

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



**CITOTOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA  
MODIFICADA CON ANTIFÚNGICO SOBRE CÉLULAS MADRE  
DE PAPILA APICAL *IN VITRO***

**POR**

**BRISEIDA GUADALUPE ROJAS HUERTA**

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

**FEBRERO, 2020**

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



**CITOTOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA  
MODIFICADA CON ANTIFÚNGICO SOBRE CÉLULAS MADRE  
DE PAPILA APICAL *IN VITRO***

POR  
BRISEIDA GUADALUPE ROJAS HUERTA

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

FEBRERO, 2020

**CITOTOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA  
MODIFICADA CON ANTIFÚNGICO SOBRE CÉLULAS MADRE DE  
PAPILA APICAL *IN VITRO***

**Comité de Examen**

---

**DR . JORGE JAIME FLORES TREVIÑO**

**Presidente**

---

**DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA**

**Secretario**

---

**DRA. IDALIA RODRÍGUEZ DELGADO**

**Vocal**

**CITOTOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA  
MODIFICADA CON ANTIFÚNGICO SOBRE CÉLULAS MADRE DE  
PAPILA APICAL *IN VITRO***

**Por**

**C.D.E.E. Briseida Guadalupe Rojas Huerta**

Maestría en Ciencias Odontológicas en el área Endodoncia

**Comité de Tesis**

---

**Dr. Casiano Del Angel Mosqueda**  
Director de tesis

---

**Dra. Idalia Rodríguez Delgado**  
Codirector de tesis

---

**Dra. Eyra Elvyra Rangel Padilla**  
Asesor metodológico

---

**Dr. Gustavo Israel Martínez González**  
Asesor estadístico

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente a mis padres, fuente de inspiración de mis logros y metas propuestas, cada una de sus acciones han sido objeto de una admiración constante y a la vez un reto de superación profesional. Gracias a su ejemplo de lucha, amor, pasión como profesionistas, entregados a su trabajo, siempre dando lo mejor de sí, es que me he propuesto a ser una persona que sea capaz de cumplir con sus expectativas, esta meta se la debo a ellos.

Gracias a cada uno de los profesores que han dejado huella en mí como profesionistas responsables y capaces de saber que la enseñanza va más allá de un libro, que traspasa fronteras y que me han enseñado que educar implica un verdadero reto, que te da el poder de cambiar vidas para bien y que el conocimiento es una arma invencible contra la ignorancia.

Agradezco al Dr. Alejandro Dib Kanan, por su esfuerzo al lograr esta oportunidad de trabajar con tan prestigiosa Universidad, mi admiración y respeto por su ardua labor.

A mis asesores el Dr. Casiano Del Angel Mosqueda, mi agradecimiento por su tiempo y dedicación, por su entrega y mi más profunda admiración por ser un profesionista tan comprometido con su trabajo, gracias por hacerme parte de este gran proyecto y por todas las enseñanzas adquiridas durante todo este tiempo. A la Dra. Idalia Rodríguez por su amistad y su apoyo incondicional, mi admiración por ser una mujer ejemplar siempre dispuesta a brindarme el soporte necesario para realizar esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
PORTADA .....	i
COMITÉ DE EXAMEN.....	ii
COMITÉ DE TESIS .....	iii
AGEADECIMIENTOS .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABLAS .....	viii
NOMENCLATURA .....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	2
3. OBJETIVOS .....	3
3.1 Objetivo general .....	3
3.2 Objetivos específicos .....	3
4. ANTECEDENTES .....	4
4.1 Microbiología del conducto radicular .....	4
4.1.1 <i>Enterococcus Faecalis</i> .....	6
4.1.2 Estreptococos .....	7
4.1.3 <i>Candida albicans</i> .....	7
4.2 Patogénesis de infecciones endodónticas en dientes inmaduros.....	10
4.3 Regeneración en endodoncia .....	12
4.4 Células madre dentales .....	15
4.4.1 Células madre de pulpa dental .....	16
4.4.2 Células madre de papila apical .....	21

4.5 Desinfección intraconducto .....	24
4.6 Marco de referencia .....	25
5. MÉTODOS .....	32
5.1 Cultivo de células madre de papila apical .....	32
5.2 Preparación de soluciones doble antibióticas y antifúngico .....	34
5.3 Preparación de esponjas de colágeno .....	35
5.4 Análisis de viabilidad celular por tinción de cristal violeta .....	35
5.5 Análisis morfológico mediante microscopía de campo claro .....	36
5.6 Análisis estadístico .....	36
6. RESULTADOS .....	37
7. DISCUSIÓN .....	42
8. CONCLUSIONES .....	46
9. LITERATURA CITADA .....	47
10. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Incubación de SCAPs y observación de células bajo microscopio óptico a 10X...	32
2. Sembrado de SCAPs en placa de cultivo celular de 24 pozos .....	33
3. Observación bajo microscopio óptico de confluencia celular .....	33
4. Monocapa celular observada bajo microscopio óptico a 10X .....	34
5. Colocación de esponjas de colágeno con soluciones preparadas .....	35
6. Porcentaje de viabilidad celular por grupos .....	37
7. Media de viabilidad celular de las SCAPs expuestas. Observación, inmediata y a las 24 hrs por grupo de estudio .....	38
8. SCAPs a las 24 hrs observadas bajo microscopio óptico a 10X .....	39
9. Control SCAPs + Medio. Observación inmediata y a las 24 horas de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	39
10. Control negativo. Observación, inmediata y a las 24 h de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	40
11. Esponja+DAP. Observación, inmediata y a las 24 hrs de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	40
12. Esponja+DAF 2%. Observación, inmediata y a las 24 h de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	40
13. Esponja+DAF 1%. Observación, inmediata y a las 24 h de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	41
14. Esponja + DAF 0.5%. Observación, inmediata y a las 24 horas de colocar las soluciones teñidas con cristal violeta y sin tinción .....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Estadística descriptiva de viabilidad de las SCAPs .....	38

## NOMENCLATURA

<b>ANG-1</b>	Angioproteína 1
<b>BMSCs</b>	Células madre de la médula ósea
<b>C</b>	Centígrados
<b>CaOH2</b>	Hidróxido de Calcio
<b>CHX</b>	Clorhexidina
<b>DAP</b>	Pasta doble antibiótica
<b>DAPm</b>	Pasta doble antibiótica modificada
<b>DAF</b>	Solución doble antibiótica modificada con antifúngico
<b>DFSCs</b>	Células madre del folículo dental
<b>DMEM-F12</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium-Ham's F12
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPSCs</b>	Células madre de pulpa dental
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>FBS</b>	Suero de bovino fetal
<b>FDA</b>	Diacetato de fluorosceína
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FGF4</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 4
<b>FMCA</b>	Ensayo de citotoxicidad por fluorometría
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
<b>GMSCs</b>	Células madre mesenquimales derivadas de encía
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento parecido a la insulina

<b>IL</b>	Interleucina
<b>iPAPCs</b>	Células progenitoras periapicales inflamatorias
<b>LIF</b>	Factor inhibitorio de leucemia
<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales
<b>MTA</b>	Mineral Trióxido Agregado
<b>NaOCl</b>	Hipoclorito de sodio
<b>NAP 2</b>	Péptido activador de neutrófilos 2
<b>NM</b>	Nanómetros
<b>OESCs</b>	Células madre del epitelio oral
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos
<b>PCA</b>	Paracloroanilina
<b>PDLSCs</b>	Células madre del ligamento periodontal
<b>PLG</b>	Coopolímero poliláctico
<b>PSCs</b>	Células madre derivadas de periostio
<b>SCAPs</b>	Células madre de papila apical
<b>SDF-1a</b>	Factor derivado de células estromales-1a
<b>SGSCs</b>	Células madre de las glándulas salivales
<b>SHED</b>	Células madre de dientes deciduos exfoliados
<i>spp</i>	Especies
<b>TAP</b>	Pasta triple antibiótica
<b>TCP</b>	Fosfato tricalcico
<b>TGF B1</b>	Factor de crecimiento transformador Beta 1
<b>TGPCs</b>	Células progenitoras del germen dental
<b>TPO</b>	Tromboproteína
<b>µg</b>	Microgramos
<b>VEGF-A</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A

**TESISTA: C.D.E.E. Briseida Guadalupe Rojas Huerta**  
**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Casiano Del Angel Mosqueda**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Dra. Idalia Rodríguez Delgado**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CITOTOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DOBLE ANTIBIÓTICA  
MODIFICADA CON ANTIFÚNGICO SOBRE CÉLULAS MADRE DE PAPILA  
APICAL *IN VITRO***

**RESUMEN**

**Introducción:** La presencia de *Candida albicans* en infecciones endodónticas requiere estudios enfocados en su erradicación. Además de los efectos antimicrobianos, es importante evaluar los efectos citotóxicos de los medicamentos utilizados en la regeneración endodóntica. **Objetivo:** El propósito de esta investigación fue evaluar la citotoxicidad de una solución dobleantibiótica modificada con antifúngico sobre las células madre de la papila apical en un estudio in vitro. **Metodología:** Se realizó la preparación de la solución dobleantibiótica modificada con antifúngico en tres concentraciones diferentes. En los 3 grupos experimentales el ciprofloxacino y el metronidazol a .8mg/ml y 2mg/ml respectivamente y el fluconazol a concentraciones de 2mg/ml, 1mg/ml y .5mg/ml. Como grupo control se preparó DAP (ciprofloxacino y metronidazol 1:1) mezclada con propilenglicol. Las soluciones fueron embebidas en esponjas de colágeno y colocadas en contacto directo con las SCAPs en pozos de cultivo; se incubaron a 37°, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 hrs se realizó un análisis de viabilidad celular por una tinción de cristal violeta. **Resultados:** Se observó que la solución doble antibiótica modificada con antifúngico provoca citotoxicidad dependiente de la concentración. A menor concentración del antifúngico, existe mayor viabilidad celular. La DAP provocó mayor citotoxicidad, observándose el 0.8% de viabilidad celular a las 24 hrs. **Conclusión:** Bajo las condiciones de este estudio se

observó que la solución doble antibiótica modificada con antifúngico puede ser una alternativa como medicación intraconducto en regeneración endodóntica.

**Palabras clave:** Regeneración endodóntica, células madre de papila apical, pasta doble antibiótica modificada con antifúngico, *Candida albicans*, citotoxicidad, biomateriales.

**TESISTA: C.D.E.E. Briseida Guadalupe Rojas Huerta**  
**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Casiano Del Angel Mosqueda**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Dra. Idalia Rodríguez Delgado**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CYTOTOXIC EFFECT OF A MODIFIED ANTIFUNGAL DOUBLE  
ANTIBIOTIC SOLUTION ON STEM CELLS OF APICAL PAPILLA *IN VITRO***

**ABSTRACT**

**Introduction:** *Candida albicans* in endodontic infections requires studies focused on its eradication. In addition to the antimicrobial effects, its important to evaluate the cytotoxic effects of the drougs used in endodontic regeneration. **Objective:** The aim of this investigation was to evaluate the cytotoxic effect of a modified antifungal double antibiotic solution on the stem cells of apical papilla (SCAPs) in an in vitro study. **Methodology:** The solutions were prepared at different concentrations. The 3 experimental groups, ciprofloxacin .8 mg/ml, and metronidazole 2 mg/ml in each group, and fluconazole at different concentrations 2mg/ml, 1mg/ml y .5 mg/ml per group. As a control group DAP (ciprofloxacin and metronidazole 1:1) was prepared. The solutions were embedded in collagen sponges and placed in direct contact with the SCAPs in the cultivate wells, they were incubated at 37°C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. At 24 hrs a cell viability analysis was performed by a crystal violet staining. **Results:** It was observed that the double antibiotic solution modified with antifungal causes a concentration dependent citotoxicity. At a lower concentration of the antifungal, there is greater cell viability. DAP caused more cytotoxic effects, observing 0.8% cell viability at 24 hrs.

**Conclusion:** Under the conditions of this study, it was observed that double antibiotic solution modified with antifungal can be an alternative as intracanal medication in regenerative endodontic treatments.

