

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE ENDOSEQUENCE RRM SOBRE CÉLULAS  
MADRE DE PULPA DENTAL IN VITRO**

Por

**MARIANA LIZETH ELIZONDO ALVARADO**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia.**

Septiembre, 2022

**Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia.**

POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE ENDOSEQUENCE RRM SOBRE CÉLULAS  
MADRE DE PULPA DENTAL IN VITRO

**MARIANA LIZETH ELIZONDO ALVARADO**

**Comité de Tesis**

---

Presidente

JORGE JAIME FLORES TREVIÑO

---

Secretario

CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA

---

Vocal

FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ

**Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia**

POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE ENDOSEQUENCE RRM SOBRE CÉLULAS  
MADRE DE PULPA DENTAL IN VITRO

---

**TESISTA**

**MARIANA LIZETH ELIZONDO ALVARADO**

**Comité de Tesis**

---

DIRECTOR DE TESIS  
CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA

---

CODIRECTOR DE TESIS  
FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ

---

ASESOR METODOLÓGICO  
EYRA EL VYRA RÁNGEL PADILLA

---

ASESOR METODOLÓGICO  
MARCELA ALEJANDRA GLORIA GARZA

## AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios mío, por permitirme lograr este sueño, en esta profesión he encontrado paciencia, amor y muchas pero muchas ganas de seguir creciendo todos los días. Solo tú sabes lo mucho que me costó alcanzarlo.

Agradezco a mis padres, Luis Gerardo Elizondo Peña y Josefina Alvarado González quienes siempre han estado apoyándome económica y moralmente durante toda mi vida, encaminándome a cumplir mis sueños y mis anhelos día con día, dejándome saber que me aman permitiéndome seguir adelante en lo que deseo.

A mis hermanos, José Enrique y Luis Gerardo, por acompañarme en este bello viaje llamado Odontología, a quienes admiro y llamo colegas hoy y siempre.

A mi novio, Orestes Valenzuela García y a su familia en H. Caborca, quienes me han acompañado en este trayecto durante muchos años, alentándome y permitiéndome seguir adelante en lo que me propongo, dándome su mano y su abrazo todo el tiempo.

A mis amigas de Materiales Dentales, Marcela, Ariana, Sofía, Rubí, Katia, Ingrid y Lorena, que siempre estuvieron allí para alentarme y deseándome lo mejor.

A mis compañeros y hermanos de posgrado, que sin ellos, las cosas no hubieran sido tan amenas. Nunca olvidaré las risas después de cada día de atender pacientes, nuestras salidas, nuestros días de laboratorio y todo lo bueno que pasó. Los llevo en mi corazón.

A mis hermanos, Bernardo y Vanascheck, los quiero infinitamente y deseo que cumplan todos sus anhelos en profesión y vida personal. Los abrazo y le doy gracias a Dios por hacerme coincidir con ustedes siendo endodoncistas.

A mi amiga y compañera, Zenaida Carolina, quien desde antes de entrar al posgrado, ya me incitaba a prepararme para el concurso de ingreso, qué gusto haberte conocido en esta etapa

tan bonita, gracias por ser tan buena conmigo, por alentarme a ser mejor, escucharme cuando lo necesitaba y sobre todo, por permitirme compartir contigo la experiencia del Premio Nacional de Investigación. Sigue siendo siempre tú misma.

A mis maestros, quienes todo el tiempo estuvieron incitándome a ser mejor endodoncista, ayudándome con cada uno de los retos que me llegaban al posgrado, escuchando mis tragedias y anécdotas. Los quiero.

A mis compañeros pasantes, en especial a Heriberto, Esteban, Debanhi y Patricio, que siempre estuvieron al pie del cañón asistiéndome en cada uno de mis procedimientos, ayudándome, platicándome, cantando conmigo jaja, entre muchas otras cosas. Los llevo en mi corazón siempre, los quiero mucho.

Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, por siempre apoyarme, ser un buen consejero, contestar mis llamadas y mis dudas en cualquier momento, por darme su mano y su confianza. Estoy eternamente agradecida de que haya sido mi coordinador y maestro durante este camino. Gracias por mantenerme enfocada.

A la Dra. Mayra Guadalupe Martínez García, que desde hace años y durante mi estancia en Materiales Dentales, siempre me acompañó y me guió por el camino correcto para llegar hasta este momento.

Al Dr. Casiano Del Angel Mosqueda, por ser mi director de tesis e incitarme a seguir superándome en este mundo de investigación celular, por ayudarme a culminar mi proyecto de tesis y por ser guía y maestro en este camino profesional para mí.

A mi padrino, el Dr. Adrián Mauricio de la Garza Treviño, que siempre está y estuvo ahí para mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento aprobado para el proyecto de Investigación Básica SEP-CONACYT A1-S-31196.

Al programa PRODEP por el proyecto de fortalecimiento del Cuerpo Académico de Biología Celular UANL-CA-426.

Al Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS .....	4
LISTA DE FIGURAS.....	9
NOMENCLATURA.....	10
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. HIPÓTESIS .....	15
3.OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES .....	17
4.1 Regeneración	
4.2 Matriz extracelular	
4.3 Regeneración en endodoncia	
4.4 Ingeniería tisular	
4.5 Células madre	
4.6 Papel de las células madre de pulpa dental	
4.7 Biomateriales	
4.8 Silicato tricálcico	
4.9 ProRoot MTA	
4.10 Endosequence RRM	
5. MÉTODOS.....	32
5.1 Análisis de la muestra	
5.2 Aislamiento y cultivo de DPSCs	
5.3 Obtención de medios condicionados	
5.4 Diferenciación osteogénica	
5.5 Tinción de alizarina roja	
5.6 Análisis estadístico	
6. RESULTADOS .....	35
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
9. LITERATURA CITADA .....	40

RESUMEN BIOGRÁFICO .....48



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema sobre requerimientos para llevar a cabo la regeneración endodóntica.

**Figura 2.** Células madre adultas en la región oral y maxilofacial (Egusa et al., 2012).

**Figura 3.** Aislamiento y cultivo de DPSCs a 7 días.

**Figura 4.** Nódulos de mineralización y diferenciación osteogénica posterior a 21 días de exposición a cementos bioactivos Endosequence RRM y ProRoot MTA.

**NOMENCLATURA**

ARS	Alizarina roja
MSCs	Células madre mesenquimales
MEC	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DPSC	Células madre de pulpa dental
MTA	Trióxido mineral agregado
PSC	Células madre de pulpa
SHED	Células madre de dientes deciduos exfoliados humanos
PDLSC	Células madre de ligamento periodontal
SCAP	Células madre de papila apical
DFPC	Células progenitoras de los folículos dentales
BMMSC	Células madre mesenquimales de médula ósea
TSC	Células madre trofoblásticas

**TESISTA: MARIANA LIZETH ELIZONDO ALVARADO**  
**DIRECTOR DE TESIS: CASIANO DEL ÁNGEL MOSQUEDA**  
**CODIRECTOR DE TESIS: FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE ENDOSEQUENCE RRM SOBRE CÉLULAS  
MADRE DE PULPA DENTAL IN VITRO.

### **RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** La regeneración en endodoncia actualmente es una alternativa de tratamiento para los dientes inmaduros permanentes con necrosis pulpar, que, en adición a la reparación de la periodontitis apical, promueven la regeneración de las funciones fisiológicas normales de la pulpa. **OBJETIVO:** Evaluar potencial osteogénico que presenta Endosequence RRM en presencia de células madre de pulpa dental en un estudio in vitro. **METODOLOGÍA:** Las DPSCs derivadas de terceros molares inmaduros fueron aisladas y cultivadas utilizando disociación enzimática. Después de haber sido cultivadas, se expusieron durante 21 días a medio osteogénico adicionando diferentes concentraciones de medio condicionado de Endosequence RRM el cual fue obtenido mediante incubación. Finalmente se determinó la presencia de nódulos de mineralización y cuantificación del calcio extracelular mediante la tinción y tinción de alizarina roja (ARS). **RESULTADOS:** Después del tiempo de exposición al Endosequence RRM y al control ProRoot MTA en concentraciones de 1:20 y 1:40 se observó proliferación celular y una mayor formación de nódulos mineralizados de calcio con la tinción de alizarina roja en comparación con el control negativo y control positivo (medio osteogénico). **CONCLUSIONES:** El Endosequence RRM es un cemento bioactivo / biocerámico con baja toxicidad que tiene capacidad osteogénica a bajas concentraciones, siendo este una interesante alternativa para procedimientos de endodoncia regenerativa.

