



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO (T.A.P.)

EFFECTO DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO EN ESFEROIDES DE
CÉLULAS MESENQUIMALES DE ENCÍA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

STEPHANIE DENISSE PASQUALLI GARCÍA

TUTORA: DRA. SILVIA MALDONADO FRÍAS

ASESOR: DR. HERIBERTO ABRAHAM VALENCIA GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS/DEDICATORIAS

Mi agradecimiento se dirige a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, por haberme otorgado la felicidad de poder concluir mi etapa universitaria, junto con el apoyo de mis padres Gabriela García Alcántara y Héctor Eduardo Pasqualli Díaz, en toda la vida me han dado todo lo posible para finalizar satisfactoriamente cada etapa tanto académica como personal, gran cantidad de mis logros se los debo a ellos, incluyendo este. Soy parte de su cosecha y nada me hace más feliz que devolverles un poco de lo mucho que me han dado.

A mi hermano Gian Carlo Pasqualli García y a mi familia, quienes fueron mis pacientes y me apoyaron brindandome su tiempo y confianza, no sería la misma cirujana dentista, sin cada uno de sus consejos y aportaciones.

Gracias a la vida y a la UNAM por ponerme académicos tan apasionados por lo que hacen, sobre todo a la Dra. Silvia Maldonado Frías, quien sin duda, me apoyó en cada etapa desde que tuve la fortuna de conocerla, no solo como profesional, si no personalmente, le guardo un cariño muy especial, le agradezco por siempre estar al pendiente de sus alumnos, por compartir sus conocimientos y dedicarnos un espacio a cada uno, en particular a este proyecto que me llena de emoción y gozo.

Un agradecimiento al Dr. Heriberto Abraham Valencia González por haber asesorado el trabajo, su tiempo, dedicación y conocimientos.

Este trabajo se realizó en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología en el laboratorio de Bioingeniería de tejidos. Agradecemos al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación. Parte de este proyecto fue financiado por CONACYT a través del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación A1S-9178.

*Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán.
Proverbios 16:3*

RESUMEN

Los tejidos de la cavidad oral presentan una dinámica activa y son el medio de contacto con una microbiota extensa. La pérdida de la homeostasis da origen a enfermedades como la periodontitis apical, caracterizada por una inflamación localizada en la zona del ápice radicular dental, la cual se produce por la contaminación de microorganismos en el sistema de conductos radiculares. Dentro de la terapéutica multidisciplinaria que se propone, está el uso del hidróxido de calcio Ca(OH)_2 mostrando grandes beneficios; sin embargo, en la clínica se muestran evidencias de extrusiones de este material durante su administración y se desconoce el efecto que el Ca(OH)_2 tiene sobre las células mesenquimales, células importantes en el proceso de regeneración de tejidos. Este trabajo propone observar la formación de esferoides de células mesenquimales de encía y el efecto del Ca(OH)_2 en la viabilidad de estos.

Se realizaron cultivos en monocapa de células mesenquimales de encía para identificar su capacidad de proliferación y viabilidad. Para determinar la concentración de células requerida para la formación de esferoides, se probaron concentraciones de 1×10^2 , 5×10^2 y 1×10^3 células/mL durante 12, 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se observó el efecto del Ca(OH)_2 sobre la capacidad clonogénica de esta línea celular utilizando 5×10^2 células/mL, realizando ensayos durante 28 días con concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL de Ca(OH)_2 y determinando el número de clonas por campo. Finalmente, para observar el efecto del Ca(OH)_2 en esferoides ya formados, los cuales se obtuvieron a partir de una concentración de 5×10^2 células/mL en suspensión durante 72 horas para ser tratados durante 24 horas con 0.125 mg/mL y se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano.

Los datos muestran que la línea celular tiene una capacidad de proliferación parecida a lo reportado en la literatura. En el caso de la formación de esferoides, la concentración de 5×10^2 células/mL a las 48 horas muestra esferoides bien formados y las mejores condiciones para realizar las pruebas

con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Los ensayos de clonogenicidad muestran una disminución importante en el tamaño y número de clonas, proporcional al incremento de la concentración de este compuesto y en el caso de esferoides ya formados, muestran una disminución significativa de la viabilidad a las 24 horas de tratamiento.

Finalmente, los resultados obtenidos indican que todas las concentraciones probadas son tóxicas para las células mesenquimales de encía, por lo que es importante limitar el uso de este compuesto en la terapia odontológica a los conductos radiculares y evitar la extrusión de este material a otros sitios anatómicos fuera del ápice radicular.

ABSTRACT

The oral cavity tissues present an active dynamic, different functions and are the main contact with an extense microbiota. The loss of homeostasis in this environment gives rise to diseases such as apical periodontitis, characterized by localized inflammation in the dental root apex zone, which is caused by contamination of microorganism in the root canal system. Within the multidisciplinary therapy that is proposed, the use of calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) as an antiseptis medicine, showing great benefits, however in the clinic, there is evidence of extrusions of this material during the administration, without knowing the effect that this has in the mesenchymal cells which are important in the tissue regeneration process. This work proposes observe the spheroids formation of gingival mesenchymal cells and identify the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ effect on the viability these spheroids.

Gingival mesenchymal adherent cell cultures were performed to observe their proliferation and viability cell. To identify the cell concentrate, for spheroids formation, 1×10^2 , 5×10^2 y 1×10^3 cells/mL were tested at 12, 24 and 48 hours. Subsequently 5×10^2 cells/mL were placed in agarose cultures for 28 days with 1, 0.5, 0.25 and 0.125 mg/mL of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and the clonogenic capacity was determined. Finally, spheroids derive of 5×10^2 cell/mL in suspension culture by 72 hours were tested with 0.125 mg/mL $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 24 hours and the viability of was identify by exclusion trypan blue.

The data shows that these cells have a proliferation capacity like to that reported in the literature. The spheroid formation is better with 5×10^2 cells/mL at 72 hours. The clonogenicity assay show a significant decrease in the size and number of clones by increase concentration of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and the spheroids formed of suspension culture and treated with 0.125 mg/mL $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 24 hours, showed a significant decrease in viability.

Finally, the results show that all concentration of Ca(OH)_2 were toxic for the gingival mesenchymal cells so it is very important use this material in the dental therapeutic exclusive in the radicular conducts and prevent the extrusion of this compound outside root apex.

Keywords; Spheroids, stem cell, calcium hydroxide, apical periodontitis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Periodonto	14
2.2. Enfermedad Periodontal	15
2.3. Clasificación de la enfermedad periodontal	19
2.4. Periodontitis Apical	19
2.4.1. Bacterias asociadas a abscesos periapicales	22
2.4.2. Tratamiento de la periodontitis apical	24
2.4.2.1. Hidróxido de Calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$	25
3. CÉLULAS TRONCALES / STEM CELLS	27
3.1. Generalidades	27
3.2. Clasificación de las células troncales	28
3.3. Células Mesenquimales de Encía	30
3.4. Células troncales en Abscesos Periapicales	31
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. HIPÓTESIS	34
7. OBJETIVOS	34
8. MATERIALES Y MÉTODOS	34
8.1. Materiales	34
8.2. Método	35
9. RESULTADOS	38
9.1. Las CME son proliferativas y viables a través del tiempo	38
9.2. Las CME forman esferoides	39
9.3. El hidróxido de calcio es tóxico para las CME	42
9.4. Viabilidad celular de las CME	43
10. DISCUSIÓN	44
11. CONCLUSIÓN	45
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática y estructura de los tejidos periodontales.	14
Figura 2. Representación esquemática de la piramide de Socransky.	17
Figura 3. Ilustración esquemática de la salud periodontal-periodontitis.	18
Figura 4. Ilustración esquemática de periodontitis apical.	20
Figura 5. Micoorganismos en abscesos apicales.	23
Figura 6. Clasificación de células mesenquimales.	30
Figura 7. Células mesenquimales del tejido oral.	31
Figura 8. Cultivo monocapa de células mesenquimales de encía (CME).	39
Figura 9. Esferoides de células mesenquimales de encía (CME).	40
Figura 10. Tamaño y número de esferoides.	41
Figura 11. Ensayo clonogénico de células mesenquimales de encía.	42
Figura 12. Ensayos de viabilidad de esferoides con Ca(OH) ₂ .	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enfermedades implantarias.	19
Tabla 2. Clasificación de las células troncales.	28

ABREVIATURAS

BM-MSC. Células Troncales Mesenquimales de la Médula Ósea.

bFGF. Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico.

CTH. Células Troncales Hematopoyéticas.

CCM. Células Troncales Mesenquimales.

CM. Células Mesenquimales.

CME. Células Mesenquimales de Encía.

DC. Células Dendríticas.

DFSC. Células Troncales de los Folículos Dentales.