**Key words:** Regenerative endodontics, stem cells of apical papilla, modified antifungal double antibiotic solution, *Candida albicans* , cytotoxicity, biomaterials.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los protocolos de desinfección en regeneración endodóntica se enfocan en el uso de agentes antimicrobianos que permitirán la erradicación de bacterias dentro de conductos radiculares de dientes con ápice inmaduro, sin embargo, se ha demostrado que pueden existir además de bacterias, agentes oportunistas como hongos como parte de la microflora formando colonias que resisten a la respuesta del huésped (Siqueira and Sen 2004). Se ha sugerido que al igual que los irrigantes, los medicamentos tienen el potencial de alterar el sustrato donde idealmente las células madre podrían proliferar y diferenciarse, por lo que es importante encontrar medicamentos que permitan un balance entre la desinfección y la supervivencia y viabilidad celular para lograr la regeneración endodóntica. (Ruparel *et al.*, 2012).

Se ha sugerido el uso de pastas antibióticas como la triple pasta antibiótica (TAP) compuesta por Ciprofloxacino, Metronidazol y Minociclina (Trope, 2006); esta última se ha sustituido debido a que provoca pigmentación dentinaria por lo que se sugiere el uso de pastas dobleantibióticas (DAP) únicamente usando ciprofloxacino con metronidazol mezclada con propilenglicol (Diogenes *et al.*, 2013). La papila apical es una de las principales fuentes de células madre que permitirán la regeneración endodóntica en dientes necróticos con ápice inmaduro, su supervivencia durante el proceso de desinfección es un paso crucial en la regeneración endodóntica. (Sonoyama *et al.*, 2008).

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la citotoxicidad de una solución doble antibiótica modificada con antifúngico sobre células madre de papila apical (SCAPs). Las SCAPs fueron expuestas a diferentes concentraciones de soluciones antibióticas formadas por ciprofloxacino a .8mg/ml y metronidazol 2mg/ml adicionando fluconazol como antifúngico a concentraciones de 2 mg/ml, 1 mg/ml y .5 mg/ml. Se evaluó el efecto citotóxico mediante una tinción de cristal violeta.

## **2. HIPÓTESIS**

La solución doble antibiótica modificada con antifúngico, tiene baja citotoxicidad sobre las SCAPs.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar la citotoxicidad de una solución doble antibiótica modificada con antifúngico sobre SCAPs.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Cultivar una población de SCAPs utilizando incubación.
- Sintetizar una solución doble antibiótica utilizando un antifúngico mediante agitación.
- Determinar la tasa de viabilidad celular de SCAPs expuestas a la solución doble antibiótica modificada con antifúngico utilizando un ensayo de cristal violeta.
- Analizar los cambios morfológicos de las SCAPs expuestas a la solución doble antibiótica modificada con antifúngico utilizando microcopia de campo claro.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Microbiología del conducto radicular

En la cavidad oral existen alrededor de  $10^{10}$  bacterias que consisten en más de 500 especies diferentes de microorganismos (Sundqvist, 1992). Todas las bacterias tiene las mismas oportunidades de invadir el espacio del conducto radicular, sin embargo, sólo un grupo restringido de especies se han identificado dentro de los conductos radiculares infectados (Sundqvist, 1994). Un medio anaeróbico, interacciones entre factores bacterianos y la disponibilidad de nutrientes son los elementos principales que definen la composición de la flora microbiana (Sundqvist and Figdor, 2003).

Las bacterias son el principal impedimento para la reparación de un tejido pulpar expuesto. En su estudio clásico utilizando ratas libres de gérmenes, Kakehashi *et al.*, demostraron que el tejido pulpar expuesto se necrosa en presencia de bacterias dando como resultado el desarrollo de inflamación crónica y eventualmente formación de granulomas periapicales. Por otro lado, en ratas libres de gérmenes, la respuesta a tejido pulpar expuesto se caracterizó por una mínima inflamación y la formación de puentes dentinarios( Kakehashi *et al.*,1965).

Existen mecanismos selectivos en donde algunas bacterias tienen mayor capacidad para sobrevivir y multiplicarse en conductos radiculares que otras. Esto también demuestra que el medio endodóntico es selectivo para el desarrollo de proporciones específicas de microflora anaeróbica ( Fabricius *et al.*, 1982; Love, 2001).

Existen interrelaciones entre ciertas bacterias que pueden se comensales o antagonistas.

Asociaciones microbianas entre especies han sido determinadas mediante el registro del índice de probabilidad para la detección de una especie, en presencia o ausencia de otra especie (Sundqvist, 1992).

Existen muchos factores que pueden influenciar el crecimiento y colonización de bacterias en conductos radiculares. La disponibilidad de nutrientes, la baja presión de O<sub>2</sub> en conductos con pulpa necrótica y las interacciones bacterianas, son determinantes ecológicos importantes (Sundqvist and Figdor, 2003). El tejido pulpar desintegrado y el fluido tisular constituyen una fuente esencial de nutrientes en el conducto. La disponibilidad de sustratos como suero es el factor ecológico más importante en el conducto radicular (Love, 2001).

Se ha demostrado que la flora dominante en la sección coronal de conductos radiculares expuestos a la cavidad oral está conformada por bacterias anaerobias facultativas, tal como estreptococos, y que la sección apical está dominada por bacterias anaerobias estrictas (Sundqvist and Figdor, 2003).

Las infecciones intraradiculares primarias se caracterizan por una mezcla de 103 a 108 especies por conducto infectado. Existe una diferencia significativa entre las comunidades asociadas con infecciones sintomáticas y asintomáticas, siendo las infecciones sintomáticas las que muestran un mayor número de especies (Siqueira and Rôças, 2014). Las especies más prevalentes y abundantes incluyen especies anaeróbicas Gram negativas pigmentadas de negro (*Prevotella* y *Porphyromonas ssp*), *Fusobacterium nucleatum*, estreptococos, espiroquetas (*Treponema ssp*), *Dialister ssp*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium ssp*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium ssp* y *Olsenella ssp*.

Las infecciones intrarradiculares secundaras o persistentes son la principal causa de periodontitis apical postratamiento. Esto se basa en dos argumentos. Primero, la mayoría de los conductos tratados que presentan lesiones periapicales han demostrado tener una infección intraradicular. Segundo, se ha demostrado que hay un incremento en el riesgo de un resultado de tratamiento adverso cuando existen microorganismos presentes en el conducto al momento de la obturación.

Existe una diversidad de especies aisladas de conductos obturados con enfermedad periapical persistente, pero existe un consenso que menciona que entre las especies más prevalentes se encuentran los enterococos, estreptococos y especies de *Candida*. Otras especies encontradas en altas proporciones son *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *peptoestreptococos*. *P. propionicum*, *D. pneumosintes* y *F. alocis* (Sundqvist and Figdor, 2003).

#### **4.1.1 *Enterococcus Faecalis***

*Enterococcus faecalis* ha sido la especie más frecuentemente detectada con una prevalencia de 90% de casos en periodontitis apical postratamiento. Las especies de *E. faecalis* tienen características intrínsecas que le permiten sobrevivir en condiciones que son comúnmente letales para otros microorganismos. Estas propiedades incluyen su habilidad para crecer en altas concentraciones de sal (6.5% NaCl), un amplio rango de temperatura (10 a 60°C), un amplio pH así como persistir en presencia de detergentes.

Recientemente se demostró su habilidad para producir biofilms, esto debido a su capacidad para producir “slime” o un lodillo compuesto por un glicocalix amorfo que se pega a la superficie celular y forma una cubierta que ayuda a la adherencia contra las superficies, esto provee una protección contra mecanismos de defensa y en presencia de agentes antibacterinos.

Se ha demostrado que la producción de este lodillo ha sido asociada con la habilidad de las bacterias para resistir a efectos de varias clases de antibióticos (Siqueira and Rõças, 2014; Wilson, 2015).

#### **4.1.2 Estreptococos**

Una de las principales características de estas especies es su capacidad para invadir túbulos dentinarios y por lo tanto establecerse en el sistema de conductos radiculares. La superficie de adhesinas de los estreptococos median la unión a las paredes dentinarias facilitando la invasión a túbulos dentinarios, de esta forma la invasión estreptococica puede facilitar la aparición de otras especies. La habilidad de los estreptococos para penetrar a túbulos dentinarios puede ser atribuida a su patrón de cadenas de crecimiento. Esta habilidad es similar a la mostrada por el enterococo. Existe evidencia de que los estreptococos son difíciles de erradicar durante el tratamiento del conducto radicular. De manera interesante se ha observado que las especies de *Candida* también son difíciles de erradicar demostrando los retos a los que nos enfrentamos durante el control antimicrobiano ( Lana *et al.*, 2001).

#### **4.1.3 *Candida albicans***

Los hongos son microorganismos quimio-organotróficos eucarióticos que pueden formar parte de las infecciones endodónticas y por lo tanto participar en la etiología de las enfermedades perirradiculares. Poseen atributos de virulencia que incluyen adaptabilidad a una variedad de condiciones ambientales, adhesión a una variedad de superficies, producción de enzimas proteolíticas, transición morfológica, formación de biofilm y evasión e inmunomodulación de las defensas del huésped ( Siqueira and Sen, 2004).

*Candida albicans* es la especie fúngica más comúnmente aislada de los conductos radiculares infectados y es potencialmente patogénico. Esta especie ha sido considerada un microorganismo dentinofílico debido a su afinidad invasiva a la dentina. También se ha observado su resistencia a medicamentos intraconducto tal como hidróxido de calcio, de esta forma se explica su presencia en infecciones persistentes ( Siqueira and Sen, 2004).

*C. albicans* se considera como un hongo polimórfico ya que puede presentarse en forma de blastóporo, tubos geminales, hifas, pseudohifas y clamidiosporas, dependiendo de las condiciones ambientales. La transición de blastóporo a hifa representa un cambio de comensal a estado patogénico aunque esto no es un prerequisite para que ocurra una infección. *Candida* es parte de la microbiota normal de la piel, boca y tracto gastrointestinal y es la causante de la mayoría de las infecciones fúngicas.

Existen algunos factores de virulencia importantes en la colonización de los conductos radiculares que están involucrados en la patogénesis de las lesiones perirradiculares. La adherencia de *Candida albicans* se presenta por una combinación de mecanismos específicos (interacciones ligando-receptor) o no específicos (carga electrostática, o fuerzas de van der Waals) que permiten que las levaduras se unan a un amplio rango de tipos de tejidos incluyendo la dentina.

*Candida* tiene moléculas en la superficie que median la adherencia a los tejidos incluyendo un receptor homólogo a la integrina humana CR3, lo cual liga a grupos RGD (arginina, glicina y ac. aspártico) sobre fibrinógeno, fibronectina y laminina y a proteínas que se unen a moléculas como lecitina sobre las células del huésped y sus tejidos.

La adherencia de *C. albicans* a proteínas de la matriz extracelular como colágeno tipo I y fibronectina depende de la presencia de calcio extracelular que abunda en la dentina. *C. albicans* tiene actividad colagenolítica que puede degradar colágeno de dentina humana. Además puede activar el sistema de complemento por la vía clásica o alterna (Siqueira *et al.*, 2002).

Otro factor de virulencia incluye la fosfolipasa y proteinasa que puede estar involucrada en la invasión tisular degradando proteínas de la matriz extracelular y secretar adenosina que bloquea la producción y degranulación de radicales de oxígeno de neutrófilos.

Se ha demostrado que existe una interacción entre *C. albicans* y *Streptococcus gordonii*, siendo capaces de formar biofilms, esta interacción es bidireccional y se considera un beneficio mutuo debido a que permite la supervivencia, persistencia y patogenicidad de estos microorganismos en diversos nichos orales. Se ha demostrado que *C. albicans* es capaz de producir microambientes hipóxicos dentro del biofilm que facilita el crecimiento de bacterias anaerobias tales como *Clostridium perfringens* (Lohse, 2018).