**Palabras clave:** Potencial osteogénico, Endosequence RRM, DPSCs, Regeneración.

**TESISTA: MARIANA LIZETH ELIZONDO ALVARADO**  
**DIRECTOR DE TESIS: CASIANO DEL ÁNGEL MOSQUEDA**  
**CODIRECTOR DE TESIS: FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Endodontic regeneration is currently an alternative treatment for permanent immature teeth with pulp necrosis, which, in addition to repairing apical periodontitis, promotes the regeneration of the normal physiological functions of the pulp.

**OBJECTIVE:** To evaluate the osteogenic potential of Endosequence RRM in the presence of dental pulp stem cells in an in vitro study. **METHODOLOGY:** DPSCs derived from immature third molars were isolated and cultured using enzymatic dissociation. After having been cultured, they were exposed for 21 days to osteogenic medium adding different concentrations of Endosequence RRM conditioned medium which was obtained by incubation. Finally, the presence of mineralization nodules and quantification of extracellular calcium was determined by staining and alizarin red staining (ARS). **RESULTS:** After the exposure time to the Endosequence RRM and the ProRoot MTA control at concentrations of 1:20 and 1:40, cell proliferation and greater formation of mineralized calcium nodules were observed with alizarin red staining compared to the negative control. and positive control (osteogenic medium). **CONCLUSIONS:** Endosequence RRM is a bioactive / bioceramic cement with low toxicity that has osteogenic capacity at low concentrations, making it an interesting alternative for regenerative endodontic procedures.

**Keywords:** Osteogenic potential, Endosequence RRM, DPSCs, Regeneration.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El término “Endodoncia regenerativa” ha tomado importancia desde sus informes iniciales con autores como Iwaya y colaboradores en el año 2001, así como de Banchs y Trope en el año 2004, (Banchs y Trope 2004) esto hace referencia al uso de células madre endógenas de un sangrado periapical inducido, así también de andamios que utilizan coágulos de sangre, plasma rico en plaquetas o fibrina rica en plaquetas (Kim et al., 2018). Este nuevo enfoque con los distintos requerimientos se ha descrito como un cambio de paradigma y se considera la primera opción de tratamiento para dientes inmaduros con necrosis pulpar dando como posibles resultados la resolución de signos y síntomas clínicos, maduración de las raíces y también, el retorno de la neurogénesis (Sanen et al., 2017). La reparación derivada de esta terminología es principalmente de los tejidos periodontales y óseos y esto ha sido mostrado histológicamente y tomando en cuenta el concepto de “ingeniería tisular” utilizando células madre, andamios y moléculas de señalización, se espera obtener una verdadera regeneración del complejo pulpo-dentinario, entonces, basándonos en estos conceptos, se podría concluir que este procedimiento debe ser considerado a realizarse en dientes permanentes inmaduros para su preservación posterior (Moussa y Aparicio, 2019). Se ha demostrado desde hace tiempo que los materiales bioactivos a base de Trióxido de Mineral Agregado (MTA) y Silicato Tricálcico tienen capacidad de bioactividad permitiendo unión y proliferación celular (Abuelniel et al., 2020). Los iones de calcio desempeñan un papel importante durante la regulación de actividades celulares y eso es importante para que las células madre se mantengan en un entorno de vitalidad, usando este tipo de materiales, la migración de células madre mesenquimatosas está influenciada por la presencia de iones de calcio y las células productoras de tejido duro se diferencian y migran hacia la superficie donde se coloca el cemento formando un sello artificial de tipo biológico (Dawood et al., 2017). Actualmente, la aparición de nuevos cementos reparativos premezclados en jeringa o en consistencia de masilla de fabrica se han desarrollado notoriamente debido a su fácil manipulación y sobre todo, ahorro en tiempo de trabajo. Endosequence RRM es un cemento reparativo de la casa comercial Brasseler USA a base de silicato tricálcico, óxido de tantalio y óxido de zirconio que promete ser de amplio espectro antimicrobiano, altamente biocompatible y osteogénico con la capacidad de inducir regeneración en dientes permanentes inmaduros (Mapara et al., 2020). ¿Tendrá potencial osteogénico el cemento Endosequence RRM? Los procedimientos

de regeneración en endodoncia son una nueva alternativa para trabajar en dientes permanentes con maduración radicular incompleta y diagnóstico de necrosis pulpar, permitiendo que la génesis del desarrollo continúe mediante el uso de una vía artificial así como también de células madre, andamios y factores de señalización. Esta técnica promueve la continuación del desarrollo radicular y el alivio de síntomas, incluyendo reparación de periodontitis apical y funciones fisiológicas normales de la pulpa. Durante este proceso, se hace uso de un cemento bioactivo sobre un coágulo de sangre. El objetivo de realizar esta investigación fue evaluar el potencial osteogénico del Endosequence RRM sobre células madre de pulpa dental. Se aislaron DPSCs de terceros molares inmaduros mediante cultivo por disociación enzimática, las células fueron expuestas durante 21 días a medio condicionado osteogénico adicionando diferentes concentraciones de Endosequence RRM (1.40, 1.20). El potencial osteogénico fue evaluado mediante la detección de depósitos de calcio con tinción de alizarina roja (ARS). Después de 21 días de exposición de las DPSCs al Endosequence RRM se observó una importante proliferación celular y la formación de nódulos de mineralización de calcio con la tinción de alizarina roja.

## **2.- HIPÓTESIS**

El cemento bioactivo Endosequence RRM tiene un efecto osteogénico sobre las DPSCs in vitro.

### **3.- OBJETIVOS**

#### 3.1.- Objetivo general

- Evaluar el potencial osteogénico de Endosequence RRM sobre células madre de pulpa dental in vitro.

#### 3.2.- Objetivos específicos

- Aislar y cultivar una población de DPSCs utilizando disociación enzimática.
- Analizar la expresión del marcador de superficie CD146 utilizando inmunocitoquímica.
- Obtener un medio condicionado del Endosequence RRM utilizando incubación.
- Evaluar la citotoxicidad del medio condicionado de Endosequence RRM utilizando el ensayo de FMCA y microscopía de fluorescencia.
- Analizar el potencial osteogénico del medio condicionado de Endosequence RRM mediante la tinción de alizarina roja.



## **4.- ANTECEDENTES**

### **4.1 Regeneración**

El objetivo ideal del tratamiento de enfermedades establecidas, incluidas la pulpitis irreversible y la periodontitis apical, es lograr la cicatrización de heridas. La curación de heridas puede resultar en reparación o regeneración. El objetivo final de la cicatrización de heridas es restaurar la arquitectura original y la función biológica del tejido u órgano lesionado. Las heridas posnatales, incluidas la pulpitis irreversible o la periodontitis apical, siempre cicatrizan mediante reparación o mediante una combinación de reparación y regeneración. Las células somáticas, como fibroblastos, macrófagos, cementoblastos y osteoblastos, en la pulpa y los tejidos periapicales tienen un potencial limitado para la regeneración después de una lesión y falta de telomerasa. La cicatrización de heridas de pulpitis irreversible y periodontitis apical requiere el reclutamiento y la diferenciación de células madre/progenitoras en células somáticas comprometidas con el tejido (Lin y Rosenberg, 2011; Bianco et al., 2008).

La formación de nuevo tejido en la cámara pulpar se puede observar después de un control adecuado de la infección y la formación de un coágulo de sangre. Sin embargo, la diferenciación de los odontoblastos verdaderos es aún más especulativa y el enfoque se limita en gran medida a los dientes inmaduros con ápices abiertos. Se puede proporcionar un enfoque más sistemático mediante la adopción de los conceptos de ingeniería de tejidos mediante el uso de matrices, células (madre) adecuadas y moléculas de señalización para dirigir eventos tisulares (Schmalz y Smith, 2014).

Los elementos clave de la regeneración del complejo dentina-pulpa son las células madre, los morfógenos y un andamiaje de matriz extracelular. Las células madre de la pulpa tienen el potencial de diferenciarse en odontoblastos en respuesta a las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (Nakashima 2005).