DMEM/F12. Dulbelcco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12

DPSC. Células Troncales de la Pulpa Dental.

EGF. Factor de Crecimiento Epidermal

HA. Hueso Alveolar.

IL. Interleucinas.

IFN. Interferones.

LP. Ligamento Periodontal.

MEM. Minimum Essential Medium.

MHC. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

PA. Periodontitis Apical.

PC-MSC. Quiste Periapical-Células Troncales Mesenquimales.

PDLSC. Células troncales de Ligamento Periodontal.

SFB. Suero Fetal Bovino.

SCAP. Células Troncales de la Papila Apical.

SHED. Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados Humanos.

UCE. Unión Cemento Esmalte.

GLOSARIO

Biofilm. Comunidades de microorganismos que crecen agregados y rodeados por una matriz extracelular que ellos mismos producen, la cual favorece la adhesión covalente sobre superficies inertes y vivas; además, les ayuda a desarrollar alta tolerancia a las moléculas con actividad antimicrobiana.

Célula troncal. Aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas. Pueden clasificarse según su potencial de diferenciación.

Cultivo celular. Proceso mediante el que células, ya sean células procariontas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas.

Cultivo tridimensional (3D). Técnica de cultivo celular con ambiente creado artificialmente, en el cual a las células se les permite crecer o interactuar con su entorno en las tres dimensiones.

Esferoides. Modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoidal, que son objeto de cultivo *in vitro*.

Extrusión. Desplazamiento del material fuera de los tejidos.

Hidróxido de Calcio. Medicamento intraconducto utilizado en endodoncia, para la desinfección del conducto radicular, así como un factor para la resolución de la periodontitis apical, ya que estimula la remineralización de la dentina y la cicatrización de los tejidos.

In vitro. En latín significa "en vidrio", en un plato de laboratorio o tubo de ensayo; un ambiente artificial

Lesiones Endoperiodontales Son aquellas en las que coexisten una enfermedad periodontal y otra endodóntica, lo que supone que hay daño tanto en la pulpa del diente como en el tejido periodontal.

Medio de cultivo: Líquido que cubre las células en una placa de cultivo y contiene nutrientes que alimentan y favorecen la proliferación de las células. El medio de cultivo también puede incluir factores de crecimiento añadidos para producir los cambios deseados en las células

Microambiente. En el ámbito de la biología, son las células, moléculas y estructuras que rodean y sostienen a otras células y tejidos.

Periodoncia. Estudio de las estructuras de soporte del diente. No solo incluye la fisiología normal de esas estructuras, si no también las desviaciones de lo normal denominadas patología.

Periodontitis. Enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a biofilms de placa bacteriana disbióticos y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente. Se caracteriza por una inflamación que conduce a la pérdida de inserción periodontal.

Periodontitis Apical. Proceso inflamatorio que ocurre en la zona periapical.

Proliferación. Expansión del número de células por la división continua de las células individuales en dos células hijas idénticas

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de cavidad oral siguen siendo una constante en la población mundial mostrando una alta incidencia en la actualidad y la periodontitis apical es una de ellas. Esta enfermedad presenta una incidencia de casi el 50% de los casos que requieren tratamiento endodóntico. Existe una clasificación para la enfermedad periodontal y en ella se establecen las características de cada afección, existiendo una terapéutica establecida para cada una, en el caso de la periodontitis apical se indica el uso del hidróxido de calcio en el conducto radicular, sin embargo, existe un riesgo latente en la extrusión de este medicamento a tejidos circundantes del ápice radicular, generando su contacto con células mesenquimales de encía y aún se desconoce el efecto de esta sustancia en ellas.

Por otra parte, recientemente se ha mostrado un interés en el rol que desempeñan las células con características de troncalidad, por lo que las células mesenquimales han sido objeto de gran interés en las últimas décadas, debido a sus propiedades y a su potencial uso terapéutico, el cual las distingue del resto de las células. Dichas propiedades son muy apreciadas en campo de la medicina regenerativa ya que pueden devolver a los tejidos afectados, su arquitectura y funcionalidad de origen, sin embargo y a pesar de los avances científicos en los últimos años, aún quedan múltiples incógnitas acerca del comportamiento de estas bajo diversos tratamientos.

Debido a la necesidad actual de las investigaciones en biomedicina, en conjunto con la bioingeniería de tejidos, de conocer el papel que tienen las células mesenquimales en la cavidad oral. Se han utilizado cultivos celulares tridimensionales para estudiar el comportamiento celular en condiciones estructurales, más cercanas a lo que sucede en el cuerpo humano, un campo que se puede explorar es el efectos del uso de sustancias como el hidróxido de calcio y su efecto en las células mesenquimales bajo estas condiciones de cultivo.

Por lo anterior es importante determinar el papel que tiene el uso del hidróxido de calcio en células mesenquimales de tejidos circundantes como las células mesenquimales de encía y determinar el impacto que este tiene sobre estas células.

2. ANTECEDENTES

2.1 Periodonto

El periodonto (peri=alrededor, odontos=diente) es una estructura multicelular especializada que consiste en tejidos de soporte y protección del diente. Se divide en tejidos blandos, como la encía cuya principal función es proteger a los tejidos subyacentes y ligamento periodontal, y duros como son el cemento y hueso alveolar, ambos funcionan como soporte a las fibras del ligamento periodontal (**Figura 1**). Su desarrollo se produce durante la formación y el crecimiento de los dientes (1,2).

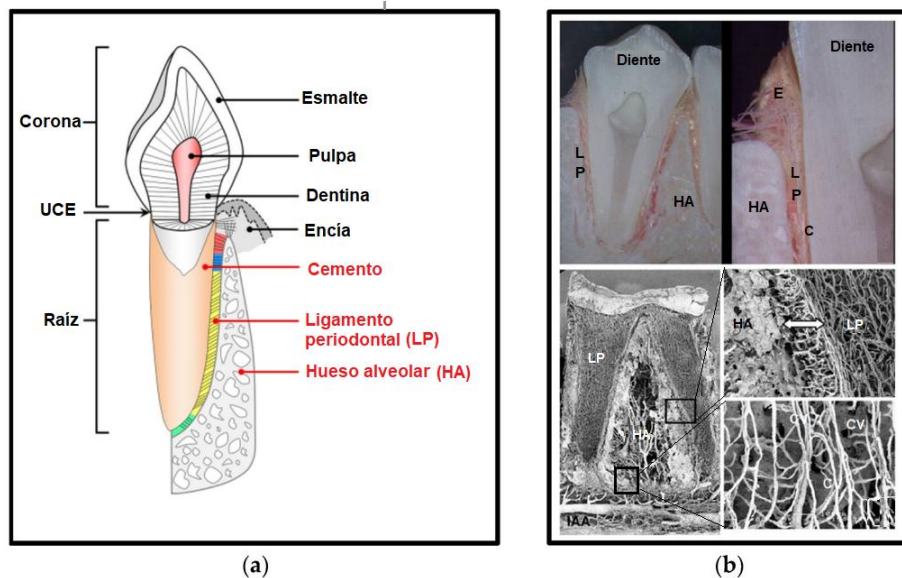


Figura 1. Ilustración esquemática y estructura de los tejidos periodontales (a) y (b). Ligamento periodontal (LP), hueso alveolar (HA), cemento (C), encía (E) unión cemento-esmalte (UCE), Arteria Alveolar inferior (IAA), Canales de Volkman's (CV). Tomado y modificado de Parker, WA et al, 2014.

Además de la defensa contra diversas invasiones microbianas orales el complejo periodontal consiste en estructuras de soporte dental relacionadas para optimizar la función fisiológica del diente y el complejo craneofacial, el complejo periodontal debe mostrar la dirección específica del haz de tejido fibroso, la integración de las fibras de colágeno entre las superficies mineralizadas y la disposición espacio- temporal de los tipos de tejido separados (3).

2.2 Enfermedad Periodontal

El termino enfermedad periodontal cubre una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas de la encía, hueso y ligamento. La gingivitis se caracteriza por la inflamación local de la encía, la cual comienza a partir de la acumulación de bacterias formando la placa dentobacteriana, si está no se elimina conforme va avanzando la gingivitis, se desarrolla la periodontitis. En la periodontitis se observa la pérdida del epitelio de unión, desinserción de fibras periodontales al cemento radicular formando una bolsa periodontal, signo característico de esta afección, siendo perdida de hueso alveolar y un evento que puede en algún punto de la enfermedad ocasionar la pérdida de dientes (4).

La periodontitis se presenta frecuente en adultos, pero también puede ocurrir en niños y adolescentes, la cantidad de daño tisular suele ser proporcional al nivel de placa, las defensas del huésped y los factores de riesgo relacionados. Por tanto, la definición de un caso de periodontitis depende en gran medida de umbrales específicos como la extensión de la enfermedad (el número de dientes afectados) y la gravedad de la enfermedad (el tamaño de la profundidad de la bolsa, la pérdida de hueso alveolar en los dientes afectados) (4).