La virulencia de *C. albicans* puede ser aumentada por la presencia de bacterias orales que pueden inducir la sobrerregulación de genes específicos a las hifas y otros factores de virulencia llevando a la formación de biofilm junto con la producción de proteinasas secretil-asparticas (SAPs), componentes de la matriz exopolimérica y adhesinas que contribuyen a la filamentación, colonización e infección invasiva.

Los m.o. presentes dentro de túbulos dentinarios no son afectados por procedimientos quimicomecánicos, además es resistente a medicamentos intraconducto por lo que se asocia con casos de infecciones persistentes ( Siqueira et al., 2002).

## **4.2 Patogénesis de infecciones endodónticas en dientes inmaduros**

En dientes con ápice inmaduro, es reconocido que una radiolucencia apical puede asociarse con el folículo dental y no necesariamente con periodontitis apical. De esta forma una periodontitis apical en estos casos se puede confirmar cuando exista evidencia de alodinia mecánica, inflamación o presencia de tracto sinuoso.

En casos de necrosis pulpar con presencia de abscesos agudos o crónicos y lesiones periapicales visibles radiográficamente, las condiciones ambientales son más críticas pues es posible que exista el crecimiento de biofilm bacteriano dentro de los conductos radiculares.

Una revascularización espontánea que permita el desarrollo radicular convencional puede fallar en presencia de una infección, aunado a esto, puede haber una infección radicular externa relacionada con resorción radicular. De esta forma en la última década se ha demostrado con diversos reportes clínicos que casos con infecciones establecidas pueden desinfectarse de manera adecuada de tal forma que se genere un proceso regenerativo y por lo tanto tener un éxito clínico. Esta desinfección se ha logrado con el uso de varios antibióticos, combinaciones de antibióticos o el uso de hidróxido de calcio.

Debido a que el desarrollo de una infección endodóntica juega un rol crítico en las consideraciones de tratamiento y en el éxito de los procedimientos regenerativos, es esencial examinar el tipo y características de las infecciones que resultan después de una necrosis pulpar. Esto permitirá al clínico entender la localización del biofilm bacteriano, la virulencia microbiana, las características de adhesión y la sensibilidad antibiótica de los organismos involucrados. El conocimiento de estos mecanismos ayudará a identificar las mejores estrategias antibacterianas.

Los datos sobre la microbiota de un diente inmaduro con infecciones endodónticas en pacientes jóvenes son muy escasos. Sin embargo, es importante reconocer el tipo de microorganismo que está provocando una infección para poder administrar el antibiótico adecuado y así evitar su resistencia (Fouad, 2013; 2014).

El efecto de una infección preoperatoria es muy importante en casos en donde se intenta realizar tratamientos de regeneración endodóntica. La infección preoperatoria puede ser el determinante de que exista una revascularización espontánea o sea necesario realizar tratamientos de regeneración endodóntica. Las bacterias forman biofilms sobre las paredes de los conductos, en istmos y conductos laterales, dentro de los túbulos dentinarios y sobre la superficie radicular apical extraradicular.

En endodoncia regenerativa, la falta de obturación del conducto radicular mientras el tejido se está regenerando, pueden existir bacterias residuales que proliferen y restablezcan el biofilm. Por lo tanto es necesario establecer un nivel de desinfección más alto que en las técnicas tradicionales, además el tejido en desarrollo necesita tiempo suficiente para formar la raíz por lo tanto las condiciones ambientales asépticas son necesarias por un mayor periodo.

### **4.3 Regeneración en endodoncia**

La maduración de la raíz de un diente permanente ocurre alrededor de 3 años después de la erupción. Una lesión pulpar durante este periodo, constituye un verdadero reto clínico debido a que se pueden presentar condiciones que podrían afectar el desarrollo radicular. Estas condiciones pueden ser caries, lesiones traumáticas, anomalías del desarrollo tales como dens evaginatus (Diogenes *et al.*, 2014; Fouad, 2013).

Dependiendo de la vitalidad de la pulpa afectada se pueden realizar dos enfoques de tratamiento: Apexogénesis que es procedimiento de terapia vital pulpar que permitirá el desarrollo de la raíz de manera fisiológica o Apexificación que es definida como un método para inducir una barrera calcificada en una raíz con ápice abierto y con pulpa necrótica (AAE Glossary, 2016).

Tradicionalmente este procedimiento se ha realizado con el uso de hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) como medicación intraconducto. El alto pH del  $\text{Ca(OH)}_2$  es un factor importante para la formación de una barrera calcificada. Se ha demostrado que esta barrera es más exitosa si existe ausencia de microorganismos.

La actividad antibacteriana del  $\text{Ca(OH)}_2$  se relaciona con la liberación de iones hidroxilo que son altamente oxidantes y muestran una reactividad extrema, estos iones causan daño a la membrana citoplasmática bacteriana, denaturación proteínica y daño al DNA bacteriano. La liberación de iones calcio puede afectar la enzima pirofosfatasa involucrada en la síntesis de colágena. La estimulación de esta enzima puede facilitar los mecanismos de reparación (Rafter, 2005).

Aunque estos procedimientos fueron empleados durante mucho tiempo, tiene desventajas considerables como ser tratamientos usados por largos periodos, usualmente uno o dos años, lo que de acuerdo a reportes (Andreasen *et al.*, 2002), puede incrementar el riesgo de fractura debido al debilitamiento de las paredes dentinarias. La explicación a esto se debe a que existe una disrupción entre el enlace que une los cristales de hidroxiapatita con la red colágeno de la dentina debido al efecto del hidróxido de calcio. La disrupción toma lugar debido a la neutralización, disolución o denaturalización de proteínas ácidas y proteoglicanos que en la dentina pueden servir como agentes de adhesión entre la colágena y los cristales de apatita (Andreasen *et al.*, 2002). Estos hallazgos sustentan el uso de otras alternativas de tratamiento sustituyendo al uso del  $\text{Ca(OH)}_2$  como única opción en procedimientos de apexificación.

Posteriormente, se propuso el uso de un tapón apical de 3 ó 4 mm de MTA, y en una segunda cita que puede ser a las 24 horas debido a que el MTA puede fraguar incluso a las 4 horas, el resto del conducto se puede obturar con una resina reforzada para tratar de minimizar el riesgo de fracturas (Shabahang, 1999). A pesar del éxito de estos procedimientos, el desarrollo radicular no continúa y por lo tanto estas raíces permanecen delgadas, frágiles y susceptibles a las fracturas.

Existen reportes clínicos que han demostrado que es posible realizar tratamientos de apexogénesis en dientes con pulpas no vitales (Trope, 2006; Iwaya *et al.*, 2001; Banch and Trope 2004; Chueh and Huang, 2006).

Se ha sugerido un nuevo protocolo para el tratamiento de dientes necróticos con ápice inmaduro que implica la inducción de sangrado intraconducto creando un coágulo que funcione como andamio para la generación de tejido vital y así se continúe con el desarrollo normal de la raíz.

Los procedimientos de regeneración inician con la irrigación con hipoclorito de sodio y la medicación intraconducto de hidróxido de calcio o de antibióticos con duraciones variables. Estas técnicas incluyen en uso de andamios (coágulo sanguíneo, plasma rico en plaquetas o en fibrina, esponjas de colágeno), la estimulación de factores de crecimiento y posteriormente el sellado con barreras bioactivas. Los andamios ya sea con la simple inducción de sangrado para formar un coágulo o el uso de biomateriales, sirven como una matriz natural que será invadida por células madre. Este procedimiento induce la revascularización y la formación de nuevo tejido duro. Estos protocolos están basados en conceptos de medicina regenerativa (Huang 2009, Mari-Beffa *et al.*, 2017).

La vascularización vía crecimiento apical de vasos sanguíneos en un espacio que contiene células madre facilita la regeneración exitosa dentro del espacio radicular (Nygard-Ostby and Hjortdal, 1971).

Con el creciente incremento en el conocimiento de la biología de las células madre, el campo de la ingeniería tisular ha creado la disciplina llamada medicina regenerativa. La ingeniería tisular es el campo que restablece la estructura y fisiología de tejidos dañados por cáncer, enfermedades o trauma ( Nakashima and Akamine, 2005).

La regeneración endodóntica se define como una serie de procedimientos biológicos que permiten reemplazar estructuras dañadas como dentina, estructuras radiculares y células del complejo pulpo-dentinario. Los objetivos de la regeneración endodóntica son generar tejidos parecidos a la pulpa, idealmente el complejo pulpo-dentinario, regenerar dentina coronal dañada después de una exposición cariosa, regenerar la raíz resorbida, dentina apical o cervical ( Murray *et al.*, 2007).

Usualmente este proceso involucra la combinación de tres elementos clave que son las células madre, factores de crecimiento y biomateriales llamados andamios.

#### **4.4 Células madre dentales**

Una célula madre dental es un tipo de célula autorenovable y en los dientes se involucran en el mantenimiento y el desarrollo del tejido dental. Las células madre dentales y sus células hijas crecen y se diferencian dependiendo de los factores de crecimiento liberados por el microambiente que rodea al diente.

Durante el desarrollo animal o la regeneración, las células orquestan la generación de tejidos y órganos por medio de un programa genético, este programa comprende una red de factores de transcripción específicos.

En el núcleo celular, estos factores regulan la transcripción de genes codificados para señales moleculares. Estas moléculas pueden ser liberadas a las células circundantes, las cuales a su vez pueden regular la transcripción genética a las células vecinas activando nuevos factores de transcripción (Marí-Beffa *et al.*, 2017).

La importancia de estos factores es que proveen el patrón posicional, el control del tamaño y la diferenciación celular. Una vez que la célula adquiere un patrón específico obtiene un mecanismo de memoria posicional que en el futuro se mantendrá para generar la apariencia histológica final.

Esta red de factores de transcripción puede ocurrir durante el desarrollo dental y la regeneración. El factor de crecimiento transformador beta-1, la proteína morfogenética ósea 2, proteína de matriz dentinaria 1 o factor de crecimiento de hepatocitos son algunas moléculas señalizadoras derivadas de dentina.

Estas moléculas regulan las interacciones célula-célula, controlan la proliferación celular y la diferenciación durante el desarrollo dental. Algunas de estas biomoléculas son MSC proangiogénicas o factores tróficos. Durante el desarrollo quedan atrapadas en la matriz dentinaria donde permanecen funcionales durante toda la vida. De esta forma, la dentina puede ser considerada un reservorio de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas con roles importantes en la reparación y la regeneración (Marí-Beffa *et al.*, 2017).

En una pulpa sana, estas moléculas pueden permanecer en un estado fosilizado, y solo cuando existe una enfermedad, la disolución de la matriz puede ser observada

llevando a la liberación de moléculas bioactivas. En algunos casos, éstas se asocian con la fase mineral de la dentina por medio de la unión de iones no específica, en otros casos, esta unión es más específica involucrando al TGF-B1( Smith *et al.*, 2016).

Los tratamientos de regeneración endodóntica pueden liberar estos factores almacenados en la dentina, la dentina tratada podría actuar como nicho extracelular potencialmente modulando el crecimiento y la diferenciación de odontoblastos durante la regeneración endodóntica (Marí-Beffa *et al.*, 2017).

#### **4.4.1 Células madre de la pulpa dental**

Las terapias basadas en células madre han sido empleadas en muchos procedimientos regenerativos. El objetivo de esta terapia es reemplazar, reparar o aumentar las funciones biológicas de los órganos o tejidos dañados. Es deseable que las células mesenquimatosas/células progenitoras (MSCs) sean una fuente inagotable de productos terapéuticos en la terapia celular. Las MSCs son derivadas del mesodermo y están presentes en muchos tejidos y órganos posnatales. Se han aislado de diferentes fuentes como médula ósea, tejido adiposo, hueso, periostio líquido sinovial, músculo esquelético, piel, pericitos de los vasos sanguíneos, ligamento periodontal, cordón umbilical y pulpa dental de dientes permanentes y deciduos (Nakashima *et al.*, 2013; Gronthos *et al.*, 2000) .

Todos los tejidos se originan de las células madre. Una célula madre comúnmente se define como una célula que tiene la habilidad de dividirse continuamente y producir una progenie que puede diferenciarse en varios tipos de células o tejidos. Las células madre pueden ser embrionarias/fetales o adultas/posnatales. Estas células tienen el potencial de desarrollar diferentes tejidos especializados, es decir plasticidad. La plasticidad de las células madre embrionarias es mucho mayor que las células madre posnatales.