## **4.2 Matriz extracelular**

La matriz extracelular (MEC) forma un paisaje dinámico de proteínas estructurales y macromoléculas que define la arquitectura de los tejidos y controla activamente el comportamiento, la forma y la función de las células. La composición de la MEC puede influir directamente en la supervivencia, el desarrollo, la proliferación y las propiedades físicas de las células, como el tamaño y la forma de las células (Jeon et al., 2018). El entorno ECM dirige la forma en que las células se comunican y puede promover o restringir su migración y acceso a otras ubicaciones y entornos de señalización. Durante el desarrollo, este paisaje se ajusta para adaptarse a las diversas necesidades cambiantes de comunicación celular, motilidad y expresión génica apropiadas para el microambiente dado y la población de células progenitoras (Rozario y DeSimone, 2010; Godwin et al., 2014).

Los enfoques de medicina regenerativa basados en andamios y tejidos de matriz extracelular descelularizada (MEC) se están expandiendo rápidamente. La justificación para usar ECM como biomaterial natural es la presencia de moléculas bioactivas que impulsan la homeostasis y la regeneración de los tejidos. Además, la MEC preparada adecuadamente es biodegradable y no provoca respuestas inmunitarias adversas (Benders et al., 2013).

## **4.3 Regeneración en endodoncia**

Los dientes inmaduros corren el riesgo de necrosis pulpar, lo que resulta en un desarrollo radicular detenido y un mal pronóstico a largo plazo. Cada vez hay más pruebas de que los procedimientos de endodoncia regenerativa promueven resultados clínicos deseables (Diogenes y Ruparel, 2017).

La caries es la causa más común de enfermedad pulpo-periapical. Cuando el tejido pulpar involucrado en la caries se inflama irreversiblemente y progresa hacia la necrosis, la opción de tratamiento es la terapia del conducto radicular porque el tejido pulpar necrótico infectado o no infectado en el sistema del conducto radicular no es accesible a los mecanismos de defensa inmune innatos y adaptativos del huésped y agentes antimicrobianos. Por lo tanto, el

tejido pulpar necrótico infectado o no infectado debe eliminarse del espacio del canal mediante pulpectomía. La diferencia entre la terapia de conducto radicular no quirúrgica y la terapia de endodoncia regenerativa es que los conductos radiculares desinfectados en la primera terapia se rellenan con materiales extraños biocompatibles y los conductos radiculares en la última terapia se rellenan con el propio tejido vital del huésped (Saoud et al., 2016; Lim et al., 2021).

El objetivo de la endodoncia es salvar los dientes. Desde sus inicios, los tratamientos de endodoncia se realizan para obturar conductos radiculares desinfectados con materiales inertes como la gutapercha. Aunque los dientes pueden salvarse después de tratamientos de endodoncia exitosos, están desvitalizados y por lo tanto susceptibles a reinfecciones y fracturas (Nangia et al., 2021).

La Asociación Estadounidense de Endodoncia (AAE) ha realizado un gran esfuerzo para revitalizar los dientes permanentes inmaduros desinfectados en niños y adolescentes con diagnósticos que incluyen necrosis pulpar o periodontitis apical. La Asociación Dental Americana (ADA) en 2011 emitió varios códigos clínicos para procedimientos de endodoncia regenerativa o revascularización apical en dientes permanentes inmaduros necróticos en niños y adolescentes. Estas iniciativas de la AAE y la ADA han estimulado un gran interés en diseñar una multitud de enfoques de ingeniería de tejidos para la regeneración de la pulpa dental y la dentina (He et al., 2017).

La endodoncia regenerativa tiene como objetivo reemplazar el tejido pulpar inflamado / necrótico por tejido pulpar regenerado. La endodoncia regenerativa es una modalidad novedosa que implica el reemplazo fisiológico de las estructuras dañadas del diente como la dentina, la raíz y las células del complejo pulpa-dentina (Hameed et al., 2019; Lopes et al., 2021).

Se pueden aplicar dos estrategias hacia la regeneración de la pulpa dental: el trasplante de células y la localización celular. El primer enfoque está basado en células, lo que significa trasplantar células madre exógenas cargadas en andamios incorporados con moléculas de

señalización en el sistema de conductos radiculares para permitir la regeneración. Las células trasplantadas se recolectan del huésped (autólogas) o de otros individuos (alógenas) y pueden procesarse (separación de tejidos) o crecer en cultivos para aumentar su número. En este caso, las células madre son la clave para la regeneración de tejidos. Aproximadamente 10 años después del descubrimiento de las células madre de la pulpa dental (Gronthos et al. 2000), la regeneración de la se logró mediante el uso de células madre dentales trasplantadas exógenamente en animales pequeños y grandes (Huang et al. 2010; Iohara et al. 2011).

El tratamiento de endodoncia para dientes permanentes inmaduros con necrosis pulpar / periodontitis apical presenta una situación clínica desafiante. La base misma de la endodoncia regenerativa es el concepto de ingeniería de tejidos, que utiliza células madre, andamios y factores de crecimiento para regenerar el complejo pulpa-dentina. Estos desarrollos corroboran los intentos de preservar las raíces naturales, uno de los principales objetivos del tratamiento endodóntico (Pulyodan MK et al., 2020; Cymerman y Nosrat, 2020).

Las células madre, los factores de crecimiento y un andamio son la tríada esencial de la ingeniería de tejidos o la regeneración de tejidos. Por lo tanto, el término “endodoncia regenerativa” se introdujo en la endodoncia clínica, que también incluye revascularización / revitalización para describir el tratamiento de dientes permanentes inmaduros con pulpas necróticas (Saoud TMA et al., 2016).

El objetivo de la endodoncia regenerativa es promover la recuperación de la función pulpar normal en dientes inflamados o necróticos que daría como resultado una verdadera regeneración del complejo pulpodentinario. Recientemente, se ha logrado un rápido progreso relacionado con la regeneración pulpar mediada por ingeniería de tejidos, que combina células madre, biomateriales y factores de crecimiento. Desde el aislamiento y la caracterización exitosos de las células madre de la pulpa dental (DPSC) y otras células madre mesenquimales dentales aplicables, la investigación básica y la exploración preclínica de la regeneración funcional de la pulpa mediada por células madre a través del trasplante de células y la búsqueda de células han recibido mucha más atención (Xie et al., 2021; Lee et al., 2015).

La apexificación con hidróxido de calcio y la apexificación con agregado de trióxido mineral (MTA) son tratamientos clásicos para los dientes permanentes inmaduros necróticos. Los primeros suelen fracasar por falta de cumplimiento dado el elevado número de sesiones necesarias; el segundo tiene dificultades técnicas como la manipulación de materiales y el sobrellenado. Con ambas técnicas, el desarrollo radicular se interrumpe dejando al diente con una estructura radicular frágil, una mala relación corona-raíz, ruptura periodontal y alto riesgo de fractura, comprometiendo el pronóstico a largo plazo del diente. La nueva literatura científica ha descrito un procedimiento que permite el desarrollo radicular completo de estos dientes específicos. Este procedimiento de endodoncia regenerativa (REP) propone el uso de una combinación de antimicrobianos e irrigantes, sin instrumentación de las paredes del conducto, sangrado apical inducido para formar un coágulo de sangre y un sellado hermético en el conducto radicular para promover la cicatrización. El MTA es el material más utilizado para realizar este sellado, pero las guías actualizadas aconsejan el uso de otros cementos endodónticos bioactivos que incorporen calcio y silicato en sus composiciones (Staffoli et al., 2019; Aktemur et al., 2021).

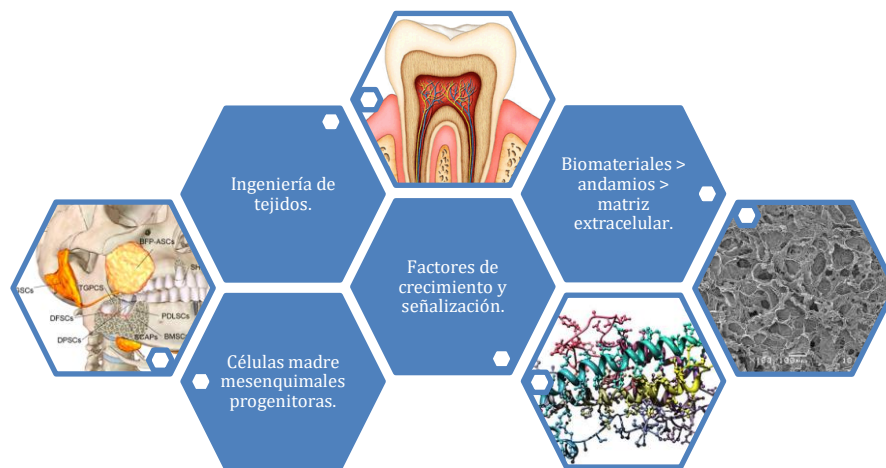


Figura 1. Esquema sobre requerimientos para llevar a cabo la regeneración endodóntica.