La incidencia de esta enfermedad puede estar afectada por factores genéticos y ambientales de huésped. Los reportes indican que más del 11% de la población mundial presenta este padecimiento, lo que la convierte en una

de las enfermedades inflamatorias crónicas más prevalentes en el mundo. Además, la creciente evidencia clínica y experimental sugiere que la periodontitis puede estar asociada con diversas enfermedades sistémicas como diabetes, artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer e incluso cáncer (5, 6).

Se han establecido varios factores de riesgo, algunos de los cuales pueden modificarse (susceptibles de intervención) como el tabaquismo en la periodontitis crónica, debido a la vasoconstricción y al aumento de la queratinización del tejido gingival. Mientras que los factores no modificables que predisponen la periodontitis incluyen enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, la prevalencia y gravedad de la misma aumenta en individuos con diabetes mellitus de larga duración y/o mal controlada, ya que contribuye a una mayor carga inflamatoria y una mayor resistencia a la insulina. Entre otros tenemos las variables socioeconómicas y demográficas, estrés, enfermedades inmunosupresoras, incluso las predisposiciones genéticas (5).

El inicio y desarrollo de la periodontitis están relacionados con una variedad de causas y factores de riesgo siendo el más importante la microbiota local y la respuesta inmune del huésped. La frecuencia de especies asociadas a esta enfermedad se ha considerado tradicionalmente, una tríada de bacterias anaerobias orales (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forshytia*) como agentes causantes, en función a sus propiedades de virulencia y su fuerte asociación con los sitios enfermos. Sin embargo, las recientes investigaciones son consistentes con un nuevo modelo de patogénesis de la enfermedad, sugiriendo una microbiota más diversa involucrada en la periodontitis, es decir, la enfermedad no es el resultado de patógenos individuales, sino de la sinergia polimicrobiana y disbiosis, lo cual altera el biofilm asociado con la homeostasis del tejido periodontal. La disbiosis del microbiota periodontal se caracteriza por un desequilibrio en la abundancia

relativa o la influencia de microorganismos con funciones distintas, que se sinergizan para dar forma a una entidad patógena que puede provocar enfermedad en los tejidos orales o extraorales de individuos susceptibles (7, 8).

La cavidad bucal humana alberga una carga sustancial y en constante evolución de especies microbianas, los patógenos periodontales se clasificaron en complejos codificados por colores en función de su papel en la enfermedad periodontal (**Figura 2**) (9).



Figura 2. Representación esquemática de la pirámide de Socransky. Se muestran los complejos periodontales más representativos. Tomada de: Periodontology 2000.

Los estudios de metagenómica han demostrado que el microbioma en la enfermedad periodontal es diferente del microbioma en los tejidos sanos y contiene una alta proporción de grupos anaeróbicos obligatorios (generalmente proteolíticos). Algunos de estos grupos todavía no han sido cultivados en el laboratorio y otros no han sido identificados, aunque ocasionalmente se encuentran algunos patógenos periodontales en poca proporción en muestras de individuos periodontales sanos (8).

Un factor importante que se observa en la enfermedad periodontal es que la respuesta inmune está desregulada, ya sea porque se encuentra alterada por la comunidad microbiana o debido a defectos inmunorreguladores del huésped, dando como resultado la ineficiencia para restringir el crecimiento bacteriano y la patogenicidad, por lo que un control deficiente de la respuesta inmune del huésped producirá un ciclo de enfermedad autosostenible (10) (Figura 3).

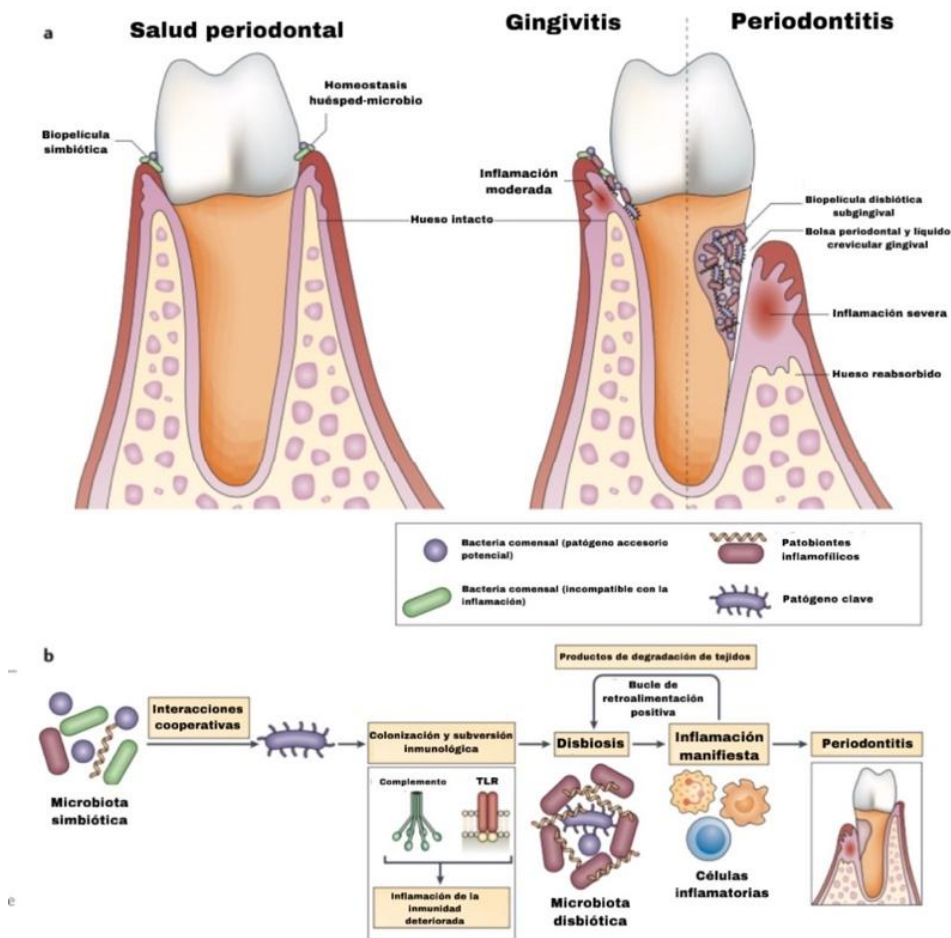


Figura 3. Desarrollo de la enfermedad periodontal. (a) Ilustración esquemática de la progresión desde la salud periodontal, gingivitis hasta la periodontitis. **(b)** Representación esquemática de sinergia polimicrobiana y disbiosis en periodontitis. Tomada y modificada de Hajishengallis G. 2015.

2.3 Clasificación de enfermedad periodontal

Existen diferentes clasificaciones que se han realizado a lo largo de las últimas décadas, con la finalidad de categorizar a las entidades clínicas que se presentan como enfermedad periodontal. La propuesta realizada en del Taller Mundial en 2017 sugiere cambios a la clasificación periodontal y propone los siguientes (**Tabla 1**):

Tabla 1. Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y peri implantarias.(11)

Enfermedades y condiciones periodontales										
Salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales Chapple, Mealey et. al. 2018 Trombelli et. al 2018			Periodontitis Papanou, Sanz et. al. 2018 Jepsen, Caton et. al. 2018 Tonetti, Greenwell, Komman et. al. 2018			Otras condiciones que afectan el periodonto Jepsen, Caton et. al. 2018 Papanou, Sanz et. al. 2018				
Salud Periodontal y Gingival	Gingivitis: Biopelícula dental inducida	Enfermedades Gingivales: Biopelícula dental no inducida	Enfermedad periodontal necrotizante	Periodontitis	Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	Enfermedades y condiciones sistémicas que afectan el tejido de soporte periodontal	Abscesos periodontales y Lesiones endo periodontales	Deformidades y condiciones mucogingivales	Fuerzas traumáticas oclusales	Factores relacionados con dientes y prótesis.
Enfermedades y condiciones peri implantarias										
Berglundh, Armitage et. al. 2018										
Salud peri implantar	Mucositis peri implantar			Peri implantitis			Deficiencias peri implantarias de tejidos blandos y duros.			

De acuerdo con esta nueva clasificación, los abscesos periodontales y lesiones endoperiodontales que antes se consideraban como periodontitis apical o lesiones periapicales están clasificadas como condiciones que afectan el periodonto (11, 12).

2.4 Periodontitis apical

La periodontitis apical (PA) es un término que se utilizaba para caracterizar el proceso inflamatorio que ocurre en la zona periapical (**Fig. 4**).