Las células madre se dividen en: totipotentes, multipotentes y pluripotentes esto de acuerdo a su plasticidad.

Las células madre también son categorizadas por su fuente de obtención, las células madre autólogas son obtenidas del mismo individuo al que le serán implantadas para terapia celular.

Los tratamientos de regeneración endodóntica se realizan con células madre posnatales autólogas debido a que estas parecen tener pocas desventajas en cuanto a su uso clínico (Murray *et al.*, 2007). Las células madre autólogas son fáciles de obtener, tienen capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación en multilínea.

Las células madre adultas son también llamadas células madre somáticas o posnatales y estas se encuentran en diferentes órganos o tejidos. Aunque muy pocas de estas células están presentes en tejidos adultos, su capacidad de autorenovación y diferenciación mantiene los tejidos saludables y pueden reparar tejidos dañados o lesionados. Estudios recientes han identificado células madre en la región oral y maxilofacial, estas células residen en áreas específicas denominadas nichos de células madre.

Además de las células madre de la pulpa dental, (DPSCs), se han identificado células madre de la papila apical (SCAPs), células progenitoras periapicales inflamatorias (iPAPCs), células madre del folículo dental (DFSCs), células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), células madre de la médula ósea (BMSCs), células progenitoras del germen dental (TGPCs), células madre de las glándulas salivales (SGSCs), células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED), células madre del epitelio oral (OESCs), células madre mesenquimales derivadas de encía (GMSCs) y células madre derivadas de periostio (PSCs) (Diogenes *et al.*, 2013).

Se han caracterizado dos tipos de células madre adultas en los tejidos dentales, por ejemplo células madre epiteliales y células madre parecidas a células estromales mesenquimatosas. Las células madre de la pulpa dental (DPSCs) pueden ser fácilmente colectadas de dientes permanentes y cultivadas de manera segura y mínimamente invasiva. DPSCs tienen un alto potencial angiogénico, neurogénico y regenerativo comparado con células madre de la médula ósea y células madre adiposas (Nakashima *et al.*, 2013).

Las células madre mesenquimales (MSCs) han sido identificadas en muchos tejidos y son capaces de diferenciarse en muchos linajes de células cuando crecen en condiciones definidas, incluyendo linajes osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos, miogénicos y neurogénicos. Una consideración importante es que las DPSCs y SHED poseen propiedades como multidiferenciación y autorenovación.

Estas células tienen la habilidad específica para regenerar al complejo pulpo-dentinario cuando se ha trasplantado a ratones inmunocomprometidos. SHED pueden específicamente inducir la formación de una matriz parecida al hueso con estructura lamelar por medio del reclutamiento de células del huésped (Egusa *et al.*, 2012).

Se ha considerado que para que continúe el desarrollo radicular, la vaina epitelial de Hertwig y la papila apical deben ser funcionales. Por otro lado, si la pulpa, la vaina epitelial y la papila apical están completamente perdidas, la raíz puede incrementar el grosor por crecimiento de cemento derivado de áreas periapicales dentro de las paredes dentinarias del conducto radicular, este crecimiento de cemento puede estar acompañado de ligamento periodontal y de hueso (Huang, 2009).

Las células madre residen en nichos que proveen un microambiente responsable del mantenimiento de éstas de manera indiferenciada. Al rededor de estos nichos existe

una interacción entre células madre, células de varios linajes, matriz extracelular y moléculas solubles incluyendo factores de crecimiento.

En la pulpa dental, se han reportado nichos de células madre perivasculares, la movilización de células madre indiferenciadas depende en gran parte de las respuestas vasculares y angiogénicas. Una vez recluidas, las células madre dentales no solo tienen características reparadoras sino también inmunomodulatorias. Sus propiedades incluyen su habilidad para suprimir citocinas proinflamatorias (Smith *et al.*, 2016).

DPSCs responden a lesiones dentales por proliferación, migración y diferenciación para reemplazar odontoblastos, llevando a la síntesis y secreción de dentina terciaria o dentina reparativa.

DPSCs muestran una alta actividad migratoria *in vitro* con muchas citocinas o factores de crecimiento, incluyendo factor derivado de células estromales-1 alfa (SDF-1a), factor estimulador de colonias de granulocitos G-CSF, GM-CSF, y factor de crecimiento de fibroblastos-2. La capacidad migratoria de estas células puede ser modulada por una variedad de citocinas y factores de crecimiento de esta forma se aumenta su potencial regenerativo (Nakashima *et al.*, 2013).

La señalización celular es un proceso complejo de comunicación entre diferentes células dentro de uno o múltiples tejidos y forman la base de todas las actividades celulares; la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis son todos los procesos instruidos por diferentes señales. Dependiendo del contacto celular y la distancia entre las células, la señalización celular puede ser dividida en diferentes categorías.

Las señales parácrinas son señales transmitidas solo sobre distancias cortas a través de factores que ejercen sus efectos localmente, estos factores son secretados por

una célula y solo afectan a sus células vecinas debido a su rápida degradación, consumo o limitación de movimiento por la matriz extracelular (ECM) (Huang *et al.*, 2012).

Existe un creciente e importante realce del potencial para la secreción de factores tróficos de las células madre progenitoras. Se ha observado que las células madre mesenquimales son capaces de secretar un amplio espectro de citocinas y factores de crecimiento que afectan a sus células vecinas. El éxito en la reparación o regeneración se debe en parte al efecto de estos factores impartidos en el tejido del huésped. Los efectos parácrinos pueden estimular el reclutamiento de células huésped progenitoras, aumentar la angiogénesis/neurogénesis y posiblemente modular la respuesta inmune ( Doorn *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2013).

Los factores tróficos o parácrinos expresados en MSCs son VEGF-A, ANG-1, TPO, HGF, LIF, IGF- proteínas de unión 1,2,3,4, FGF-4, leptina, fractalina, péptido activador de neutrófilos-2, (NAP-2) proteína 1-beta , así como un pequeño número de citocinas, IL-6,7,8 y 10, factores de crecimiento (G-CSF,GM-CSF, SDF-1 y SCF) (Doorn *et al.*, 2012).

Los factores secretados por DPSCs exhiben efectos tróficos e inmunomodulatorios. Los factores tróficos secretados por DPSCs incrementan la movilización y proliferación de células progenitoras, inhiben apoptosis, inducen angiogénesis o neurogénesis. Los factores inmunoregulatorios ejercen efectos proliferativos sobre células T e incrementan en perfil antiinflamatorio, dando como resultado tolerancia inmune por el efecto producido sobre células T regulatorias (Treg) (Nakashima *et al.*, 2013).

#### 4.4.2 Células madre de papila apical (SCAPs)

En los dientes en desarrollo, la formación radicular comienza cuando las células epiteliales que se encuentran en el borde cervical (diafragma epitelial) en la unión del epitelio dental interno con el epitelio dental externo, proliferan apicalmente, células mesenquimatosas se diferencian en odontoblastos y en cementoblastos formando la vaina epitelial de Hertwig que será la responsable de determinar la formación de la raíz.

Se sabe que la papila dental contribuye a la formación dental y eventualmente se convierte en pulpa dental. Debido a que la raíz se continúa desarrollando después de la etapa de campana, la localización de la papila se encuentra más apical que la pulpa dental. Está localizada apicalmente con respecto al diafragma epitelial. Las características histológicas en la unión de la pulpa y la papila son diferentes.

Los odontoblastos derivados de la papila dental se denominan odontoblastos primarios estos forman dentina primaria y secundaria durante en desarrollo dental, de manera opuesta, se denomina odontoblastos de reemplazo o células parecidas a odontoblastos a aquellos que reemplazan a los odontoblastos primarios y forman dentina terciaria, de reemplazo o reparativa ( Sonoyama *et al.*, 2008).

Los odontoblastos de reemplazo provienen de células mesenquimatosas localizadas en la zona rica en células presentes en la región perivascular.

Es importante señalar que existen células madre o progenitoras tanto en la papila apical como en la pulpa dental, pero ambas tienen distintas características. La densidad vascular en la papila apical es menor que la de la pulpa. Este tejido es beneficiado por circulación colateral que le permite sobrevivir durante el proceso de necrosis pulpar (Sonoyama *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008).

Las SCAPs son una población de células madre dentales que tiene un gran potencial en endodoncia regenerativa. Estas células son la principal fuente de células indiferenciadas en el proceso del desarrollo dental, tienen mayor tasa de proliferación que las células madre de la pulpa dental (Huang *et al.*, 2008). Además de ha demostrado su capacidad de formar células parecidas a odontoblastos y por lo tanto formar dentina *de novo in vivo* (Huang *et al.*, 2010), los eventos celulares en este proceso suceden de la siguiente forma: 1) algunas SCAPs o DPSCs sobre andamios de un copolímero poliláctico (PLG) en el conducto radicular migran hacia la superficie de la dentina, 2) estas células reciben señales de la dentina y se diferencian en células parecidas a odontoblastos, 3) un proceso celular se extiende desde cada célula hacia los túbulos dentinarios. 4) las células inician la producción de matriz extracelular en el espacio del túbulo dentinario así como en la superficie de la dentina y 5) los pasos remanentes son similares a la aposición de tejido parecido a dentina durante la producción de dentina natural, excepto que las células descansan sobre un tejido parecido a dentina a un ritmo diferente.

La capacidad de las células madre de la papila apical para diferenciarse en células dentinogénicas funcionales ha sido verificada en modelos animales. Se ha demostrado que la papila apical contiene multipotentes células madre mesenquimales (MSCs) que expresan varios marcadores MCS. Estas son capaces de formar células parecidas a odontoblastos, producir dentina *in vivo* y además ser fuente de odontoblastos primarios para la formación de dentina radicular (Ruparel *et al.*, 2013).

El descubrimiento de las SCAPs puede explicar el por qué se presenta apexogénesis en dientes permanentes inmaduros infectados con periodontitis apical o con presencia de abscesos (Iwaya *et al.*, 2001; Banch and Trope 2004; Chueh and Huang 2006).

Las SCAPs que residen en la papila apical sobreviven a la infección debido a la proximidad de los tejidos periapicales, por lo tanto, después de la desinfección endodóntica bajo la influencia de la vaina epitelial de Hertwig, estas células son la fuente primaria de odontoblastos que completan la formación radicular (Huang, 2009).

Las SCAPs pueden sobrevivir durante la periodontitis apical donde una microflora compleja, mediadores inflamatorios, células inmunes y una baja tensión de oxígeno son comúnmente encontradas.

Las razones biológicas para esta aparente resiliencia pueden explicarse por la relativamente baja densidad de vasos sanguíneos en la papila apical comparada con la pulpa dental adyacente, mientras el folículo dental que rodea a la papila es altamente vascularizado y puede actuar como un lecho vascular para suministrar nutrientes a las SCAPs.

La papila está equipada para recibir nutrientes y oxígeno vía difusión de tejidos circundantes tales como el folículo dental y posiblemente tejido granulomatoso vascularizado presente en la periodontitis apical.

Se ha demostrado que los ambientes hipóxicos aumentan la proliferación, supervivencia y potencial angiogénico de las células madre. Estos efectos también han sido observados cuando las células madre han sido expuestas a bacterias por productos como sus endotoxinas.

De esta forma, es posible que las SCAPs y las células madre circundantes puedan sobrevivir y mantener su potencial de diferenciación en condiciones adversas tales como periodontitis apical y abscesos apicales (Diogenes *et al.*, 2013).

#### 4.5 Desinfección intraconducto

Uno de los elementos clave para los procedimientos de regeneración se ha atribuido a la ausencia de infección (Fouad, 2011). La infección dentro del espacio pulpar puede interrumpir la habilidad de los tejidos para desarrollarse dentro del conducto radicular.

Los tratamientos de regeneración endodóntica incluyen un debridamiento mecánico mínimo, tomando en cuenta que tratamos con dientes con paredes dentinarias muy delgadas, se debe realizar una instrumentación que impida el debilitamiento de la estructura dental.