#### 4.4 Ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos es un término asociado con la medicina regenerativa y se distingue por su enfoque en aspectos relacionados con la ingeniería y la fabricación de tejidos de reemplazo, pero la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos a menudo se tratan como un solo campo de interés en la literatura. La ingeniería de tejidos tiene como objetivo crear tejido funcional o incluso órganos utilizando las propias células del paciente, ofreciendo un método alternativo a los injertos o trasplantes. Este enfoque se está utilizando cada vez más en la medicina de reconstrucción dental y maxilofacial, proporcionando una nueva opción para la reconstrucción de dientes, periodonto, huesos, mucosa oral, entre otros. (Rai R et al., 2015; Abou et al., 2014).

La ingeniería de tejidos se basa clásicamente en tres pilares: (a) las células (células madre / células progenitoras), responsables de sintetizar la nueva matriz de tejido; (b) los factores de señalización / crecimientos necesarios para promover y facilitar las funcionalidades; (c) los andamios de biomateriales, necesarios para la diferenciación celular, multiplicación y biosíntesis, que actúan como una matriz extracelular (MEC). Las células se comunican con su entorno utilizando diferentes componentes para regenerar tejidos mediante la combinación de células humanas con biomateriales de andamio específicos. Los andamios de biomaterial proporcionan plantillas para la regeneración de tejidos y guían a los nuevos tejidos en su crecimiento (Upadhyay RK, 2017; Zhang K et al., 2018; Widbiller et al., 2022).

La ingeniería del tejido óseo tiene como objetivo reemplazar el tejido perdido y restaurar su función recapitulando el proceso de regeneración natural. La participación concertada y la combinación de materiales biocompatibles, osteoprogenitores/células madre y factores bioactivos imitan de cerca el microambiente óseo. Los factores bioactivos regulan el comportamiento celular e inducen a las células madre a la diferenciación osteogénica activando cascadas de señalización específicas. Los factores de crecimiento (GF) son las moléculas bioactivas y mediadores más importantes del proceso natural de reparación ósea (Safari et al., 2021).

## 4.5 Células madre

Las células madre de pulpa humana (PSC) incluyen células madre de pulpa dental (DPSC) aisladas de tejidos de pulpa dental de dientes permanentes extraídos humanos y células madre de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED). Dependiendo de su multipotencia y sensibilidad a la actividad paracrina local, las DPSC y SHED ejercen aplicaciones terapéuticas en múltiples niveles más allá del alcance del sistema estomatognático. La regeneración endodóntica es donde las PSC son más prometedoras, debido a las sólidas capacidades angiogénicas, neurogénicas y odontogénicas de las PSC (Shi et al., 2020).

Las células madre son células indiferenciadas ubicadas en diferentes partes del cuerpo. El papel principal de las células madre es restaurar los tejidos lesionados. Desde el descubrimiento de las células madre, éstas ganaron gran atención debido a su capacidad de diferenciación y regeneración. La principal fuente de células madre se conocía como médula ósea. Sin embargo, se descubrieron diferentes fuentes para la obtención de células madre. Los tejidos dentales, una nueva fuente de células madre, proporcionan células que tienen características de células madre mesenquimales, como estructura similar a fibroblastos, expresión de antígenos de superficie específicos para células madre mesenquimales, capacidad de regeneración, capacidad de diferenciación multilínea y características inmunomoduladoras. Las células madre de la pulpa dental (DPSC), las células progenitoras del folículo dental (DFPC), las células madre de la papila apical (SCAP), las células madre del germen dental (TGSC) y las células madre del ligamento periodontal (PDLSC) son células madre derivadas de tejidos dentales, así como de células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED). Las células madre dentales expresan marcadores de células madre mesenquimales como Stro-1, CD146, CD106, CD90, CD73, CD29 y CD13. Las células madre dentales son capaces de experimentar diferenciación miogénica, condrogénica, adipogénica, neurogénica, osteogénica y odontogénica. Gracias a esta capacidad de diferenciación de las células madre dentales, pueden manipularse fácilmente en medicina regenerativa. Las células madre dentales, que se pueden transfectar sin esfuerzo, también se pueden utilizar en aplicaciones de terapia celular. Las características inmunomoduladoras de las células madre dentales las convierten en candidatas adecuadas para la terapia de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Las células madre dentales con un alto potencial,

como la capacidad de autorrenovación, las características de las células madre mesenquimales, la diferenciación multilínea y la inmunomodulación, son una herramienta prometedora para los estudios de diferenciación *in vitro* e *in vivo*, así como para la terapia de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario (Aydin y Şahin, 2019; Mosaddad et al., 2022).

Las células madre dentales humanas se pueden obtener de dientes posnatales, muelas del juicio extraídas o dientes deciduos exfoliados. Debido a su potencial de diferenciación, estas células madre mesenquimales son prometedoras para la reparación dental. Por lo tanto, el desarrollo de la regeneración del tejido dental representa un objetivo adecuado pero desafiante para las terapias con células madre dentales (Morsczeck C y Reichert T, 2018).

La inducción del sangrado periapical en el espacio del conducto es un paso necesario en los procedimientos de endodoncia regenerativa de dientes permanentes inmaduros con pulpas necróticas. Se sugirió que los coágulos de sangre en el espacio del conducto podrían servir como matriz o andamio para promover la cicatrización de la herida del tejido pulpar. La hemorragia periapical provocada también contiene células madre mesenquimales del área periapical al espacio del canal. La sangre contiene muchos factores de crecimiento derivados de las plaquetas. Por lo tanto, la hemorragia periapical inducida trae un andamio de fibrina, células madre mesenquimales y factores de crecimiento bioactivos derivados de la sangre al espacio del canal. Además, los factores de crecimiento incrustados en la matriz de dentina también se liberan en el espacio del conducto después de la desmineralización de la dentina con enjuague con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en procedimientos de endodoncia regenerativa. Las células madre, los factores de crecimiento y un andamio son la tríada esencial de la ingeniería de tejidos o la regeneración de tejidos. Por lo tanto, el término “endodoncia regenerativa” se introdujo en la endodoncia clínica, que también incluye revascularización / revitalización para describir el tratamiento de dientes permanentes inmaduros con pulpas necróticas (Saoud TMA et al., 2016).

Los estudios histológicos de dientes permanentes inmaduros con pulpas necróticas y periodontitis apical después de la terapia de endodoncia regenerativa revelaron que los tejidos generados en el espacio del canal eran similares al cemento, al hueso o al ligamento



periodontal (Becerra P et al., 2014). En los últimos años, las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejido dental han ganado popularidad para aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. La población altamente proliferativa y autorrenovable de células madre dentales tiene como origen la cresta neural. Esto amplía su aplicabilidad para la regeneración de tejidos tanto de origen ectoquimal como mesenquimatoso. La facilidad de recolección de tejido, el alto rendimiento inicial de células, el bajo tiempo de duplicación de la población, la plasticidad, las capacidades multipotenciales y las propiedades inmunomoduladoras los convierten en candidatos adecuados para diversas estrategias terapéuticas. Además, las células derivadas de tejido dental se pueden transformar en células madre pluripotentes inducidas para personalizar los enfoques regenerativos basados en células (Dave et al., 2018).