Generalmente es causado por la contaminación microbiana del sistema de conductos de la pulpa dental. Los microorganismos y sus toxinas, principalmente bacterias gram negativas anaeróbicas, pueden superar la

capacidad resolutive de los mecanismos de defensa del organismo, por lo que la lesión se desarrollará de forma crónica y provocará una respuesta inflamatoria continua. Esta respuesta inflamatoria trata de localizar la infección y proteger al hospedero de la diseminación bacteriana, dañando los tejidos periapicales (cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar) provocando lesiones osteolíticas periapicales. Incluso, los mediadores inflamatorios locales, las bacterias y sus productos pueden ingresar a la circulación sistémica desde el ligamento periodontal, causando una inflamación sistémica de bajo nivel, por lo que estas lesiones deben ser diagnosticadas, evaluadas y tratadas adecuadamente. Sabiendo entonces que la periodontitis apical es la expresión de un equilibrio deficiente entre la infección y la respuesta inmune del huésped, al reducir la carga bacteriana del conducto radicular y prevenir su reinfección puede conducir al éxito clínico, la integridad del sistema inmunológico inespecífico tiene un impacto relevante en el resultado del tratamiento endodóntico. Los sistemas inmunitarios comprometidos y/o las alteraciones genéticas de la respuesta del huésped también pueden desempeñar un papel importante en la progresión y curación de la PA (13).



Figura 4. Periodontitis apical. Ilustración esquemática de Periodontitis apical con absceso y fistula a cavidad oral. Creado en Biorender.

La aparición de signos y/o síntomas de enfermedad asociados a dientes con tratamiento de conductos significa que existe periodontitis apical, a menudo se conoce como periodontitis apical postratamiento, que se puede clasificar como emergente (si se desarrolla después del tratamiento), persistente (si persiste a pesar del tratamiento) o recurrente (si se desarrolla después de haber sanado). Los cambios patológicos en el tejido periapical de la periodontitis apical son causados por microorganismos, toxinas y subproductos metabólicos. Las radiolucencias periapicales que persisten después del tratamiento del conducto radicular a menudo sugieren un fracaso de la erradicación del problema microbiológico, incluso en dientes con tratamiento de conductos radiculares aparentemente adecuados. La infección puede localizarse dentro del sistema del conducto radicular (infección intrarradicular) pero en algunos casos puede extenderse a los tejidos perirradiculares (infección extrarradicular) (13, 14).

Los factores no microbianos también se consideran como posibles causas, como lo es la oclusión traumática, donde la inflamación es causada por una irritación continua y constante del ligamento periodontal durante la función como resultado de un contacto oclusal prematuro o una interferencia oclusal durante los movimientos laterales y/o protusivos de la mandíbula. Debido a que el trauma es una irritación a largo plazo, que provoca que ocurra un proceso de resorción ósea que no cicatriza, otras formas de trauma como lesiones por luxación o avulsión también pueden causar PA, ya que el ligamento periodontal se daña directamente, sin embargo, la evidencia es relativamente débil (15).

El tratamiento de esta afección ha sido mediante la eliminación o reducción sustancial de los agentes infecciosos del conducto radicular, y por ende la exclusión de una mayor infección del conducto a través de la obturación radicular (14, 15).

Los microorganismos que resisten los efectos del tratamiento y causan inflamación perirradicular persistente suelen localizarse en áreas de difícil

acceso a instrumentos e irrigantes, debido a la complejidad del sistema de conductos radiculares ya que se encuentran en contacto directo con una fuente de nutrientes de los tejidos perirradiculares. Estas áreas incluyen la parte apical del conducto radicular, los conductos laterales, las ramificaciones apicales, los istmos y los túbulos dentinarios (16, 17).

Actualmente, las pruebas indican que la gran mayoría de casos son causados principalmente por las bacterias que persistieron en el conducto radicular después del tratamiento inicial (infecciones persistentes). Esto se basa en los siguientes hallazgos:

- a) Muestras de biopsias de dientes con enfermedad postratamiento revelan una infección bacteriana ubicada en el tercio apical del canal, pero que no se extiende a lo largo de toda la longitud de las paredes del conducto.
- b) Cultivos positivos de muestras de conductos radiculares tomados en el momento del empaste proyectan un resultado pobre.
- c) Incidencia de la enfermedad postratamiento es mayor en dientes con periodontitis apical preoperatoria que en dientes sin lesión.

Sin embargo, el hecho de que las infecciones persistentes sean la principal causa, no excluye que las infecciones secundarias debido a la filtración coronal sean responsables del fracaso en algunos casos (15, 16).

2.4.1 Bacterias asociadas a abscesos periapicales

Los métodos de cultivo se han utilizado tradicionalmente para investigar la microbiota de los abscesos periapicales agudos. La gran mayoría de las especies bacterianas detectadas con frecuencia pertenecen a siete filos bacterianos diferentes: *Firmicutes* (*Streptococcus*, *Dialister*, *Filifactor*, and *Pseudoramibacter*), *Bacteroidetes* (*Porphyromonas*, *Prevotella*, y *Tannerella*), *Fusobacteria* (*Fusobacterium* y *Leptotrichia*), *Actinobacteria* (*Actinomyces* y *Propionibacterium*), *Spirochaetes* (*Treponema*), *Synergistetes* (*Pyramidobacter*), y *Proteobacteria* (*Campylobacter* y *Eikenella*)

Independientemente del estudio y método de identificación, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* contribuyen a más del 70% de especies encontradas en los abscesos. Mientras que *Spirochaetes* y *Synergistetes* solo son revelados por métodos moleculares independientes de cultivo. Otras bacterias que se han detectado en muestras de absceso en algunos cultivos o estudios moleculares incluyen gram negativas como *Campylobacter spp*, *Catonella morbi*, *Veillonella parvula* y *Eikenella corrodens*; y gram positivas como *Filifactor alocis*, especies de *Actinomyces* (*Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella uli*), *Mogibacterium timidum*, *Granulicatella adiacens*, especies de *Eubacterium* (*E. brachy* y *E. infirmum*), *Gemella morbillorum* y lactobacilos anaeróbios (18).

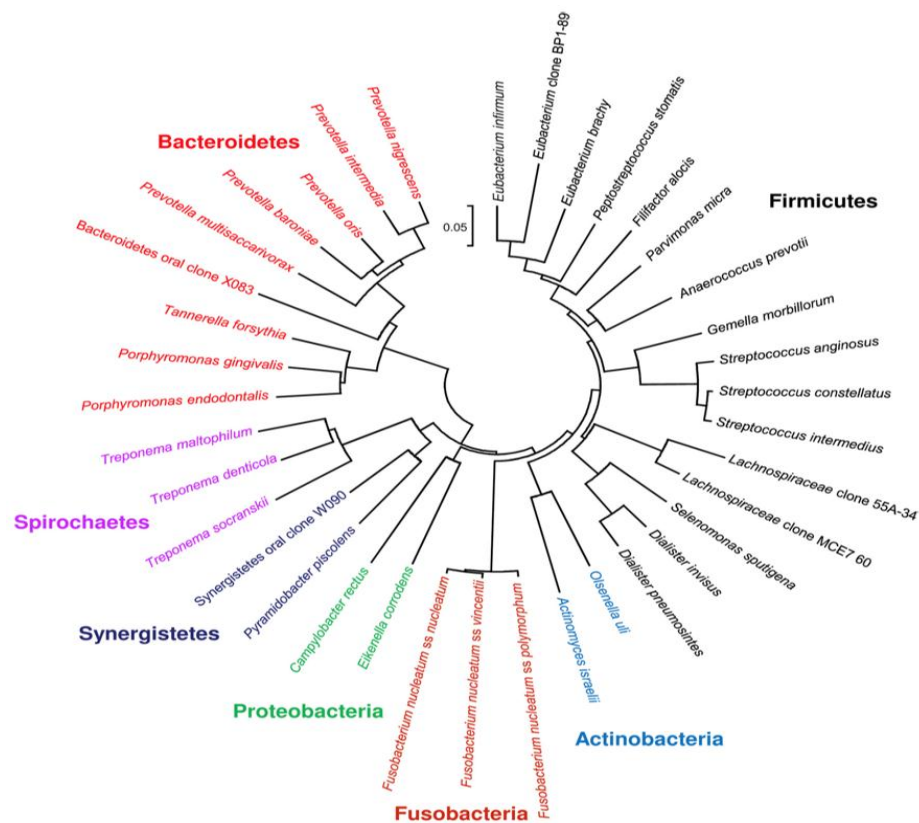


Figura 5. Microorganismos en abscesos apicales. Ilustración esquemática de las especies frecuentemente involucradas en los abscesos apicales. Tomada de: Siqueira, JF et.al. 2013.