Es importante considerar que si no existe fricción contra las paredes dentinarias, las bacterias del biofilm pueden permanecer intactas por lo que podrían ser más resistentes a los agentes bacterianos que aquellas bacterias planctónicas que tienen una disrupción mecánica. Otro factor importante a considerar en la desinfección es que aunque es necesaria una alta eficacia antimicrobiana, también se necesita evitar la irritación del tejido regenerado, una mínima toxicidad sobre los tejidos duros y blandos (Fouad and Verma 2014).

La formación de un coágulo dentro del conducto radicular constituye un paso crítico debido a que éste actúa como una fuente de células madre desde los tejidos periradiculares tales como SCAPs, tan pronto como se forma un coágulo de fibrina que actúa como andamio para soportar la proliferación celular, también se pueden proveer factores de crecimiento presentes en las plaquetas, estos factores también están presentes en la dentina (Lovelace *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2016).

Varios protocolos de desinfección se han propuesto en estos casos incluyendo la aplicación de hipoclorito de sodio (NaOCl) a concentraciones que van del 1.25% al 5.25%, clorhexidina al 2%, estos irrigantes se han propuesto por sus propiedades bactericidas y efectos bacteriostáticos.

El NaOCl podría ser el agente antimicrobiano más potente usado en endodoncia, sin embargo, su uso puede ser citotóxico para las SCAPs, previniendo su adhesión a paredes dentinarias y pudiendo abortar el efecto de factores de crecimiento secuestrados en la dentina.

Los efectos del NaOCl pueden ser moderados por el EDTA al 17%, particularmente como irrigación final después del uso de hipoclorito de sodio a bajas concentraciones como 1.25% (Martin *et al.*, 2014).

Uno de los beneficios del EDTA, es que el uso en procedimientos de regeneración puede ayudar a la liberación de factores de crecimiento embebidos en la matriz orgánica de la dentina, como se ha mencionado anteriormente, estos factores permiten la proliferación, supervivencia y diferenciación de células madre dentales. (Treviño *et al.*, 2001).

La clorhexidina no ha demostrado contribuir significativamente a la desinfección. La CHX usada en regeneración puede ser tóxica para las células madre de papila apical además de formar químicos como PCA cuando interactúa con el NaOCl. (Basrani *et al.*, 2004)

Debido a que por si sola la irrigación es insuficiente para la desinfección de los conductos, se ha observado que el uso de medicamentos como pastas antibióticas incrementa la eficacia en la erradicación bacteriana en un 70%.

#### 4.6 Marco de referencia

En 1984 WD Miller fue el primero en observar diferentes microorganismos dentro del conducto radicular, sin embargo muchas bacterias no pudieron ser cultivables. No fue hasta 1982 que se demostró que existen diferencias en la disponibilidad de nutrientes y tensión de oxígeno en la región apical comparada con el conducto principal lo que permite un crecimiento lento y dominante de bacterias anaerobias obligadas en la región apical de los conductos radiculares (Fabricius *et al.*,1982).

La presencia de hongos en conductos radiculares fue inicialmente reportada por Grossman, quien encontró evidencia fúngica en 17% de muestras evaluadas. Hongos y levaduras han sido aislados de conductos radiculares con necrosis pulpar y periodontitis apical. La presencia de estos patógenos se atribuye a invasiones oportunistas en conductos radiculares infectados (Waltimo *et al.*, 1997). Baumgartner en el 2000, reportó una incidencia del 21% de ocurrencia de *Candida albicans* en infecciones de origen endodóntico. Mergoni *et al.*, en el 2018 en un meta-análisis y revisión sistemática de la prevalencia de *Candida albicans* en infecciones endodónticas, hacen énfasis en la importancia del enfoque en estrategias terapéuticas para la erradicación de infecciones fúngicas de origen endodóntico.(Peerson, 2017, Mergoni, 2018).

Muchos estudios han reportado que *C. albicans* y *E. faecalis* son capaces de invadir túbulos dentinarios a una profundidad variable, por lo que para su erradicación es necesario contar con agentes antimicrobianos efectivos. Se ha demostrado que estas especies son resistentes al hidróxido de calcio. (Peerson, 2017; Siqueira, 2004; Waltimo, 1997).

Nagata *et al.*, 2014 reportó los patógenos endodónticos comúnmente encontrados en dientes con ápice inmaduro.

De manera interesante, una de las especies más prevalentes fue *Actinomyces naeslundii* (67%), seguido de *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*(33%), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*(26%), *Tannerella forsythia*(20%), *Filifactor alocis* y *Treponema denticola* (13%).

Se ha demostrado que *Actinomyces naeslundii* es capaz de formar colonias periapicales que resisten a las respuestas del huésped. Esto es importante debido a que en un ápice abierto, esta flora puede traslocarse fácilmente a la lesión apical (Fouad, 2017).

Lin *et al.*, en 1984, encontraron tejido vital incluso en casos asociados con radiolucencias periapicales. En el caso de dientes inmaduros con lesiones periapical se sugiere la presencia de tejido vital apical. La infección se puede diseminar a través de la pulpa sobreviviente alcanzando tejidos periapicales.

Etsuro Hoshino *et al.*, en 1996, menciona que la aplicación de drogas antibacterianas podría representar un método de erradicación bacteriana en el tratamiento de conductos radiculares, sugiriendo el uso de Metronidazol como agente bactericida de amplio espectro con acción contra anaerobios obligados. Sato *et al.*, en 1992, demostró que una mezcla de antibióticos como ciprofloxacino, metronidazol y minociclina (cada uno en concentraciones de 100 ug ml-1) pueden esterilizar lesiones cariosas, pulpas necróticas y dentina radicular infectada de dientes deciduos, surgiendo así la pasta triple antibiótica.

Nygaard-Ostby y Hjortdal en 1971 fueron los primeros en definir procedimientos de regeneración endodóntica mencionando que la formación de un coágulo sanguíneo podría ser el primer paso en la reparación del tejido pulpar dañado.

Shabahang *et al.*, en 1999, sugiere el uso del mineral trióxido agregado (MTA) como barrera apical como alternativa de tratamientos de apexificación en dientes necróticos con ápice inmaduro.

Grontos *et al.*, en el 2000, demostró que las células madre de la pulpa dental tienen propiedades clonogénicas, es decir exhiben unidades formadoras de fibroblastos en cultivos, *in vivo* DPSCs pueden diferenciarse en odontoblastos e inducir a las células huésped a participar en la regeneración generando complejos parecidos a pulpodentinarios después de trasplante subcutáneo en conjunto con andamios de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) en ratones inmunocomprometidos. La diferenciación en osteoblastos que secretan abundante matriz extracelular y que puede construir hueso joven o reticular ha sido demostrado *in vitro*. DPSCs pueden diferenciarse en oligodendrocitos maduros o neuronas funcionalmente activas después de su trasplante en el mesencefalo embrionario. También se ha demostrado músculo liso y esquelético inducido por DPSCs *in vivo*. Estos potenciales de diferenciación multilínea de las DPSCs sugieren su utilidad en varios campos de la medicina regenerativa.

Sonoyama *et al.*, en el 2008, demostró que existe una pérdida de conexión física entre la papila apical y la pulpa dental. Histológicamente se observa una capa densamente poblada llamada zona apical rica en células entre estos dos tejidos.

Para verificar el rol funcional de la papila apical, se han realizado experimentos en donde se ha removido la papila en dientes en desarrollo observándose que en estos casos se detiene el desarrollo a pesar de que la pulpa está intacta. Basado en esta evidencia se cree que las células madre de la papila apical (SCAP) y no las de la pulpa dental (DPSCs) son la fuente de odontoblastos primarios que producen dentina radicular (Sonoyama *et al.*, 2008).

Se ha observado que el crecimiento de SCAP aisladas en cultivos puede llevar a diferenciación dentinogénica cuando se estimula con dexametasona suplementada con L-ascorbato-2-fosfato y fosfato inorgánico. Además de su potencial dentinogénico, SCAP exhiben diferenciación adipogénica y neurogénica (Huang *et al.*, 2008). El potencial neurogénico de SCAP puede ser debido a que éstas derivan de células de la cresta neural.

Srisuwan *et al.*, en el 2014, demostró que 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 células madre de papila apical (SCAP), fibroblastos del ligamento periodontal humano, células de pulpa dental humana y células papilares apicales .

Treviño *et al.*, en el 2011, aislaron SCAP de dientes inmaduros, las células fueron irrigadas con diferentes concentraciones de NaOCl, ácido etilendiamino-tetracético 17% (EDTA), Clorhexidina (CHX) al 2% y alcohol isopropílico. Los resultados mostraron que la irrigación con EDTA al 17 % muestra una gran viabilidad celular en comparación con los otros irrigantes, seguido de la combinación de EDTA con NaOCl, por otro lado, los protocolos que contenían CHX fueron letales para todas las células viables.

En este estudio, los protocolos de irrigación que contenían EDTA tuvieron mayor supervivencia de SCAP y este hallazgo confirma la hipótesis de que los factores liberados de la dentina pueden promover la supervivencia de SCAP en el sistema de conductos radiculares (Treviño *et al.*, 2011). Se ha observado que el número de DPSCs adheridas a las superficies radiculares puede variar dependiendo de los irrigantes utilizados.

El NaOCl al 6% puede afectar la adherencia de estas células en las paredes de los conductos, además se observó que tanto el NaOCl como la CHX son citotóxicos para estas células (Ring *et al.*, 2008).

A pesar de esto, se ha demostrado que el uso de NaOCl a bajas concentraciones, es decir al 1.5% puede promover la supervivencia y diferenciación de células madre y esto se puede potencializar seguido de una irrigación con EDTA al 17% (Martin *et al.*, 2014).

Estos hallazgos remarcan que incluso los irrigantes utilizados comúnmente en endodoncia pueden tener un efecto profundo en la supervivencia y capacidad de diferenciación de las células madre.

Estudios independientes han mostrado que el acondicionamiento de dentina con NaOCl al 5% o 6% previene la diferenciación de SHED y DPSCs, el efecto prolongado del NaOCl es tóxico para las células madre, de esta forma, el acondicionamiento con NaOCl a su máxima concentración lleva a una gran disminución en la supervivencia de las células madre y por lo tanto a la diferenciación de células parecidas a odontoblastos (Diogenes *et al.*, 2014).

Los medicamentos intraconducto más usados en procedimientos de regeneración endodóntica incluyen la mezcla de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina, también llamada pasta triple antibiótica (TAP). Esta combinación ha mostrado ser altamente eficaz contra bacterias que comúnmente infectan el sistema de conductos radiculares. Sin embargo, se han usado otros medicamentos como el CaOH<sub>2</sub>, Formocresol, la combinación de metronidazol y ciprofloxacino (DAP) y combinación de metronidazol y ciprofloxacino con cefaclor (Thibodeau, *et al.*, 2007; Diogenes *et al.*, 2017).

Shaik *et al.*, en el 2014, demostraron que la combinación de TAP+chitosan y CaOH<sub>2</sub>+chitosan producen mejores resultados contra *C. albicans* y *E. faecalis* que cuando se combinan con solución salina:

Del Carpio *et al.*, en el 2017, menciona que la incorporación de nanopartículas de chitosan en la pastas de CaOH<sub>2</sub> tienen el potencial de incrementar la habilidad antibacteriana de multiespecies de biofilm, incluso después de tiempos prolongados de medicaciones intraconducto.