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado 5 células madre/progenitoras dentales humanas diferentes: células madre de la pulpa dental (DPSC), células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED), células madre del ligamento periodontal (PDLSC), células madre de la papila apical (SCAP), y células progenitoras de folículos dentales (DFPC). Estas poblaciones posnatales tienen cualidades similares a las de las células madre mesenquimales (MSC), incluida la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación multilínea. Las MSC derivadas de la médula ósea (BMMSC) son capaces de dar lugar a varios linajes de células, como células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas y neurogénicas. Las células madre derivadas de tejido dental se aíslan de tejido especializado con potentes capacidades para diferenciarse en células odontogénicas. Sin embargo, también tienen la capacidad de dar lugar a otros linajes celulares similares a los de las BMMSC, pero con una potencia diferente. (Huang et al., 2009)

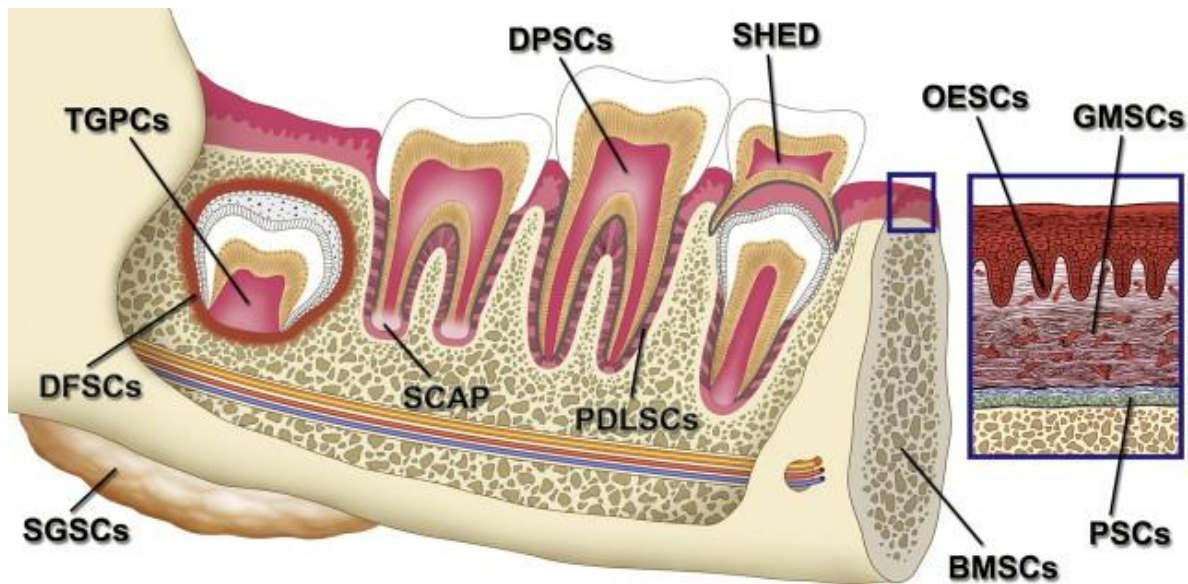


Figura 2. Células madre adultas en la región oral y maxilofacial (Egusa et al., 2012).

#### 4.6 Células madre de pulpa dental

La pulpa dental es un tejido altamente vascularizado e innervado que contiene una población heterogénea de células madre con potencial de diferenciación multilineaje. Los tratamientos de endodoncia actuales se centran en la preservación del tejido pulpar y la regeneración de la pulpa dental después de lesiones patológicas. La pulpa dental está formada por células como odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas, linfocitos, células de Schwann y células madre / progenitoras (Lambrechts et al., 2017). Al igual que las células madre mesenquimales (MSC), las células madre de la pulpa dental (DPSC) también tienen una característica de diferenciación pluripotente y pueden ser más ideales para la regeneración de tejidos, especialmente en la ingeniería de regeneración dental (Xin et al., 2020). Las células madre de la pulpa dental son una población de células madre posnatales con potencial de diferenciación multilineaje. Estas células se derivan del ectomesénquima neural, similar a la mayoría de los tejidos craneofaciales, y se han identificado nichos específicos en la pulpa (Ranganathan y Lakshminarayanan, 2012).

Las células madre mesenquimales aisladas de la pulpa dental de los dientes primarios y permanentes se pueden diferenciar en diferentes tipos de células, incluidos los osteoblastos (Hagar et al., 2021). Se ha demostrado el notable potencial regenerativo de las DPSC basado

en su diferenciación en odontoblastos, osteoblastos, adipocitos y neuronas (Arthur et al., 2008; Iohara et al., 2006; Jo YY et al., 2007). La promoción de la diferenciación odontogénica de las células madre de la pulpa dental (DPSC) es esencial para la regeneración de la dentina. El microambiente celular físico es de importancia crítica para la diferenciación de las células madre e influye en la función de otros factores biológicos/químicos para la diferenciación (Han et al., 2021).

En 2000, Gronthos y colegas informaron sobre un trabajo seminal sobre el aislamiento y la caracterización de una población heterogénea de células madre similares a las MSC del tejido de la pulpa dental de terceros molares humanos, llamándolas células madre posnatales de la pulpa dental (DPSC). (Gronthos et al., 2000)

Las células madre de la pulpa dental (DPSC) se han propuesto como una alternativa a las células madre pluripotentes para estudiar la diferenciación multilínea in vitro y para aplicaciones terapéuticas. Los medios de cultivo estándar para el aislamiento y la expansión de células madre incluyen sueros animales o componentes de matriz derivados de animales. (Ferro et al., 2014)

#### **4.7 Biomateriales.**

Los materiales biocerámicos aplicados en odontología son materiales cerámicos que se clasifican como bioinertes, bioactivos y biodegradables. Comparten una característica común de estar específicamente diseñados para cumplir su función; pueden actuar como selladores de conductos radiculares, cementos, reparación de raíces o materiales de obturación. La bioactividad solo se atribuye a aquellos materiales que son capaces de inducir una respuesta tisular deseada del huésped (Sanz et al., 2019; Huang et al., 2019).

Los materiales bioactivos se utilizan en la pulpa y otros procedimientos de endodoncia para mejorar los resultados de cicatrización, en particular para reducir la probabilidad de extracción. La pérdida de dientes se asocia negativamente con la salud, el bienestar psicológico y la ausencia de discapacidad, y es frecuente en todo el mundo. Los productos

actuales para las diversas indicaciones contienen principalmente dos compuestos cerámicos, silicato tricálcico y silicato dicálcico (Prati C y Gandolfi MG, 2015; Deb y Chana, 2015) Estos polvos cerámicos son las mismas fases que el cemento Portland comercial usado para la construcción, pero están modificados para grados médicos y uso en odontología. Las biocerámicas son compuestos cerámicos obtenidos tanto in situ como in vivo, mediante diversos procesos químicos. Las biocerámicas exhiben una excelente biocompatibilidad debido a su similitud con los materiales biológicos, como la hidroxiapatita. Las biocerámicas y la hidroxiapatita multisustituida o compuestos similares tienen la capacidad de inducir una respuesta regenerativa en el organismo. (Jitaru et al., 2016)

El papel que juegan los biomateriales en el tratamiento clínico de órganos y tejidos dañados está cambiando. Si bien se requería que los biomateriales utilizados en dispositivos médicos permanentes asumieran pasivamente la función de un tejido dañado a largo plazo, se espera que los biomateriales actuales activen y aprovechen el potencial de autorregeneración del cuerpo in situ y luego se degraden, la base de medicina regenerativa. Para cumplir con estos diferentes requisitos, es imperativo comprender completamente las interacciones que los biomateriales tienen con los sistemas biológicos, en el espacio y en el tiempo. Este conocimiento conducirá a una mejor comprensión de las capacidades regenerativas de los biomateriales ayudando a su diseño con funcionalidades mejoradas (por ejemplo, biocompatibilidad, bioactividad) (Othman et al., 2018)

Los biomateriales endodónticos se utilizan para terapias pulpares vitales, irrigación, medicamentos intraconducto, obturación y procedimientos regenerativos. Estos materiales ofrecen varias funciones que incluyen: actividad antimicrobiana, refuerzo mecánico, estética y efectos terapéuticos. Las terapias pulpares vitales han experimentado una mejora en los resultados clínicos con un enfoque incremental para aprovechar las fortalezas de materiales pasados como el hidróxido de calcio y los silicatos de calcio (Patel et al., 2020).

#### 4.8 Silicato tricálcico

Los cementos de silicato tricálcico (TSC) se utilizan en procedimientos de endodoncia para promover la cicatrización de heridas y la formación de tejido duro. (Ali et al., 2019)

Se han publicado más de 2500 artículos y 200 revisiones sobre los materiales dentales bioactivos de silicato tri/dicálcico. Las indicaciones se han ampliado desde su introducción en la década de 1990, desde tratamientos endodónticos restaurativos y pulpares hasta obturación y sellado endodónticos. Las cerámicas bioactivas, basadas en cementos de silicato tri/dicálcico, son ahora una parte indispensable del armamento dental contemporáneo para especialistas, incluidos endodoncistas, odontopediatras, cirujanos orales y dentistas generales. (Primus et al., 2019)

La primera referencia al uso del cemento Portland en odontología provino del Dr. Witte, un dentista del siglo XIX. Él mezcló cemento Portland con agua, ácido carbónico o creosota para colocarlo debajo de un empaste de oro. Un siglo más tarde, el cemento Portland fue revisado para uso dental por el Dr. Torabinejad y el Sr. White, quienes patentaron el uso del cemento Portland en endodoncia (Qutieshat et al., 2019).