2.4.2 Tratamiento de la periodontitis apical

El sistema de conductos radiculares consigue albergar grandes cantidades de irritantes debido a los cambios patológicos que se producen en la pulpa. La salida de estas sustancias contaminadas hacia los tejidos circundantes que generan cantidades de exudado inflamatorio, infiltración leucocitaria y en determinado momento supuración o un trayecto fistuloso hacia la cavidad oral, esto dependiendo del tiempo de evolución, puede ocasionar daños irreversibles (19).

Si bien el tratamiento es multidisciplinario, los procedimientos de antisepsia en endodoncia son de vital importancia. Numerosos son los medicamentos que se han utilizado con este fin, entre ellos el uso del hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) como medicamento intraconducto ha sido el de mayor elección. Su excelente acción bactericida se debe al aumento del pH provocado por la liberación de iones hidroxilo, además de diversas propiedades entre las que destacan:

- a) Estimulación de la calcificación, activación de los procesos reparativos por activación osteoblástica, de igual manera activa enzimas como la fosfatasa alcalina, adenosina trifosfato y la pirofosfatasa calcio dependiente que favorecen el mecanismo de reparación apical y el proceso de mineralización (20, 21).
- b) Reducción de la inflamación de los tejidos periapicales (20).
- c) Control del absceso periapical mediante una disminución del exudado persistente en la zona apical debido a sus propiedades antibacterianas, favoreciendo la reparación y la calcificación, pudiendo influir en la permeabilidad de capilares, formación de una barrera fibrosa o de un tapón apical, lo que ayuda a la evolución de la inflamación periapical (20, 21).

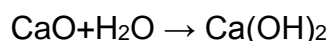
- d) Disminución de la filtración apical, lo cual mejora el pronóstico del tratamiento. Un tapón apical de $(\text{CaOH})_2$ consigue un mejor sellado formando una matriz con la gutapercha y el cemento sellador. Se ha demostrado que conductos obturados con conos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o donde es usado el mismo como cura intraconducto presentaron menos filtración apical que los obturados en forma convencional. En un estudio sobre este tema se encontró que para que las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puedan desempeñar bien sus propiedades es necesario que sean bien colocadas de forma que selle herméticamente (20, 21).
- e) Reparación hística periapical, en casos de periodontitis con osteolisis o posibles lesiones quísticas, debido al efecto de actividad antimicrobiana (pH elevado) y de inhibición de la lisis ósea mediada por las prostaglandinas (21).
- f) Prevención o control del dolor postoperatorio mediante su acción antimicrobiana y antiinflamatoria, debido a su acción higroscópica, a la formación de puentes de calcio-proteínas, la cual previene la salida de exudado desde los vasos sanguíneos hacia los ápices, y por la inhibición de la fosfolipasa con lo cual disminuye la lisis celular y consecuentemente la liberación de prostaglandinas (20, 21).

2.4.2.1 Producción de hidróxido de calcio

La piedra caliza es una roca natural compuesta principalmente de carbonato de calcio (CaCO_3). La combustión de la piedra caliza entre 900 y 1200°C provoca la siguiente reacción química:



El óxido de calcio (CaO) formado se llama 'cal viva' y tiene una fuerte capacidad corrosiva. Cuando el óxido de calcio entra en contacto con el agua, se produce la siguiente reacción:



El hidróxido de calcio es un polvo blanco inodoro con la fórmula $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y un peso molecular de 74.08. Tiene baja solubilidad en agua (alrededor de 1.2 g/L a 25°C), que disminuye a medida que aumenta la temperatura; tiene un pH alto (alrededor de 12.5 a 12.8) y es insoluble en alcohol. Esta baja solubilidad es, a su vez, una buena característica clínica porque es necesario un largo período antes de que se vuelva soluble en fluidos tisulares cuando está en contacto directo con tejidos vitales. Las principales acciones del hidróxido de calcio provienen de la disociación iónica de los iones Ca^{2+} y OH^- y la acción de estos iones sobre el tejido vital y las bacterias genera la inducción de la deposición de tejido duro y el efecto antibacteriano. Sin embargo, cuando los iones Ca^{2+} entran en contacto con el dióxido de carbono (CO_2) o los iones carbonato (CO_3^{2-}) en el tejido, se forma carbonato de calcio que altera el proceso de mineralización por el consumo total de los iones Ca^{2+} . Además, el carbonato de calcio no tiene propiedades biológicas ni antibacterianas (22).

El hidróxido de calcio es el medicamento intraconducto estándar para la desinfección del conducto radicular, así como un factor para la resolución de la periodontitis apical. Por ello las casas comerciales probaron diferentes vehículos y formulaciones para mejorar las propiedades de manejo, las acciones antibacterianas, el comportamiento físico y la radiopacidad (23).

Una de las características de los medicamentos es que no sean irritantes, que sean capaces de controlar la intensidad y duración de los procesos inflamatorios e infecciones, y tener potencial de curación. Actualmente, hay varias preparaciones comerciales disponibles, aunque las consecuencias biológicas de diferentes vehículos de mezcla no se comprenden completamente, ya que se sugiere que ciertos vehículos pueden disminuir la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio. Sin embargo, faltan estudios para comparar las actividades antimicrobianas de diferentes preparaciones de hidróxido de calcio (23).

Los medicamentos intraconducto suelen estar confinados dentro del sistema de conductos radiculares. Aunque, a través de la extrusión, el hidróxido de calcio puede invadir los tejidos periapicales algunos autores han abogado por este tipo de prácticas para mejorar el resultado de los dientes con lesiones periapicales; y por tanto, cambiar el entorno del tejido inflamado crónicamente y los revestimientos quísticos epiteliales. Se ha informado de la falta de cicatrización periapical y más complicaciones después de la extrusión de hidróxido de calcio (23, 24).

3. CÉLULAS TRONCALES / *STEM CELLS*

3.1 Generalidades

La correlación entre las células mesenquimales y los materiales de relleno es muy importante en términos de regeneración y reparación de tejidos después de la cirugía endodóntica. Por lo tanto, el material de obturación radicular ideal debe ser biocompatible con baja citotoxicidad. En condiciones clínicas, la biocompatibilidad de un material de obturación radicular debe ser aceptable para minimizar el efecto negativo del biomaterial de obturación en los tejidos periodontales circundantes en los cuales se encuentran las células mesenquimales (25).

Las células mesenquimales tienen características muy especiales que le dan su potencial regenerativo, estas pertenecen a un grupo de células denominadas células troncales o *stem cells* por su denominación en inglés.

Las células troncales son células indiferenciadas que están presentes en las etapas de la vida embrionaria, fetal y adulta, dan lugar a células diferenciadas que son componentes básicos de tejidos y órganos. En las etapas de la vida posnatal y adulta, las células troncales específicas de tejido se encuentran en órganos diferenciados y son fundamentales para la reparación después de una lesión en el órgano.

Aunque las propiedades de las células troncales pueden diferir entre los diferentes tipos de células troncales (26, 27), entre las principales características se encuentran:

- i) Autorrenovación, que es la capacidad de generar otra célula troncal con las mismas características.
- ii) Potencia o potencial de diferenciación, que es la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

3.2 Clasificación de las células troncales.

De acuerdo con las propiedades y localización, las células troncales se han clasificado en diferentes formas, una de estas se basa en el potencial de diferenciación, indicando que hay células troncales totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes (**Tabla 2**).

Existen células que tienen un potencial de diferenciación similar a las pluripotentes son las células troncales inducidas que se generan *in vitro* a partir de células somáticas adultas. Se reprograman genéticamente a un estado similar a las embrionarias adquiriendo su morfología, capacidad de proliferación, expresión de antígenos de superficie, expresión génica, estado epigenético de genes específicos de células pluripotentes y actividad de telomerasa, así como capacidad de diferenciarse en tipos de células de las 3 capas germinales (28).

Tabla 2. Clasificación de las células troncales. Clasificación basada en el potencial de diferenciación (26, 27).

CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Totipotentes	Son las células menos diferenciadas y se encuentran en el desarrollo temprano. Se diferencian en tejidos embrionarios y extraembrionarios.

Pluripotentes	Células que surgen de la masa interna del blastocisto y que originan las tres capas germinales ectodermo, endodermo y mesodermo.
Multipotentes	Células somáticas adultas que pueden autorrenovarse y formar dos o más tipos celulares de los tres linajes germinales, dentro de estas están las células troncales hematopoyéticas (CTH) y células troncales mesenquimales (MSC). Pueden formar varios linajes dentro de un tejido.
Oligopotentes	Células somáticas adultas que pueden autorrenovarse y formar dos o más tipos celulares de un linaje germinal.
Unipotentes	Pueden autorrenovarse y diferenciarse en un solo tipo celular específico y formar un único linaje.

