829–832.
 67. Mooney, D. J., Powell, C., Piana, J., & Rutherford, B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnology Progress*, 1996;12: 865–868.
 68. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod*. 2014;40:899–906.
 69. Myllyharju, J.; Kivirikko, K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 2004, 20, 33–43.
 70. Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope?. A review. *J Conserv Dent*. 2009;12:131–8.
 71. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endodon* 1990;16:580–8.
 72. Needleman, I. G., Worthington, H. V., Giedrys-Leeper, E., & Tucker, R. J. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Systematic Review* 2006., CD001724.
 73. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daoud U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017;11:18(8).
 74. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011;37: 562–567.
 75. Oesser S. and Seifert J. “Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen”. *Cell Tissue Research*. 2003; 311 (3): 393-399.
 76. Ozdemir, H.O.; Buzoglu, H.D.; Calt, S.; Stabholz, A.; Steinberg, D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: In vitro study. *J. Endod*. 2010; 36: 842–846.
 77. Patel S, Barnes JJ. Contemporary endodontics - part 2. *Br Dent J*. 2011;211:517–524.
 78. Prado, M; Silva, EJ; Duque, TM; Zaia, AA; Ferraz, CC; Almeida, JF; Gomes, BP. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(2):158-63.
 79. Rajeswari K, Kandaswamy D, Karthick S. 2016. Endodontic management of patients with systemic complications. *J Pharm Bioallied Sci*. 8(1):32-35.
 80. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. 2007;1:35–8.

81. Ratajczak J., Bronckaers A., Dillen Y., et al. The neurovascular properties of dental stem cells and their importance in dental tissue engineering. *Stem Cells International*. 2016;2016:17.
82. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009;42:84–92.
83. Ricketts, D. Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *British Dental Journal*, 2001;191: 606–610.
84. Rocas I.N., Siqueira J.F., Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J. Endod.* 2010;36:45–52.
85. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-320.
86. Rodig T, Hausdorfer T, Konietschke F, Dullin C, Hahn W, Hulsmann M. Efficacy of D-RaCe and ProTaper Universal Retreatment NiTi instruments and hand files in removing gutta-percha from curved root canals - a micro-computed tomography study. *Int Endod J.* 2012;45:580–589.
87. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International Endodontic Journal*, 44, 800–806, 2011.
88. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J.* 2011;44:800–6.
89. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto VGH. Determinación de la longitud de trabajo en endodoncia. Implicaciones clínicas de la anatomía radicular y del sistema de canales radiculares. *Int J Odontostomat.*2014; 8(2):177-183.
90. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod* 2012;38:1372–1375.
91. Sabrah AH, Yassen GH, Gregory RL. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod.* 2013; 39:1385–9138.
92. Sabrah AH, Yassen GH, Liu WC, Goebel WS, Gregory RL, Platt JA. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):2059-66.
93. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J* 1996;29:118–24.
94. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil.* 2009;36:368–89.
95. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:6–9.

96. Shi S, Bartold PM, Miura M; The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodont Craniofac Res.* 2005;8: 191–199.
97. Shigemura Y.; K Iwai; F Morimatsu; T Iwamoto; T Mori; C Oda; T Taira; EY Park; Y Nakamura; K Sato (2009). "Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57 (2): 444–449.
98. Shuttleworth CA, Ward JL, Hirschmann PN. *Biochim Biophys Acta.* The presence of type III collagen in the developing tooth. 1978 Aug 21;535(2):348-55.
99. Siqueira J.F., Rôças I.N., Lopes H.P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2002;93:174–178.
100. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *PLoS ONE* 2006;1:e79.
101. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34:166 –71.
102. Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S. Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* 2007;86:594 –9.
103. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT .Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanentteeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166-71.
104. Srisuwan T, Phumpatrakom P Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3antibiotic mixture. *J Endod.* 2014;40:399–405.
105. Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res.* 2011;23: 296–301.
106. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J* 2004;37(2):132-138.
107. Tanaka M, Koyama Y-I, Nomura Y: Effects of collagen peptide ingestion on UVB-induced skin damage. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73: 930–932.
108. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clin Oral Investig.* 2015 Nov;19(8):2059-66. Epub 2015 Feb 19.
109. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007;29: 47–50.
110. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145–7.
111. Torabinejad M, Walton RE. *Endodoncia, principios y práctica.* Elsevier: España, 2010.pp. i.
112. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, Diogenes A .Effect of irrigants on the survival of human stem

- cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod.* 2011;37:1109–1115.
113. Tzaifas D AA, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-11 and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cells in vivo. 1998;43(6):431-444.
 114. Tzaifas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 1995;40:883–93.
 115. Uitto VJ, Antila R. Characterization of collagen biosynthesis in rabbit dental pulp in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1971;29(5):609-17.
 116. Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1983;28(4):339-45.
 117. Verfaillie, C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *TRENDS in Cell Biology.* 2002; 12(11): 502-508.
 118. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 2007;33:703– 8.
 119. Yassen GH, Chin J, Mohammedsharif AG, Alsoufy SS, Othman SS, Eckert G. The effect of frequency of calcium hydroxide dressing change and various pre- and inter-operative factors on the endodontic treatment of traumatized immature permanent incisors. *Dent Traumatol* 2012;28: 296–301.
 120. Zehnder, M. Root canal irrigants. *J. Endod.* 2006, 32, 389–398.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Iris Lilián Espinoza García

Candidata para el grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Tesis: EFECTO DEL COLÁGENO HIDROLIZADO CÉLULAS MADRE DE PAPILA APICAL EXPUESTAS A UNA PASTA DOBLE ANTIBIÓTICA IN VITRO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 7 de Mayo de 1991, hija de German Espinoza Jaramillo e Irasema García Montemayor esposa de Juan Carlos García Avalos.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en el 2014.

Experiencia Profesional: Instructora del departamento de Patología Oral del año 2010 al 2014, Acreedora del premio Nacional de Emprendedor Empresarial en el 2013, acreedora de primer lugar de generación en el 2012, acreedora del tercer lugar de generación en el 2013.