El óxido de aluminio (alúmina) es común en el cemento Portland de calidad para la construcción debido a la concurrencia de la alúmina con los minerales de calcio y silicato, aunque la alúmina no es un componente esencial para crear un polvo de silicato tri/dicálcico hidráulico. (Gandolfi et al., 2007; Gandolfi et al., 2008)

El silicato tricálcico se utiliza como material reparador en endodoncia asociado a diferentes radiopacificadores como el óxido de circonio ( $ZrO_2$ ), el óxido de niobio ( $Nb_2O_5$ ) o el tungstato de calcio ( $CaWO_4$ ) (Camilleri et al., 2013; Gomes-Cornélio et al., 2017; Balbinot et al., 2020).

#### **4.9 ProRoot MTA**

Los componentes del ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, Oklahoma, USA) son: Silicato tricálcico 53% (C3S) y silicato dicálcico 19% (C2S), óxido de bismuto como radioopacificador ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), aluminato tricálcico 10% (C3A), tetracalcioaluminoferrito 7% (C4AF) y sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ), óxido de magnesio 2.8% (MgO), trióxido de azufre 2.9% ( $\text{SO}_3$ ), 1.0% Ignition loss y óxido de calcio libre 1.0% (CaO) (Salehimehr et al., 2017). Se mezcla con una solución acuosa viscosa de un polímero soluble en agua (Jafari y Jafari, 2017).

El ProRoot MTA gris contiene una cantidad significativa de hierro en comparación con ProRoot MTA blanco, fue modificado para reducir la decoloración a la estructura dental, se eliminó el tetracalcioaluminoferrito (C4AF) como elemento principal inducido por la decoloración del hierro (Fe) (Salehimehr et al., 2017). La composición química del cemento Portland, ProRoot MTA gris y ProRoot MTA blanco son muy similares (Song et al., 2006).

#### **4.10 Endosequence RRM**

Los materiales de reparación de endodoncia, como el agregado de trióxido mineral (MTA), se utilizan para diversos procedimientos de endodoncia. Un material alternativo al MTA con propiedades de manejo supuestamente mejoradas es el material de reparación de raíces Endosequence, que está disponible como masilla premezclada o pasta inyectable y se describe que posee actividad antibacteriana durante su reacción de fraguado debido a su pH altamente alcalino (Lovato y Sedgley, 2011).

El material de reparación radicular Endosequence RRM es una masilla biocerámica premezclada. Según su manual de instrucciones, está compuesto por silicato tricálcico, óxido de circonio, pentóxido de tantalio, silicato dicálcico, sulfato de calcio, fosfato de calcio monobásico y agentes de relleno (Mahgoub et al., 2019).

Se plantea la hipótesis de que ERRM promueve la cicatrización del tejido dental, manteniendo así la integridad y vitalidad de la pulpa después de los procedimientos de

recubrimiento pulpar (Machado et al., 2016). ERRM aumentó significativamente la expresión de fosfatasa alcalina (Alp) y sialoproteína ósea (Bsp) en comparación con MTA (Rifaey et al., 2016).

## **5. MÉTODOS**

### **Universo de estudio**

Humano jóvenes (14-18 años), sanos, sin distinción de género.

### **Criterios de inclusión**

Terceros molares inmaduros (con ápice abierto).

### **Criterios de exclusión**

Terceros molares con caries.

### **5.1 Análisis de la muestra**

Las muestras de pulpa dental se obtuvieron de dos terceros molares mandibulares inmaduros humanos extraídos con fines ortodónticos de un paciente sano de 18 años sin antecedentes médicos de importancia. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y se realizó de acuerdo con los estándares éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964. Se obtuvo el consentimiento informado del paciente.

Las células madre de la pulpa dental se aislaron de dos terceros molares mandibulares inmaduros de un paciente sano de 18 años sin antecedentes médicos de importancia. Los dientes se enjuagaron y se almacenaron en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) inmediatamente después de la extracción. Un tejido blando de superficie lisa se observó en el ápice de los dientes inmaduros extraídos, y con un par de alicates, este tejido (pulpa dental) se desprendió fácilmente de la porción cameral que exponía el tejido de la pulpa en el espacio del canal. Las células madre fueron aisladas de la pulpa del diente mediante digestión enzimática con colagenasa tipo I (2 mg / ml) y sumergida en la suspensión mediana de Eagle modificada por Dulbecco.



## **5.2 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de pulpa dental DPSCs**

Las células madre fueron aisladas de la pulpa del diente mediante digestión enzimática con colagenasa tipo I (2 mg / ml) (Worthington Biomedical, Lakewood, NJ, EE. UU.) a 37°C durante 1 hora y sumergida en la suspensión mediana de Eagle modificada por Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.). La suspensión celular se centrifugó a 30rpm durante 10 minutos, se lavó y luego se filtró a través de un filtro de nailon de 70µm (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.). Las DPSCs se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/Ham's 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.

## **5.3 Obtención de medios condicionados**

Para obtener el medio condicionado, los cementos bioactivos ProRoot MTA y Endosequence RRM se prepararon, el ProRoot MTA al ser una presentación líquido polvo, se mezcló según las indicaciones del fabricante y el Endosequence RRM al ser premezclado presentación masilla se mantuvo de esa manera, se colocaron ambos cementos en la incubadora a 95% de humedad a 37°C durante 24 horas esperando el fraguado del material. Ya fraguados, se incubaron en 400µl en medio de crecimiento durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó medio de cultivo como control negativo, después de la incubadora las muestras fueron centrifugadas a 10,000rpm durante 5 minutos para obtener los sobrenadantes.

## **5.4 Diferenciación osteogénica**

Las DPSCs se colocaron en placas de 24 pocillos (Corning-Costar) a una densidad de 6 x 10<sup>3</sup> células por pocillo y se cultivaron en DMEM/F12 durante 24 horas. Las DPSCs se lavaron y luego se mantuvieron en diferentes medios de cultivo: DMEM/F12, medio

OsteoDiff (OD) (Mihenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany), OD + Endosequence RRM 1:40, OD + Endosequence RRM 1:20, al igual que con ProRoot MTA, OD + ProRoot MTA 1:40 y OD + ProRoot MTA 1:20. Así mismo, se añadieron pozos para la evaluación de un control positivo con células tratadas y otro de un control negativo sin tratamiento.

### **5.5 Tinción de alizarina roja**

Después de 21 días de inducción osteogénica, las células se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% durante 30min. Las células fijas se lavaron y luego se incubaron con 2% de tinción de alizarina roja (ARS) (pH 4,2) (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad con agitación suave. Después de la tinción, se lavaron 4 veces con PBS. Las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento y cultivo de DPSCs

Las células adherentes mostraron diferentes tamaños y morfologías después de 7 días en condiciones de crecimiento. También se observó una apariencia espigada alargada con núcleos ovales y centrales. Adicionalmente, varias unidades formadoras de colonias (CFUF) fueron observadas.