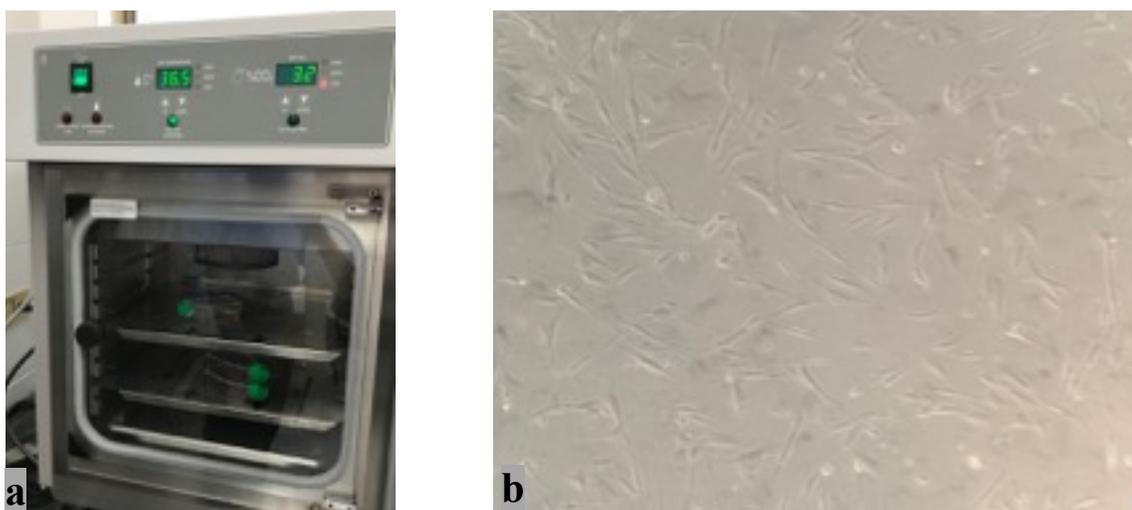
Debido a que las pastas antibióticas son colocadas dentro del conducto por largos periodos (semanas o meses), el contacto con las células madre de la papila apical puede llevar a toxicidad y a la disminución del número de células madre mesenquimales.

Además, existe el potencial para la interacción de antibióticos residuales remanentes sobre paredes dentinarias con la movilización de células madre en el sistema de conductos radiculares después de evocado el sangrado en los procedimientos de regeneración ( Diogenes, 2014).

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Cultivo de células madre de papila apical ( SCAPs)

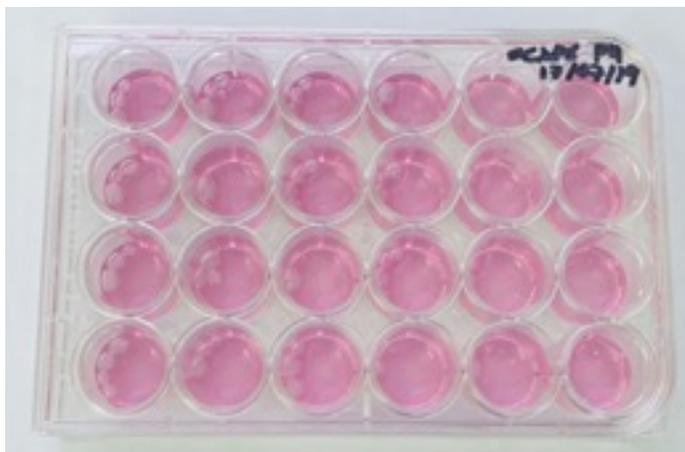
Las células se mantuvieron en medio de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), L-glutamina 2 mM, 100 U /mL de penicilina, 100 µg /mL de estreptomina y 0.25 µg /mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 semanas. El medio se renovó cada 3 días.



**Figura 1.** a) Incubación de SCAPs a 37° con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera humidificada. b) Observación bajo microscopio óptico de células incubadas.

Las SCAPs fueron desprendidas del frasco de cultivo mediante la utilización de tripsina/EDTA 0.25% durante una incubación de 10 minutos a 37°C.

Una vez desprendidas las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 80 mil células por pozo y se mantuvieron en incubación por 24 horas.

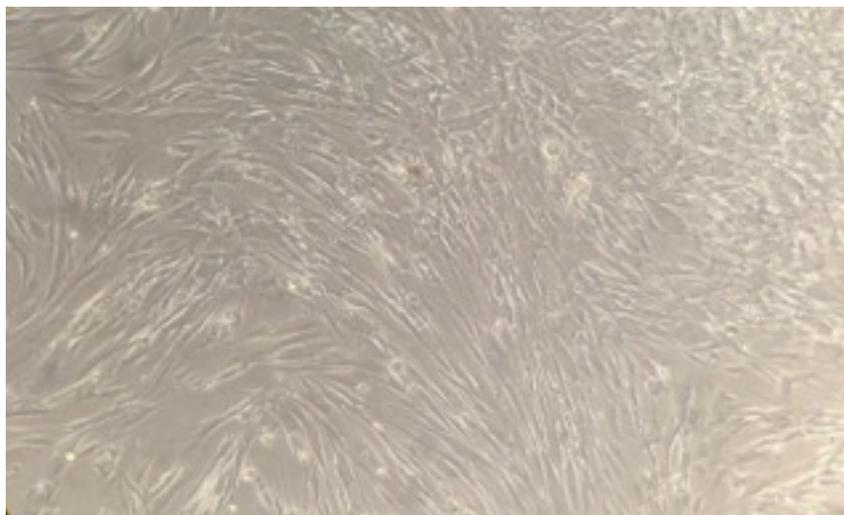


**Figura 2.** Sembrado de SCAPs en placa de cultivo.



**Figura 3.** Observación de confluencia celular bajo microscopio óptico (80 mil células por pozo).

Una vez formada una monocapa celular observada bajo microscopio, se procedió a la colocación de las soluciones doble antibióticas modificadas con antifúngico.



**Figura 4.** Observación de monocapa celular con microscopio óptico 10X. Se observan células espigadas y alargadas en condiciones de crecimiento.

## **5.2 Preparación de soluciones doble antibióticas y antifúngico**

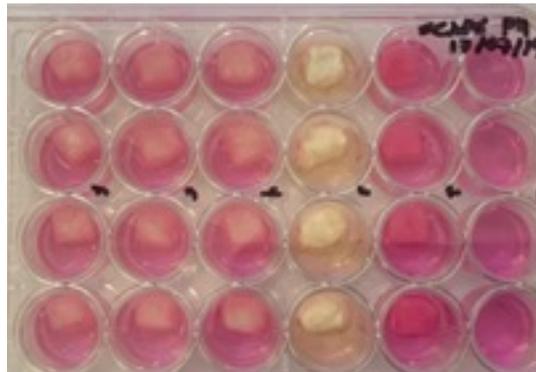
Se realizó la preparación de la solución doble antibiótica modificada con antifúngico en tres concentraciones diferentes; ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .4mg/ml; ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .2 mg/ml+H<sub>2</sub>O; ciprofloxacino .8 mg/ml + metronidazol 2mg/ml + .1 mg/ml + H<sub>2</sub>O. Como grupo control se preparó una pasta doble antibiótica compuesta por ciprofloxacino de 500 mg + metronidazol 500mg+ propilenglicol.

### 5.3 Preparación de esponjas de colágeno

Para la colocación de los medicamentos se utilizó una esponja de colágeno absorbible estéril de 1cm x 1cm x 1 cm (Spongostan™) a la cual se le añadieron 200  $\mu$ l de la mezcla de las soluciones previamente preparadas. Para su completa absorción, se usaron pozos de cultivo a los cuales se les agregó la solución y posteriormente la esponja hasta que estuviera completamente saturada. Para el grupo control también se usó una esponja embebida en la pasta doble antibiótica mezclada con propilenglicol (DAP).

### 5.4 Análisis de la viabilidad celular por tinción de cristal violeta

Una vez preparadas las muestras, con el uso de pinzas esterilizadas se fueron colocando las esponjas en cada pozo de cultivo de acuerdo a los siguientes tratamientos: esponja + H<sub>2</sub>O (control negativo), esponja+ciprofloxacino 500 mg+metronidazol 500 mg + propilenglicol (Esponja+DAP), esponja+ ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml+fluconazol .4mg/ml+H<sub>2</sub>O (Esponja+DAF 2%), ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + fluconazol .2mg/ml+H<sub>2</sub>O (Esponja+DAF al 1%), ciprofloxacino .8mg/ml + metronidazol 2mg/ml + .1 mg/ml + H<sub>2</sub>O (Esponja+DAF 0.5%). Una vez colocadas todas las esponjas, las células fueron incubadas durante 24 hrs a 37° C .



**Figura 5.** Colocación de esponjas de colágeno en pozos de cultivo.

Transcurridas las 24 horas, para el análisis de viabilidad celular se realizó un ensayo cuantitativo utilizando cristal violeta. Brevemente las células fueron teñidas utilizando el colorante cristal violeta para posteriormente extraer la tinción utilizando una solución de ácido láctico. Las soluciones obtenidas de la extracción fueron colocadas en una caja de 96 pozos para determinar su absorbancia en un lector de placas de ELISA a 570 nm.

### **5.5 Análisis morfológico mediante microscopia de campo claro**

Para analizar los cambios morfológicos de las SCAPs, se realizó una tinción utilizando una solución de cristal violeta a .1% la cual se colocó durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para finalmente obtener imágenes de microscopio óptico de luz.

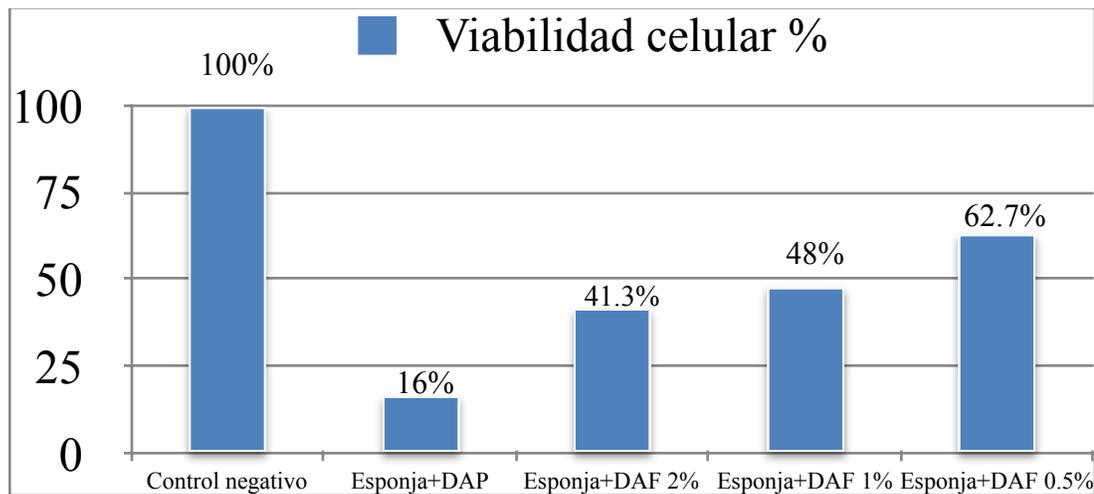
### **5.6 Análisis estadístico**

Los datos recolectados mediante el programa EXCEL se analizaron estadísticamente utilizando un análisis de varianza mediante el programa SPSS. El análisis se determinó considerando un 95% de confiabilidad. Se realizó la estadística descriptiva de la viabilidad de las SCPAPs.

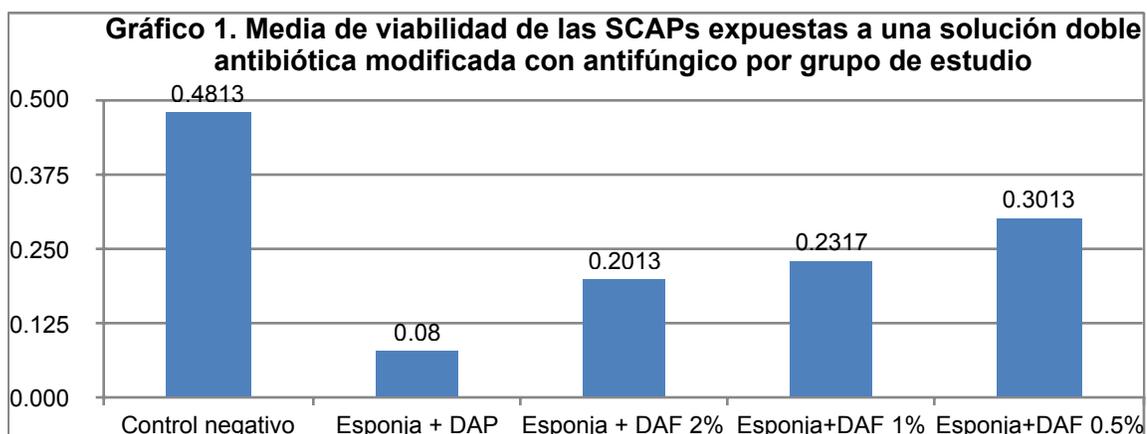
## 6. RESULTADOS

En este estudio se evaluó la tasa de viabilidad de las SCAPs expuestas a una solución doble antibiótica modificada con antifúngico utilizando un ensayo de cristal violeta así como un análisis de los cambios morfológicos de las células.