Un tipo en particular de células troncales, son las células troncales mesenquimales (CCM) y actualmente son actores clave en la medicina regenerativa, debido a su notable potencial de diferenciación y regeneración, además de sus propiedades inmunomoduladoras, efecto paracrino y potente capacidad de localización sin preocupaciones ética. Las CCM son células multipotentes, caracterizadas por su capacidad para diferenciarse en una variedad de tipos de células tras la estimulación. Deben de expresar CD105, CD90 y CD73 y carecer de la expresión de CD11b, CD79a, CD19 y el isotipo DR del antígeno leucocitario humano (HLA-DR).

Curiosamente, las CCM muestran de manera única una baja inmunogenicidad, carecen de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-) II, expresan niveles bajos de MHC-I y no inducen a los linfocitos, lo que reduce sus posibilidades de provocar una respuesta inmunitaria tras el trasplante. Las CCM se han aislado con éxito de la mayoría de los tejidos del cuerpo, incluida la médula ósea, los tejidos dentales, los tejidos adiposos, la piel, el hígado, los

pulmones, el cordón umbilical, la sangre del cordón umbilical, la placenta y tejidos dentales (**Figura 6**).

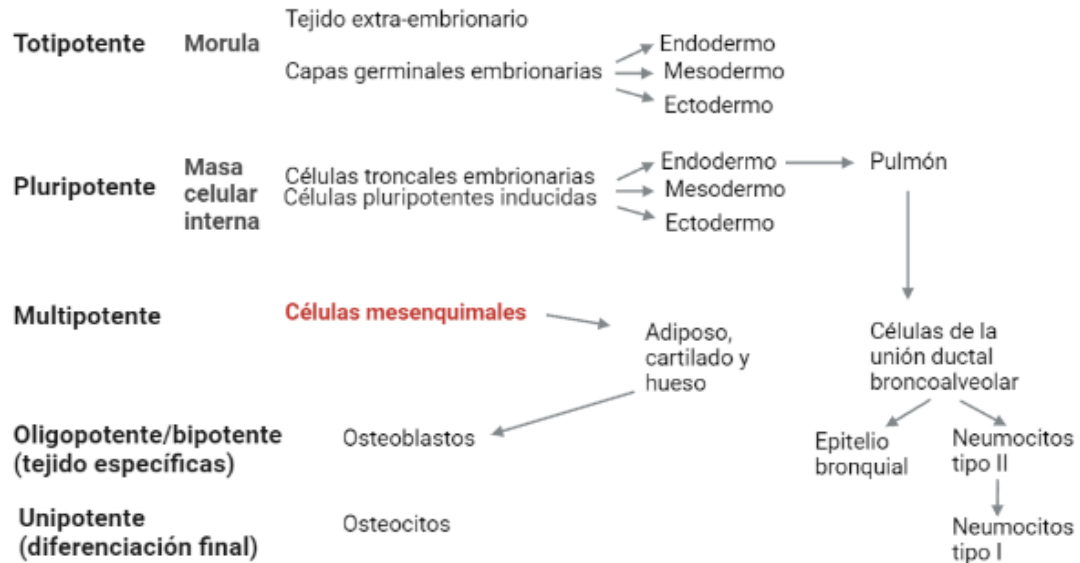


Figura 6. Clasificación de células mesenquimales. Lugar que ocupan las células mesenquimales de acuerdo con su capacidad de diferenciación. Tomado, traducido y modificado de Kolios y Moodley; 2013. Realizado en Biorender.com

3.3 Células mesenquimales de encía

La encía humana, caracterizada por sus excelentes propiedades de curación de heridas sin cicatrices, es un tejido único y un componente fundamental del aparato periodontal, que reviste y rodea los dientes en sus alvéolos en el hueso alveolar. Se han aislado y caracterizado células mesenquimales (CM) a partir de tejidos gingivales humanos (**Figura 7**), poseen capacidades de diferenciación multipotente y potentes efectos inmunomoduladores en las células inmunes tanto innatas como adaptativas. Esta inmodulación es a través de la secreción de varios tipos de factores bioactivos con inmunosupresores y funciones antiinflamatorias e incluso podrían suprimir las células mononucleares de sangre periférica y regular al

alza de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e IL-10 inducidas por interferón gama (IFN- γ). Excepcionalmente, estas células son altamente proliferativas y tienen la propensión a diferenciarse en linajes de células neurales debido al origen de la cresta neural (29, 30, 31).

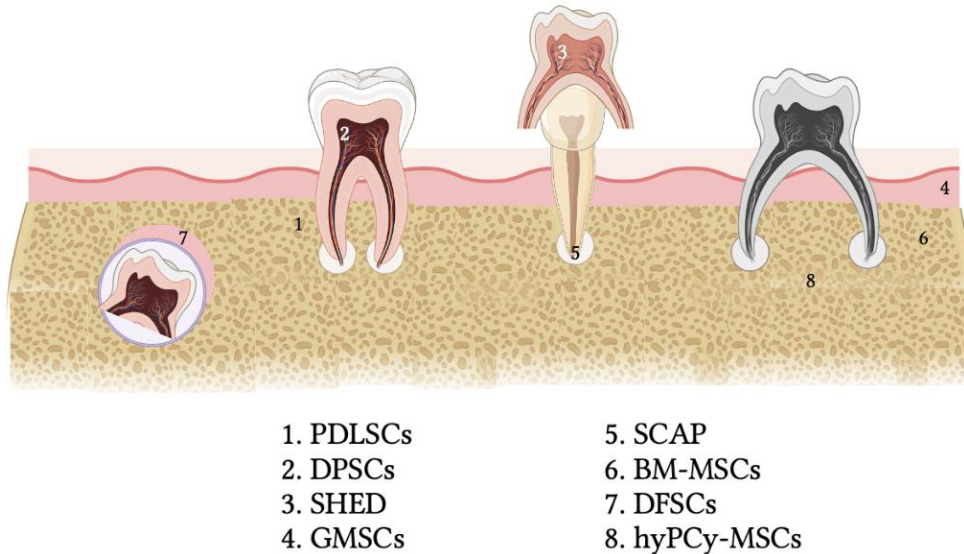


Figura 7. Células Troncales Mesenquimales del tejido oral. PDLSC: células troncales del ligamento periodontal; DPSC: células troncales de la pulpa dental; SHED: células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos; GMSC: células troncales mesenquimales gingivales; SCAP: células troncales de la papila apical; DFSC: células troncales de folículos dentales; BM- MSC: células troncales mesenquimales de la médula ósea; PCy- MSC: quiste periapical- células troncales mesenquimales. Tomada y modificada de Zhou Li-li. Et. Al. 2019.

3.4 Células troncales en abscesos periapicales

Se ha demostrado que dientes inmaduros con periodontitis perirradicular o absceso pueden ser sometidos a apexogénesis (terapia de pulpa vital que se lleva a cabo para fomentar el desarrollo fisiológico y la formación del extremo de la raíz). Varios informes clínicos han demostrado que los dientes permanentes inmaduros con pulpa no vital y periodontitis periapical o abscesos pueden sufrir apexogénesis.

Estos informes desafían el enfoque tradicional del tratamiento de estos dientes mediante la aplicación del tratamiento de apexificación. En cambio, es posible que los tratamientos alternativos de base biológica puedan promover la apexogénesis. Un aspecto común de muchos de estos casos es la presentación de la periodontitis apical preoperatoria con formación de fístulas, una condición que normalmente se asocian con necrosis de la pulpa y el total de infección que requiere apexificación (32).

La presencia de lesiones radiolúcidas en dientes inmaduros y posteriormente el proceso de apexogénesis tras el tratamiento conservador, sugieren que el tejido pulpar vital debe haber permanecido en los canales radiculares.

Cuando hay una pérdida total del tejido pulpar, pero el espacio del canal radicular permanece en estado estéril, el resultado es la penetración de tejidos promovido por la migración de células periodontales, formándose cemento, hueso y ligamento periodontal. Se ha considerado que mientras el HERS (Hertwig's Epitelial Root Sheath) sigue siendo viable, estimula las células mesenquimatosas indiferenciadas en los tejidos periapicales a diferenciarse en odontoblastos que contribuyen a la formación de dentina nueva y maduración de la raíz (32).

Múltiples investigaciones que exploran el impacto del microambiente inflamatorio en las propiedades de las células troncales mesenquimales orales abordaron su potencial de proliferación, migración y localización, diferenciación multilinaje y producción de citocinas inflamatorias. Sin embargo, los resultados siguen siendo bastante controvertidos, dependiendo de los orígenes de las células troncales mesenquimales bajo investigación, la variación y concentración de los estímulos inflamatorios y la configuración experimental. (33)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La terapia actual en el tratamiento de la periodontitis apical sigue proponiendo el uso de medicamentos que eliminen por completo los microorganismos causales del proceso infeccioso. Constantemente en la terapéutica odontológica se recomienda el uso de sustancias como el hidróxido de calcio que ha resultado un excelente material para la eliminación de microorganismos debido a su pH de alta alcalinidad.