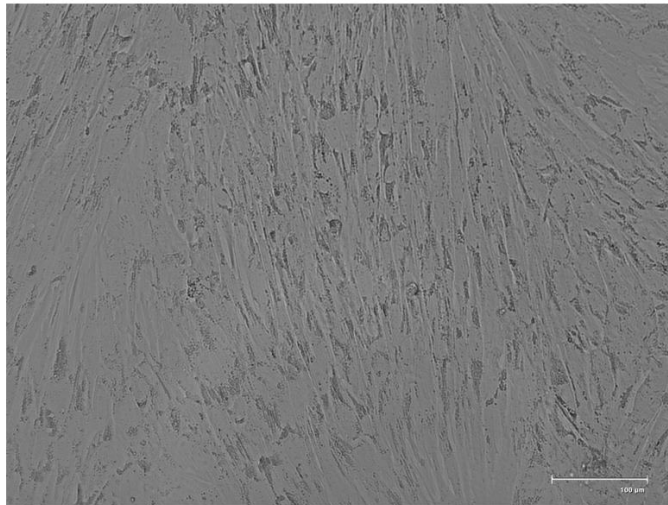


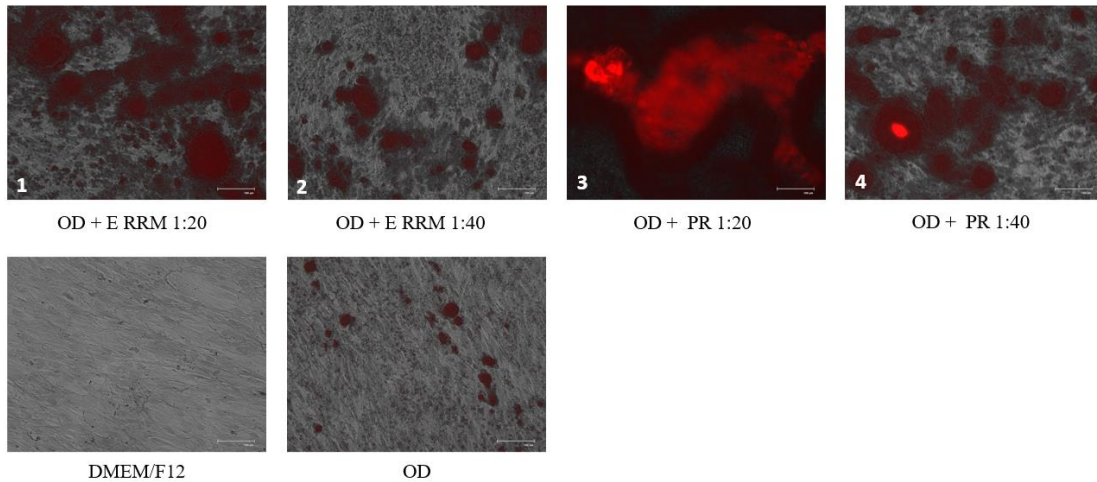
Figura 3. Aislamiento y cultivo de DPSCs a los 7 días.

### 6.2 Deposición de calcio extracelular mediante tinción de alizarina roja (ARS)

Después de 21 días bajo inducción osteogénica, se observó una confluencia celular completa en todos los tratamientos. En todos los grupos hubo actividad osteogénica de las DPSCs. Las DPSCs tratadas con OD + 1:20 de Endosequence RRM mostraron un nivel similar de ARS comparado con las DPSCs tratadas solo con OD.

OD suplementado con ProRoot MTA 1:20 indujo un claro aumento en la abundancia y el tamaño de los depósitos de calcio, además de un aumento significativo en los niveles de mineralización evaluados por ARS en comparación con los grupos control. En cuanto al

tratamiento Endosequence RRM 1:20 también obtuvo un aumento abundante en la deposición de calcio, pero no tan significativo como en ProRoot MTA.



**Figura 4.** Nódulos de mineralización y diferenciación osteogénica posterior a 21 días de exposición a cementos bioactivos Endosequence RRM y ProRoot MTA.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el potencial osteogénico sobre células madre de pulpa dental humana por su gran potencial regenerativo, proliferativo y osteogénico (Sonoyama et al., 2008) y debido al íntimo contacto de estas células con los cementos biocerámicos / bioactivos en los tratamientos regenerativos, a diferencia de otros estudios donde evaluaron la viabilidad y el efecto osteogénico con células similares a osteoblastos humanos (Gomes-Comélio et al., 2017).

En un estudio realizado en el año 2006 por Chen y colaboradores mostraron una proliferación celular significativamente mayor en superficies recubiertas con RRM/MTA (2 a 3 veces en número de células). El efecto mitógeno sobre las células madre del ligamento periodontal y las células madre de la pulpa dental fue más pronunciado con RRM que con MTA (49 % y 26 % más alto, respectivamente), pero las células madre mesenquimales de la médula ósea humana respondieron a ambos materiales de manera similar. En condiciones de privación de suero, sobrevivieron significativamente más células (2 a 3 veces) en superficies RRM/MTA (Chen et al., 2016).

Sun y colaboradores en el año 2021 evaluaron el potencial osteogénico de las hDPSC que habían estado expuestas a Endosequence RRM Putty, se examinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa para las expresiones de genes osteogénicos y la transferencia Western para las expresiones de proteínas osteogénicas. Se realizaron ensayos de actividad de fosfatasa alcalina y tinción con rojo de alizarina S para detectar cambios en la producción de la enzima intracelular y la mineralización de la matriz extracelular, respectivamente. Ellos descubrieron que estas masillas mostraban un potencial a la osteogénesis bastante similar a los biocerámicos ya existentes, sin embargo, la presentación del material facilitó la manipulación (Sun et al., 2021; Sun et al., 2021).

La investigación que realizamos toma partida aislando y cultivando células madre de pulpa dental de terceros molares inmaduros con la finalidad de proveer proliferación celular in vitro, para después, realizar la tinción de alizarina roja con Endosequence RRM y ProRoot

MTA, los cuales se sometieron a una exposición de 21 días y posteriormente, se obtuvieron resultados viables ante proliferación celular y formación de calcio mediante la tinción utilizada. Esto nos indica que tanto como Endosequence RRM y ProRoot MTA presentan un potencial osteogénico bastante viable para su utilización en procedimientos de endodoncia regenerativa.

## 8. CONCLUSIONES

- Es posible aislar y cultivar células madre de pulpa dental DPSCs derivadas de terceros molares inmaduros.
- Es posible obtener un medio condicionado derivado del cemento biocerámico / bioactivo Endosequence RRM.
- Una baja concentración de medio condicionado de Endosequence RRM 1:20 es capaz de inducir potencial osteogénico significativo mediante la formación de nódulos de mineralización.
- El Endosequence RRM de acuerdo con sus propiedades osteogénicas podría ser una alternativa interesante para procedimientos de regeneración en Endodoncia.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *J Dent*. 2014;42(8):915-28.
2. Abuelniel GM, Duggal MS, Kabel N. A comparison of MTA and Biodentine as medicaments for pulpotomy in traumatized anterior immature permanent teeth: A randomized clinical trial. *Dent Traumatol*. 2020;36(4):400-410.
3. Aktemur Türker S, Olcay K, Kaşıkçı S, Yurdağül FZ. Reinforcement effect of intra-orifice barrier materials in teeth treated with regenerative endodontic procedure: Research article. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021;15(2):111-114.
4. Ali MRW, Mustafa M, Bårdsen A, Bletsa A. Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells. *Eur J Oral Sci*. 2019;127(3):261-268.
5. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008;26(7):1787-95.
6. Aydın S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1144:123-132.
7. Balbinot GS, Leitune VCB, Nunes JS, Visioli F, Collares FM. Synthesis of sol-gel derived calcium silicate particles and development of a bioactive endodontic cement. *Dent Mater*. 2020;36(1):135-144.
8. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200.
9. Becerra P., Ricucci D., Loghin S., Gibbs J.L., Lin L.M. Histological study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J. Endod*. 2014;40:133–139.
10. Benders KE, van Weeren PR, Badylak SF, Saris DB, Dhert WJ, Malda J. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol*. 2013;31(3):169-76.
11. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.



12. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013;29(5):580-93.
13. Chen I, Salhab I, Setzer FC, Kim S, Nah HD. A New Calcium Silicate-based Bioceramic Material Promotes Human Osteo- and Odontogenic Stem Cell Proliferation and Survival via the Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling Pathway. *J Endod.* 2016;42(3):480-6.
14. Cymerman JJ, Nosrat A. Regenerative Endodontic Treatment as a Biologically Based Approach for Non-Surgical Retreatment of Immature Teeth. *J Endod.* 2020;46(1):44-50.
15. Dave JR, Tomar GB. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Crit Rev Biomed Eng.* 2018;46(5):429-468.
16. Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent.* 2017;8(2).
17. Deb S, Chana S. Biomaterials in Relation to Dentistry. *Front Oral Biol.* 2015;17:1-12.
18. Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1):111-125.
19. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources. *Journal of prosthodontic research*, 2012;56(3), 151-165.
20. Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental pulp stem cell (DPSC) isolation, characterization, and differentiation. *Methods Mol Biol.* 2014;1210:91-115.
21. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A.* 2008;87(2):477-86.
22. Gandolfi MG, Sauro S, Mannocci F, Watson TF, Zanna S, Capoferri M, Prati C, Mongiorgi R. New tetrasilicate cements as retrograde filling material: an in vitro study on fluid penetration. *J Endod.* 2007;33(6):742-5.