Los resultados muestran que el tratamiento Esponja+DAP tuvo mayor citotoxicidad con el 16% de viabilidad celular. Los grupos experimentales mostraron mayor viabilidad celular y fueron dependientes de la concentración de las soluciones probadas, el tratamiento Esponja + DAF 2% con un 41.3%, Esponja + DAF 1% con un 48% y Esponja + DAF 0.5% con un 62.7%. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y el grupo 2. (Fig. 6)



**Figura 6.** Porcentaje de viabilidad celular por grupos.

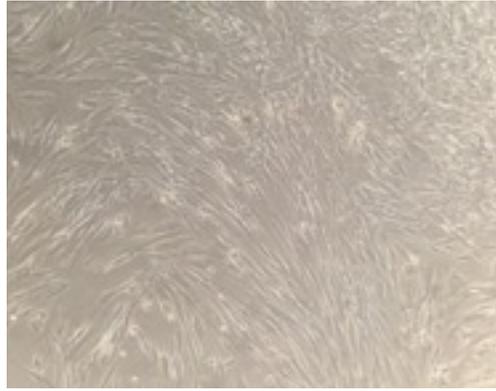


**Figura 7.** Media de viabilidad de las SCAPs expuestas a la solución doble antibiótica modificada con antifúngico por grupo de estudio.

	Control negativo	Esponja + DAP	Esponja + DAF 2%	Esponja + DAF 1%	Esponja + DAF 0.5%
Media	0.481	0.080	0.201	0.232	0.301
DE	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002
Varianza	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Mediana	0.481	0.080	0.201	0.232	0.301
Mínimo	0.480	0.079	0.200	0.231	0.300
Máximo	0.483	0.081	0.203	0.232	0.303
Rango	0.003	0.002	0.003	0.001	0.003
IC 95%	0.478	0.078	0.198	0.230	0.298
	0.485	0.082	0.205	0.233	0.305
Valor p			<0.0001	<0.0001	<0.0001

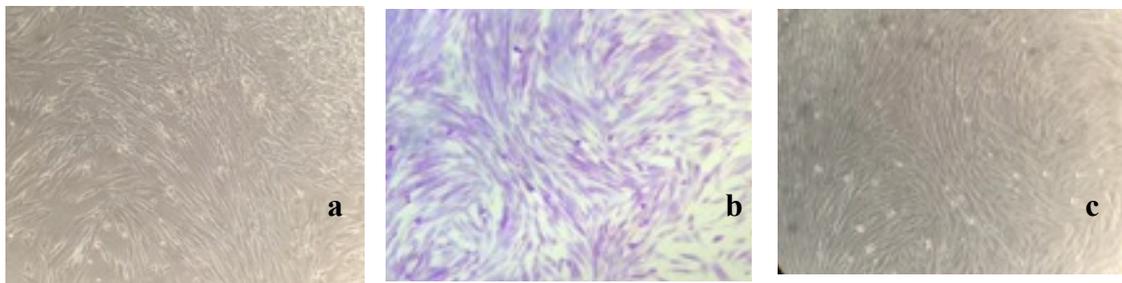
**Tabla 1.** Estadística descriptiva de la viabilidad de las SCAPs expuestas a una solución doble antibiótica modificada con antifúngico por grupo de estudio.

Para el análisis morfológico las células adherentes mostraron diferentes tamaños y morfologías a las 24 hrs en condiciones de crecimiento. En el grupo control negativo, se observó una apariencia espigada alargada con núcleos ovales y centrales. Adicionalmente, fueron observadas varias unidades formadoras de colonias (CFU).

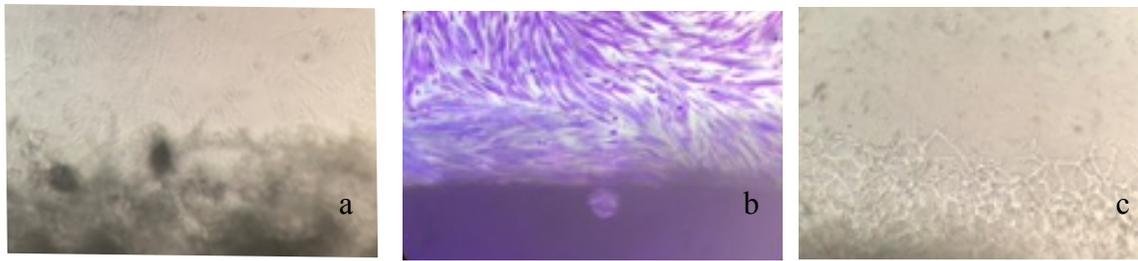


**Figura 8.** SCAPs observadas a las 24 hrs.  
Microscopio óptico 10x.

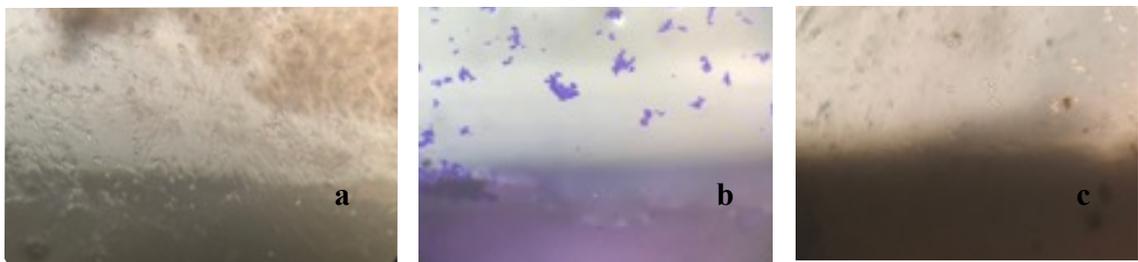
Se observó que las concentraciones si afectan la viabilidad celular ya que las células expuestas a las 24 horas en contacto directo con las soluciones modificaron su morfología, mostrando una apariencia menos espigada, o alargada, dando una forma más trapezoidal, además de que las células no se mantuvieron tan unidas como en el grupo control, sin embargo se observó que se mantuvieron adheridas a la esponja de colágeno; hubo disminución en el conteo dependiente de la concentración del antifúngico.



**Figura 9.** Control SCAPs + Medio. a) Observación inmediatamente después de colocar medio al pozo de cultivo. b) Observación a las 24 hrs con tinción de cristal violeta. C) observación a las 24 horas sin tinción. Observación con microscopio de campo claro.



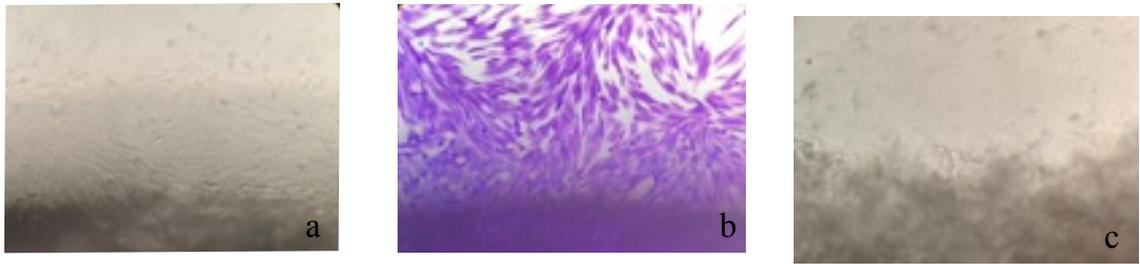
**Figura 10.** Control negativo. a) Observación inmediatamente después de colocar las esponjas sobre las SCAPs más medio de cultivo. b) Observación a las 24 horas con tinción de cristal violeta. c) Observación a la 24 hrs sin tinción. Microscopio óptico de campo claro.



**Figura 11.** Esponja + DAP. a) Observación inmediatamente después de colocar las esponjas sobre las SCAPs más la DAP. b) Observación a las 24 horas con tinción de cristal violeta. c) Observación a la 24 hrs sin tinción. Microscopio óptico de campo claro.



**Figura 12.** Esponja + DAF 2%. a) Observación inmediatamente después de colocar las esponjas sobre las SCAPs más la DAF. b) Observación a las 24 horas con tinción de cristal violeta. c) Observación a la 24 hrs sin tinción. Microscopio óptico de campo claro.



**Figura 13.** Esponja + DAF 1%. a) Observación inmediatamente después de colocar las esponjas sobre las SCAPs más la DAF. b) Observación a las 24 hrs con tinción de cristal violeta. C) Observación a las 24 hrs sin tinción. Microscopio de campo claro 10X.



**Figura 14.** Esponja + DAF 0.5%. a) Observación inmediatamente después de colocar las esponjas sobre las SCAPs más la DAF. b) Observación a las 24 horas con tinción de cristal violeta. c) Observación a las 24 hrs sin tinción.

## 7. DISCUSIÓN

Los estudios sobre la citotoxicidad sobre las SCAPs con el uso de pastas doble antibióticas son muy escasos, sin embargo, se sabe que las concentraciones de los medicamentos usados para la desinfección en casos de dientes necróticos con ápice inmaduro pueden afectar la supervivencia de las células madre remanentes.

Ruparel *et al.*, en el 2012, demostró que las concentraciones de TAP y DAP de 1, 10 y 100 mg/mL evaluadas a 3 días, tienen efectos detrimentales sobre la supervivencia de SCAP mientras que las bajas concentraciones no tuvieron efectos detectables en su viabilidad. En su estudio se colocó un inserto celular (BD Biosciences) con poros de 1 micrometro a una distancia de 2 mm de las placas de cultivo. En este estudio se usaron esponjas de colágeno embebidas con la solución doble antibiótica modificada con antifúngico, mostrando una citotoxicidad moderada, dichas esponjas se colocaron en contacto directo con la monocapa celular a diferencia de lo descrito por Ruparel, donde hubo un espacio entre los medicamentos y las células.

Chuensombart *et al.*, en el 2013, evaluaron el efecto citotóxico de la TAP, así como cada uno de los antibióticos de manera independiente a diferentes concentraciones (25, 6.25 y 1.65  $\mu\text{m/ml}$ ), observando que la TAP, minociclina y ciprofloxacino fueron citotóxicos a cultivos de SCAPs y DPCs. La citotoxicidad de cada antibiótico excepto el metronidazol incrementa dependiendo de la concentración y del tiempo de contacto. El metronidazol en todas las concentraciones tuvo un reducido efecto en la viabilidad celular. En este estudio se observó que en el día 1 hubo una mayor viabilidad celular, mientras que al día 7 se generó una menor viabilidad celular.

En este estudio únicamente se realizó una evaluación a las 24 horas observando una citotoxicidad moderada, sin embargo de acuerdo a los resultados se concluye que la citotoxicidad celular es dependiente de la concentración y la reducción de la misma puede producir menores efectos sobre las SCAPs y por lo tanto aumentar su supervivencia.

Labban *et al.*, en el 2014, evaluaron los efectos de la DAP, TAP y CaOH<sub>2</sub> sobre DPCs, utilizando un ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y un ensayo colorimétrico de proliferación celular (WST-1), en donde utilizaron los medicamentos a diferentes concentraciones mezcladas con medio de cultivo (DMEM). Observaron que para la DAP la concentración más segura fue al 0.3 mg/ml. En este estudio solo se usaron DPCs y el autor menciona que los diferentes ensayos utilizados para evaluar citotoxicidad pueden dar resultados variados. En este estudio se utilizó una tinción de cristal violeta y la evaluación de la absorbancia en un lector de ELISA para evaluar la citotoxicidad y la viabilidad celular y de la misma forma, se observó que a menor concentración de los medicamentos evaluados, hubo menor citotoxicidad comprobando que ésta es dependiente de la concentración de los medicamentos utilizados.