A pesar de los grandes beneficios observados en el uso de este medicamento, la extrusión de este, fuera del ápice apical puede derivar en efectos contraproducentes modificando el microambiente celular alterando el comportamiento de las células responsables de la reparación de tejidos como son las células mesenquimales de encía.

5. JUSTIFICACIÓN

La propuesta actual en el estudio de la regeneración de tejidos es conocer el papel de las células mesenquimales que están involucradas en la reparación de los daños que provocan agentes causales como lo microorganismos. A pesar de los avances científicos con el uso de cultivos bidimensionales los datos obtenidos con el uso del Ca(OH)_2 son pocos y no son contundentes, por lo que es importante el uso de metodologías que asemejen un ambiente estructural más cercano a lo que sucede en los tejidos en condiciones naturales y por lo que el uso de cultivos tridimensionales son una excelente alternativa que nos dará mayor fidelidad del comportamiento de los tejidos, para observar el efecto de materiales como Ca(OH)_2 en células mesenquimales de encía, ya que la capacidad de regeneración de las células ubicadas en el lugar de la lesión es un factor importante así como lo es, la capacidad de los materiales para promover o inhibir este efecto, por lo que es relevante conocer este comportamiento como indicador importante para

evaluar la bioactividad de los materiales usados durante la terapia odontológica.

6. HIPÓTESIS

Si el hidróxido de calcio tiene una alta alcalinidad, entonces al estar en contacto con células mesenquimales de encía promoverá la muerte celular y su capacidad de formar estructuras arquitectónicas que promuevan la regeneración de tejidos dañados.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar el papel del hidróxido de calcio en la formación de esferoides y la viabilidad de células mesenquimales de encía.

Específicos

- Identificar las características de crecimiento de las células mesenquimales de encía en condiciones de adherencia.
- Caracterizar la formación de esferoides dependientes del tiempo y la concentración celular en células mesenquimales de encía.
- Determinar el efecto del Ca(OH)_2 en la capacidad clonogénica y la viabilidad de células mesenquimales de encía.
- Determinar el efecto del Ca(OH)_2 en la viabilidad de los esferoides.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

Línea celular. Se emplearon células mesenquimales de encía humana (CME), las cuales fueron donadas y previamente identificadas con marcadores de troncalidad y sorteadas por el Dr. Marco Álvarez Pérez (Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología).

Reactivos. *Medio Minimum Essential Medium Alpha* (MEM α , Gibco, Thermo Fisher Scientific), *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Gibco, Thermo Fisher Scientific), *Dulbecco's Modified Eagle Medium 2X* (DMEM concentración doble, Gibco, Thermo Fisher Scientific) suero fetal bovino (SFB, (Gibco, Thermo Fisher Scientific), suero Knock out (Gibco, Thermo Fisher Scientific), factor de crecimiento epidermal (EGF, Gibco, Thermo Fisher Scientific), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, Gibco, Thermo Fisher Scientific), glutamina (Gibco, Thermo Fisher Scientific), tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Thermo Fisher Scientific), Azul tripano 4% (Gibco, Thermo Fisher Scientific), solución de salina de fosfatos (PBS 1X, 0.14 M de NaCl, 0.03M KCl, 0.08M de NaH₂PO₄, 0.02M de KH₂HPO₄, pH 7.3) (JT Baker); agar noble (Gibco); hidróxido de calcio (Viarden); disolución cristal violeta (0.05% cristal violeta (Hycel, Jalisco México), 20% metanol (JT Baker)).

Materiales. Frascos de 75 cm², placas de 100 mm x 20 mm, placas de 6 pozos, adherentes y de baja adherencia, tubos cónicos de 15 mL, puntas para micropipeta (1000, 100, 10 μ L), tubos cónicos de 1.5 y 0.5 mL, pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 mL (Corning Incorporated®, Corning, NY, USA).

Equipo. Micropipetas unicanal de volumen variable (0.5-10, 0.5-2, 10-100, 100-1000 μ L, Olab), propipeta (Termofisher scientific), balanza analítica (120g-0.001g/PW124, Clay Adam), pHmetro (Hanna), agitador orbital (Termolyne), cámara de Neubauer (Boeco, Imlab); campana de flujo laminar (Biobase); incubadora de cultivo celular (New Brunswick), microscopio invertido (Carl Zeiss).

8.2 Métodos

Cultivo celular.

Monocapa; las células CME se cultivaron en los frascos 75 cm² que permiten la adhesión de las células a la superficie empleando medio MEM α , suplementado con 10% de SFB e incubandolas a 37 °C y 5% de CO₂. Los cultivos en estas condiciones se denominan cultivos en monocapa.

Esferoides. A partir de los cultivos en monocapa de CME a una confluencia del 75%, se obtuvo una suspensión de células en PBS 1X. Se colocaron diferentes cantidades de células viables por mililitro de medio en placas de 100 mm de diámetro de ultra-baja adherencia. El medio de crecimiento consistió en DMEM/F12, suplementado con 10% de reemplazo de suero, los factores de crecimiento EGF y bFGF a 20 ng/mL y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se sembraron 1X10², 5X10² y 1X10³ células/mL para determinar qué concentración favorece la eficiencia de formación de esferoides a las 12, 24, 48 y 72 horas de crecimiento. Se avaluó el tamaño y número de los esferoides formados mediante imágenes, se usó el programa *ImageJ* (NIH). Se ha demostrado que los cultivos de esferoides favorecen e incrementan la población de células que expresa marcadores de troncalidad. Los esferoides que se obtengan no rebasaran los 120 micrómetros de diámetro para asegurar que los nutrientes del medio lleguen a todas las células que los constituyen.

Viabilidad y proliferación celular. Con la finalidad de observar la viabilidad y proliferación celular, las CME se crecieron durante 1, 5, 10 y 15 días en monocapa y se obtuvieron suspensiones celulares de cada condición. Para todos los casos, las suspensiones celulares se colocaron en tubos de 15 mL y se centrifugaron 5 min a 3000 rpm cada uno por separado. Se retiró el sobrenadante y el concentrado celular se lavó en tres ocasiones con PBS 1X. El concentrado celular se suspendió en 1 mL de PBS 1X, se tomaron 20 µL y se mezclaron con 20 µL de azul de tripano en tubos de 0.5 mL para evaluar la viabilidad y el conteo de células visualizando la mezcla con ayuda de la cámara de Neubauer y el microscopio. Las células que carecen de tinción de azul de tripano tienen su membrana celular íntegra y fueron consideradas viables dentro del conteo celular. El incremento en el conteo de las células al largo de los experimentos, que cumplieron este criterio, fue considerado para determinar la proliferación celular.

Ensayo clonogénico. A través del ensayo clonogénico es posible identificar poblaciones que pueden crecer en condiciones adversas como lo es la independencia de anclaje. En este ensayo las células con un alto potencial proliferativo o clonogénico forma colonias conformadas por progenie de células individuales. Entonces para evaluar en las CME provenientes de monocapa fueron crecidas en estas condiciones en placas de 6 pozos, en cada pozo se colocó una matriz o soporte a base de agar para mantener las CME de manera individual y sin posibilidad de anclaje o adherencia ni de movilidad.

En cada pozo se colocó una capa de agar (agar base) mezclando 1 volumen de agar noble al 6% con 1 volumen de medio DMEM 2X suplementado al 10% de SFB. Una vez solidificado el agar base, se solocó una segunda capa de agar pero que ahora contenía a las células (agar semilla) mezclando 1 volumen de agar noble al 1% con 1 volumen de DMEM 2X suplementado con 10% de SFB y el volumen necesario de la suspensión de células para tener una cantidad determinada de células. Una vez solidificado el agar semilla, se adicionó el mismo volumen que tenía el agar semilla de medio de alimentación, el cual consiste en medio DMEM suplementado al 10% con SFB. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 21 días con adición de medio de alimentación cada tercer día.

Finalizado el tiempo de incubación, las colonias formadas fueron fijadas con metanol, teñidas con cristal violeta al 0.05%, se observaron al microscopio con el objetivo de 4X.

Efecto del Ca(OH)₂ en la capacidad clonogénica de CME provenientes de monocapa. Para esta evaluación se empleo el ensayo clonogénico colocando 500 células/mL en el agar semilla, exponiendo a concentraciones de 0.125, 0.25 y 1 mg/mL de Ca(OH)₂ en el medio de alimentación durante 28 días y con adición de medio de alimentación cada tercer día. Finalizado el tiempo de incubación, las colonias formadas fueron fijadas con metanol, teñidas con cristal violeta al 0.05%, se observaron al

microscopio con el objetivo de 4X y se contaron manualmente las clonas o colonias formadas en 3 campos diferentes.