23. Godwin J, Kuraitis D, Rosenthal N. Extracellular matrix considerations for scar-free repair and regeneration: insights from regenerative diversity among vertebrates. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;56:47-55.
24. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2017;50(1):39-47.
25. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(25):13625-13630.
26. Hagar MN, Yazid F, Luchman NA, Ariffin SHZ, Wahab RMA. Comparative evaluation of osteogenic differentiation potential of stem cells derived from dental pulp and exfoliated deciduous teeth cultured over granular hydroxyapatite based scaffold. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):263.
27. Hameed MH, Gul M, Ghafoor R, Badar SB. Management of immature necrotic permanent teeth with regenerative endodontic procedures - a review of literature. *J Pak Med Assoc.* 2019;69(10):1514-1520.
28. Han X, Tang S, Wang L, Xu X, Yan R, Yan S, Guo Z, Hu K, Yu T, Li M, Li Y, Zhang F, Gu N. Multicellular Spheroids Formation on Hydrogel Enhances Osteogenic/Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Under Magnetic Nanoparticles Induction. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:5101-5115.
29. He L, Kim SG, Gong Q, Zhong J, Wang S, Zhou X, Ye L, Ling J, Mao JJ. Regenerative Endodontics for Adult Patients. *J Endod.* 2017;43(9S):S57-S64.
30. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.
31. 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):605-615.

32. Huang TH, Kao CT, Shen YF, Lin YT, Liu YT, Yen SY, Ho CC. Substitutions of strontium in bioactive calcium silicate bone cements stimulate osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(6):68.
33. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(15-16):1911-1920.
34. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells.* 2006;24(11):2493-503.
35. Jafari F, Jafari S. Composition and physicochemical properties of calcium silicate based sealers: A review article. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9:e1249-e1255.
36. Jeon J, Lee MS, Yang HS. Differentiated osteoblasts derived decellularized extracellular matrix to promote osteogenic differentiation. *Biomater Res.* 2018;22:4.
37. Jitaru S, Hodisan I, Timis L, Lucian A, Bud M. The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med.* 2016;89(4):470-473.
38. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007;13(4):767-73.
39. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J.* 2018;51(12):1367-1388.
40. Lambrichts I, Driesen RB, Dillen Y, Gervois P, Ratajczak J, Vanganswinkel T, Wolfs E, Bronckaers A, Hilkens P. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. *J Endod.* 2017;43(9S):S12-S16.
41. Lee BN, Moon JW, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, Hwang YC. A review of the regenerative endodontic treatment procedure. *Restor Dent Endod.* 2015;40(3):179-87.

42. Lim GS, Wey MC, Azami NH, Noor NSM, Lau MN, Haque N, Govindasamy V, Kasim NHA. From Endodontic Therapy to Regenerative Endodontics: New Wine in Old Bottles. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(5):577-588.
43. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J*. 2011;44(10):889-906.
44. Lopes LB, Neves JA, Botelho J, Machado V, Mendes JJ. Regenerative Endodontic Procedures: An Umbrella Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(2):754.
45. Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2011;37(11):1542-6.
46. Machado J, Johnson JD, Paranjpe A. The Effects of Endosequence Root Repair Material on Differentiation of Dental Pulp Cells. *J Endod*. 2016;42(1):101-5.
47. Mahgoub N, Alqadasi B, Aldhorae K, Assiry A, Altawili ZM, Tao Hong. Comparison between iRoot BP Plus (EndoSequence Root Repair Material) and Mineral Trioxide Aggregate as Pulp-capping Agents: A Systematic Review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2019;9(6):542-552.
48. Mapara PN, Shashikiran ND, Gugawad S, Gaonkar N, Hadakar S, Taur S, Khade D. Comparative evaluation of calcium release of the apical plugs formed by mineral trioxide aggregate, Biodentine, and EndoSequence root repair material with and without 2% triple antibiotic powder: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2020;38(2):132-137.
49. Morszeck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(2):187-196.
50. Mosaddad SA, Rasoolzade B, Namanloo RA, Azarpira N, Dortaj H. Stem cells and common biomaterials in dentistry: a review study. *J Mater Sci Mater Med*. 2022;33(7):55.
51. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(1):58-75.
52. Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. *Aust Endod J*. 2005;31(3):111-3.
53. Nangia D, Saini A, Sharma S, Kumar V, Chawla A, Perumal V, Logani A. Treatment outcome of regenerative endodontic procedures in mature permanent teeth compared

- to nonsurgical endodontic treatment: A systematic review and meta-analysis. *J Conserv Dent.* 2021;24(6):530-538.
54. Othman Z, Cillero Pastor B, van Rijt S, Habibovic P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials.* 2018;167:191-204.
55. Patel E, Pradeep P, Kumar P, Choonara YE, Pillay V. Oroactive dental biomaterials and their use in endodontic therapy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(1):201-212.
56. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015;31(4):351-70.
57. Primus CM, Tay FR, Niu LN. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomater.* 2019;96:35-54.
58. Pulyodan MK, Paramel Mohan S, Valsan D, Divakar N, Moyin S, Thayyil S. Regenerative Endodontics: A Paradigm Shift in Clinical Endodontics. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(Suppl 1):S20-S26.
59. Qutieshat AS, Al-Hiyasat AS, Darmani H. Biocompatibility evaluation of Jordanian Portland cement for potential future dental application. *J Conserv Dent.* 2019;22(3):249-254.
60. Rai R, Raval R, Khandeparker RV, Chidrawar SK, Khan AA, Ganpat MS. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. *J Int Oral Health.* 2015;7(9):138-142.
61. Ranganathan K, Lakshminarayanan V. Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res.* 2012;23(4):558.
62. Rifaey HS, Villa M, Zhu Q, Wang YH, Safavi K, Chen IP. Comparison of the Osteogenic Potential of Mineral Trioxide Aggregate and Endosequence Root Repair Material in a 3-dimensional Culture System. *J Endod.* 2016;42(5):760-5.
63. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010;341(1):126-40.
64. Safari B, Aghanejad A, Roshangar L, Davaran S. Osteogenic effects of the bioactive small molecules and minerals in the scaffold-based bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;198:111462.

65. Salehimehr G, Baladi F, Allahbakhshi H. Physical and Chemical Properties of New Endodontic Restorative Material in Comparison with Pro Root MTA. *Biomed Pharmacol J* 2017;10(3).
66. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrichts I, Phillips J. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(12):3362-3372.
67. Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials (Basel).* 2019;12(7):1015.
68. Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and Repair in Endodontics-A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics. *Dent J (Basel).* 2016;27;4(1):3.
69. Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S2-5.
70. Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9(4):445-464.
71. Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(6):809-815.
72. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166–171.
73. Staffoli S, Plotino G, Nunez Torrijos BG, Grande NM, Bossù M, Gambarini G, Polimeni A. Regenerative Endodontic Procedures Using Contemporary Endodontic Materials. *Materials (Basel).* 2019;12(6):908.
74. Sun Q, Gustin JW, Tian FC, Sidow SJ, Bergeron BE, Ma JZ, Tay FR. Effects of pre-mixed hydraulic calcium silicate putties on osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *J Dent.* 2021;108:103653.

75. Sun Q, Meng M, Steed JN, Sidow SJ, Bergeron BE, Niu LN, Ma JZ, Tay FR. Manoeuvrability and biocompatibility of endodontic tricalcium silicate-based putties. *J Dent.* 2021;104:103530.
76. Upadhyay RK. Role of Biological Scaffolds, Hydro Gels and Stem Cells in Tissue Regeneration Therapy. *Adv. Tissue Eng. Regen. Med. Open Access* 2017;(2):121–135.
77. Widbiller M, Knüttel H, Meschi N, Durán-Sindreu Terol F. Effectiveness of endodontic tissue engineering in treatment of apical periodontitis: A systematic review. *Int Endod J.* 2022 Jun 14.
78. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, Chen L, Lin Z. Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8991.
79. Xin BC, Wu QS, Jin S, Luo AH, Sun DG, Wang F. Berberine Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Through Activating EGFR-MAPK-Runx2 Pathways. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1677-1685.
80. Zhang K, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X, Sun J, Wang H, Weir MD, Reynolds MA, Zhang N, Bai Y, Xu HHK. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Res.* 2018;22;6:31.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

**Mariana Lizeth Elizondo Alvarado**

Candidato para el Grado de

**Maestro en Ciencias Odontológicas en el área de Endodoncia.**

**Tesis: POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE ENDOSEQUENCE RRM SOBRE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL IN VITRO.**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 18 de diciembre de 1996, hija de Luis Gerardo Elizondo Peña y Josefina Alvarado González.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Cirujano Dentista.

Experiencia Profesional: Práctica privada en consulta.

**PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:** Asociación Mexicana de Endodoncia (AMEECE Puebla 2022), AMEAC 2021.