Latham *et al.*, en el 2016 comparó el potencial antimicrobiano y citotóxico de la TAP y DAP a diferentes concentraciones (0.1, 1, y 10 mg/ml), observando que entre menor concentración, menor citotoxicidad, sin embargo no hay efecto suficiente para eliminar bacterias en túbulos dentinarios; por el contrario, al aumentar la concentración, hay mayor efecto antimicrobiano pero al mismo tiempo mayor citotoxicidad. En este estudio se observó que existe citotoxicidad dependiente de la concentración concordando con los resultados de Latham *et al.* Se realizaron pruebas con las mismas concentraciones sobre *Candida albicans* demostrando un excelente efecto inhibitorio.

Althumairy *et al.*, en el 2014, observó los efectos indirectos de la exposición de dentina sobre las SCAPS a TAP o DAP a 1 o 1000 mg/mL. En su estudio se usaron discos de dentina que fueron expuestos a las pastas antibióticas y después de un periodo de 7 o 28 días se eliminó la pasta y se incubaron las SCAPs para evaluar su supervivencia. Los resultados mostraron que la exposición a 1000 mg/ml provoca citotoxicidad y no se observó viabilidad de SCAPs, mientras que el uso de estos medicamentos a 1 mg/mL no tuvo efectos adversos.

En este estudio se realizó la evaluación de la solución doble antibiótica modificada en contacto directo con las células, un hallazgo importante fue que a los 15 minutos de exposición a la DAP se observó bajo el microscopio óptico una gran pérdida de adhesión de las SCAPs a las esponjas a diferencia de las otras soluciones probadas, en donde las células permanecieron adheridas a la esponja y a las 24 horas se observó una alta viabilidad de las mismas.

Hosseini Matin *et al.*, en el 2015 evaluaron la citotoxicidad de la TAP a concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/ml sobre fibroblastos de pulpa dental cultivados, mediante un lector de ELISA observaron que las concentraciones de 10 mg/ml tuvieron efectos citotóxicos moderados.

En este estudio se utilizaron pastas de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina. No se menciona el método de colocación de la pasta sobre las placas de cultivo. En nuestro estudio se utilizaron esponjas de colágeno embebidas en las soluciones para asegurar el contacto directo de las células con los medicamentos y así poder realizar la evaluación de manera más fiable, nuestros resultados mostraron que la DAP tuvo un alto efecto citotóxico sobre las SCAPs.

Fernandes Zancan *et al.*, en el 2018, evaluó el efecto de diferentes antimicrobianos y antifúngicos contra *Candida albicans* y *E. faecalis*, observaron que la combinación de metronidazol con ketoconazol, así como ciprofloxacino con ketoconazol y metronidazol solo, tienen buena acción antimicrobiana contra *Candida albicans*. Se puede observar que el uso de un agente antifúngico como lo propuesto en esta investigación, puede ser empleada como agente antimicrobiano en combinación con los antibióticos.

## 8. CONCLUSIONES

- Es posible cultivar una subpoblación de SCAPs utilizando condiciones de cultivo *In Vitro*.
- Se observó que la solución doble antibiótica modificada con antifúngico es capaz de provocar citotoxicidad dependiente de la concentración sobre las SCAPs.
- La concentración de la solución modificada con antifúngico que provocó menor citotoxicidad fue la del 0.5%.
- Bajo las condiciones de este estudio, se observó que la solución doble antibiótica modificada con antifúngico puede ser una alternativa como medicación intraconducto en regeneración endodóntica.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of Endod.* 2014; 40(4): 521–525.
2. American Association of Endodontists. Glossary of endodontic terms, 2016 9th ed. Chicago: American Association of Endodontists.
3. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *2002 Dent Traumatol* 2002;(18):134–7.
4. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol ? 2004; (30): 196-200.
5. Baumgartner C., Watts Ch., Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. 2000. *Journal of endod.* 26 (12):695-698.
6. Chueh L-H., Huang GTJ, Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *Journal of endod.* 2006; (32) 1205-13.
7. Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T. Cytotoxic Effects and Antibacterial Efficacy of a 3-Antibiotic Combination: An In Vitro Study. *Journal of Endod.* 2013; 39 (6):813- 819.
8. Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and *slime* factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2009;40(2):254-26163.
9. Del Carpio-Perochena A., Kishen A., Felitti R., Bhagirath A., Medapati M., Lai C., Cunha R. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *Journal of Endod.* 2017; 43(8):1332-1336.
10. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB & Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics.* 2013; (28) 2-13.

11. Diogenes A, Hargreaves K M. Microbial modulation of stem cells and future directions in regenerative endodontics. *Journal of endod.* 2017. 43 (9S): S96-S101.
12. Diogenes A, Ruparel N, Texeira F, Hargreaves K. Translational science in disinfection for regenerative endodontics 2014 *Journal of Endod*; 40(4S): S52-S57.
13. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterswijk C, de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng: Part B Rev.* 2012; 18 (2): 101-115.
14. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res* 2012; (56):151–165.
15. Fabricius L, Dahlen G, Holm S, Möller A. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. 1982 *Scand J Dent Rest*: (90) 200-206.
16. Fernandes R., Souza P., Batista M., Milanda M., Bombarda F., Ricci R., Hungaro M. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech.* 2018;1–7.
17. Fouad A, Verma P. Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *Journal of endod.* 2014; 40(4S) S58- S64.
18. Fouad A. Microbial factors and antimicrobial strategies in dental pulp regeneration. *Journal of endod.* 2017; 43 (9S): S46-S50.
19. Fouad A. Pulp regeneration in previously infected root canal space 2013 (28): 24-37.
20. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey GP, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (25): 13625-13630.
21. Hosseini M., Zare JM., Fesharaki M., Ostad SM. Cytotoxicity of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide against Cultured Human Dental Pulp Fibroblasts. *Journal of Dental School* 2015; 33(3): 196-204.
22. Hoshino E. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from Infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole 1996; *Int Endod Journal* (29): 125-130.

23. Huang G.T. , 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. *Journal of Endod* 2008; 34(6): 645-651.
24. Huang G.T. Apexification: the beginning of its end. *International Endodontic Journal* 2009; (42): 855-866.
25. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. 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* 2010; 16 (2):605-15.
26. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. 2001; *Dental Traumatology*; (17): 185–187.
27. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures on dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* 1965; (20):340-9.
28. Labban N., Yassen GH, Windsor LJ., Platt JA. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dental Traumatol.* 2014. 1-6.
29. Lana MA1, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias Lde M. Oral Microbiol Immunol. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. 2001 Apr;16(2):100-5.
30. Latham, J., Fong, H., Jewett, A., Johnson, J. D., & Paranjpe, A. (2016). Disinfection efficacy of current regenerative endodontic protocols in simulated necrotic immature permanent teeth. *Journal of Endodontics*, 42, 1218–1225.
31. Lin L, Shovlin F, Skribner J, Langeland K. Pulp biopsies from the teeth associated with periapical radiolucency. *Journal of Endod.* 1984;10 (9): 436-448.
32. Lohse M., Gulati M., Johnson A., Nobile C. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms . *Microbiology.* 2018. 16: 19-31.
33. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod Journal* 2001; (34):399-405.

34. Lovelace T, Henry M, Hargreaves K, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod* 2011; 37 (2):133–138.
35. Mari-Beffa M, Segura-Egea J, Díaz-Cuenca A. Regenerative endodontic procedures: a perspective from stem cell niche biology. *Journal of Endod*. 2017; 43 (1) 52-62.
36. Martin D. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. *Journal of endod*. 2014; 40 (1):51-55.
37. Mergoni G., Percudani D., Lodi G., Bertani P., Manfredi M. Prevalence of Candida Species in endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of endod*. 2018; 44 (11): 1616-1625.
38. Montelongo-Jauregui, Srinivasan, Ramasubramanian, Lopez-Ribot. An In Vitro Model for Oral Mixed Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in Synthetic Saliva. *Front Microbiol*. 2016 12;(7):686.
39. Murray P, Garcia-Godoy F, Hargreaves K. Regenerative Endodontics: A review of current status and a call for action. *Journal of Endod*. 2007; (33) 4: 377- 390.
40. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005; (31): 711– 8.
41. Nakashima M, Iohara K, Murakami M. Dental pulp stem cells and regeneration. *Endodontic Topics* 2013; (28): 38-50.
42. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scan J Dent Rest*. 1971; (79) 333-349.
43. Persoon I.F., Crielaard W., Özok A.R. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *International endod Journal*. 2017. 50: 1055-1066.
44. Rafter M. Apexification: A review 2005 *Endod Dental Traumatol*;(21): 1-8.
45. Ring K.C., Murray P E, Namerow K. N, Kuttler S, García Godoy F. *Journal of endod*. 2008; 34 (8): 1474-1479.

46. Ruparel N, Teixeira F, Ferraz C, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endod.* 2012; 38 (10): 1372-1375.
47. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *Journal of Endod.* 2013; 39 (3): 357-363.
48. Sato I. Sterilization of infected root canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod Journal*; 1996 (29) 118-124.
49. Scott M.B. Zilinski G.B. Kirkpatrick T.C. Himel V t. Sabey K.A. Thomas E.L. The effects of irrigants on the survival of human stem cells on the apical papilla, including Endocyn. *Journal of Endod.* 2018; 44 (2): 1-6.
50. Shabahang S. Torabinejad M. A comparative study of root-end induction using osteogenic Protein-1 , calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endod* 1999; 25 (1): 1-5.
51. Shaik J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste and calcium hydroxide using chitosan as carrier against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of conservative dentistry* . 2014;14 (4) 335-339.
52. Siqueira JF Jr , Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):632-41.
53. Siqueira Jr J F, Rocas, I N Lopes H P, Elias C N, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *Journal of Endod.* 2002; 28 (11): 770-773.
54. Siqueira Jr J. Rôças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics* 2014;(30): 3-22.
55. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A. Exploiting the bioactive properties of the dentin-pulp complex in Regenerative Endodontics. *Journal of Endod.* 2016; 42 (1): 47-56.
56. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wan S, Shi S, Huang GTJ. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. *Journal of Endod.* 2008; 34 (2): 166- 171.

57. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endodontic topics* 2003; (3): 6-28.
58. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1994; (78): 522-530.
59. Sundqvist G.. Ecology of the root canal flora. *Journal of Endod.* 1992; (18)9: 427-430.
60. Trevino E.G, Patwaradhan A.N, Henry M.A, Perry G, Hargreaves N.D, Hargreaves K.M, Diogenes A. *Journal of endod.* 2011; 37 (8): 1109-1115.
61. Trope M. Treatment of immature teeth with non-vital pulps and apical periodontitis. *Endod Topics* 2006 (14) 51-59.
62. Waltimo TM, Sirén EK, Toriko HL, Olsen I, Haapasalo MP Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;(30) 96-101.
63. Wilson C.E. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod Journal* 2015; (48): 210-219.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

**C.D.E.E. Briseida Guadalupe Rojas Huerta**

Candidato para el Grado de  
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

**Tesis:** Citotoxicidad de una solución doble antibiótica modificada con antifúngico sobre células madre de papila apical *in vitro*.

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud

**Datos Personales:** Nacida en Matehuala, San Luis Potosí el 13 de febrero de 1978. Hija del Maestro Wilfrido Rojas Moreno y la Profesora Asenath Huerta Hernández.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Tlaxcala en el 2000 obteniendo el grado de Cirujano Dentista. Egresada del Posgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Tlaxcala en el año 2004 con mención honorífica, obteniendo el grado de Especialista en Endodoncia. Maestría en Docencia e Investigación en la Universidad Popular Autónoma de Puebla 2014.

**Experiencia Profesional:** Profesora y fundadora de la Maestría en Estomatología terminal en Endodoncia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla desde el 2013 a la fecha. Maestría en Docencia e Investigación en la Universidad Popular Autónoma de Puebla.