Efecto del Ca(OH)_2 en las CME provenientes de esferoides. Para determinar el efecto del Ca(OH)_2 en las células de los esferoides, se sembraron 500 células/mL en placas de ultrabaja adherencia y se crecieron durante 72 horas. Estos cultivos fueron expuestos a 0.125 mg/mL de Ca(OH)_2 en su medio de crecimiento e incubadas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se obtuvo una suspensión celular en PBS 1X y se determinó la viabilidad celular por exclusión del colorante azul tripano; como control se utilizó un cultivo de esferoides que no tuvo tratamiento con Ca(OH)_2 .

Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden a la media \pm error estándar del número de observaciones (n=3). Las comparaciones estadísticas se realizaron por la prueba ANOVA seguido por el análisis de Tukey-Kramer o Fisher y también se utilizó la prueba t de Student utilizando Excel. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando los valores de p son menores a 0.05 o 0.01 y son representados por asteriscos *p<0.05 y ** p<0.01.

9. RESULTADOS

9.1 Las CME son proliferativas y viables a través del tiempo. Las CME proliferan y son viables a través del tiempo al sembrarse en condiciones adherentes en monocapa durante 15 días. Mediante el conteo celular empleando la exclusión del azul tripano, se identificó que las células aumentaron su población de manera exponencial; este conteo solo incluyó células viables. Las células que componían a la monocapa formada se observaron homogéneas, estables y viables, alcanzaron una confluencia

aproximada del 75% en un periodo promedio de 15 días tras haber colocado inicialmente una población de 1×10^3 células (**Figura 8**).

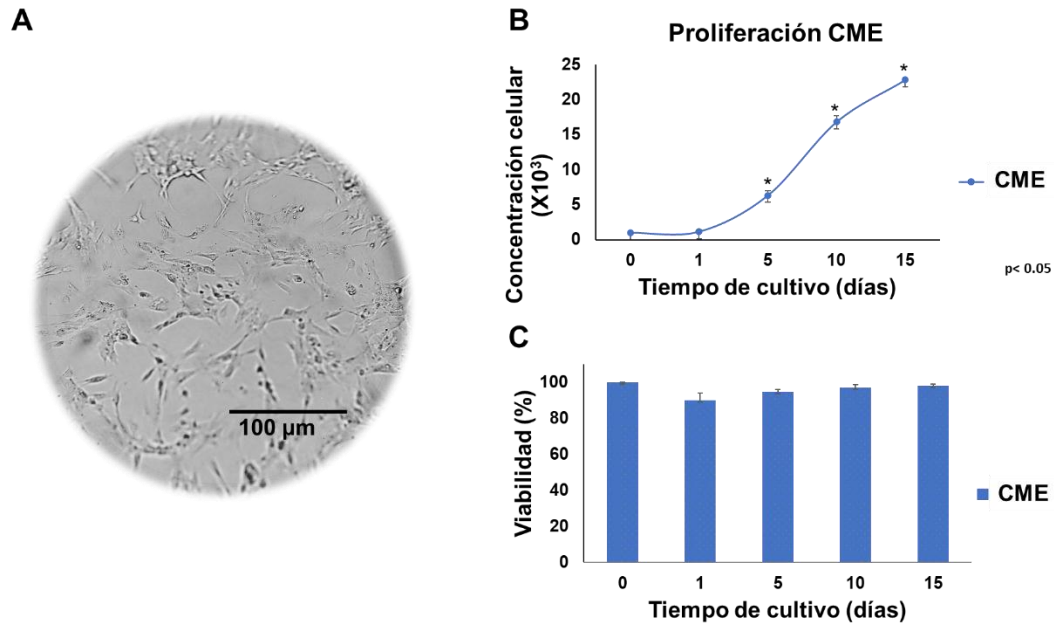


Figura 8. Cultivo monocapa de células mesenquimales de encía (CME) **A.** Fotomicrografía (25X) del cultivo en monocapa de CEM a una confluencia del 75% a los 15 días de crecimiento. **B.** Proliferación celular que muestra la fase de crecimiento durante 1, 5, 10 y 15 días de cultivo. **C.** Viabilidad celular constante en un porcentaje mayor al 90% durante el tiempo del cultivo. Los datos son presentados como la media \pm ES (n=3). *p < 0.05 y determinadas por la prueba de ANOVA y con post hoc de Tukey.

9.2 Las CME forman esferoides. Tras probar las concentraciones de 1×10^2 , 5×10^2 y 1×10^3 células/mL de CME crecidas en suspensión, todas las concentraciones formaron esferoides a partir de las 12 y hasta las 72 horas de crecimiento. A partir de las 48 horas se observaron estructuras esferoidales homogéneas en las tres concentraciones de células (**Figura 9**).

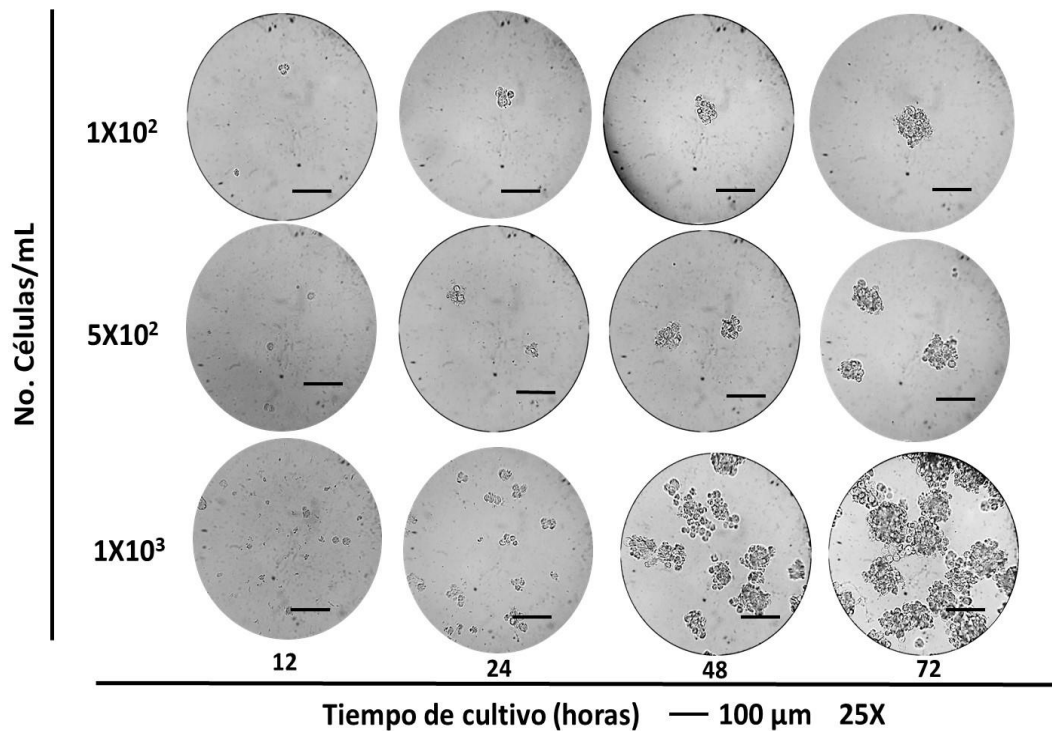


Figura 9. Esferoides de células mesenquimales de encía (CME) Fotomicrografía (25X) de la formación de esferoides de CME a diferentes concentraciones celulares durante 12, 24, 48 y 72 horas de cultivo en suspensión. Cada imagen representa experimentos individuales por triplicado ($n=3$).

El resultado del análisis de las mediciones de los esferoides a partir de las 48 horas mostró que a concentraciones de 1×10^2 y 5×10^2 células/mL presentan mayor homogeneidad en el tamaño. Las condiciones de cultivo con concentración de 1×10^3 células/mL muestran esferoides de tamaños irregulares, incluso se observaron estructuras que rebasaron los 100 µm, esto puede deberse a la coagregación celular. Para los esferoides obtenidos a las 72 horas de crecimiento, en las tres concentraciones celulares se observaron esferoides con diámetros mayores a 110 µm, comprobando que el porcentaje de proliferación observada en los cultivos en monocapa desde el día 1 al día 5 es congruente con el crecimiento de estos esferoides a las 72 horas.

Respecto a la eficiencia en el número de esferoides de estos cultivos, si bien se obtienen un número mayor de esferas con una concentración de 1×10^3 células/mL, estas son irregulares y se observa agregación celular. Estos

datos indican que el número de células es determinante para observar la formación de esferoides homogéneos y que para esta línea celular la concentración de 5×10^2 células/mL son las indicadas para la formación de esferoides por crecimiento clonal (**Figura 10**).

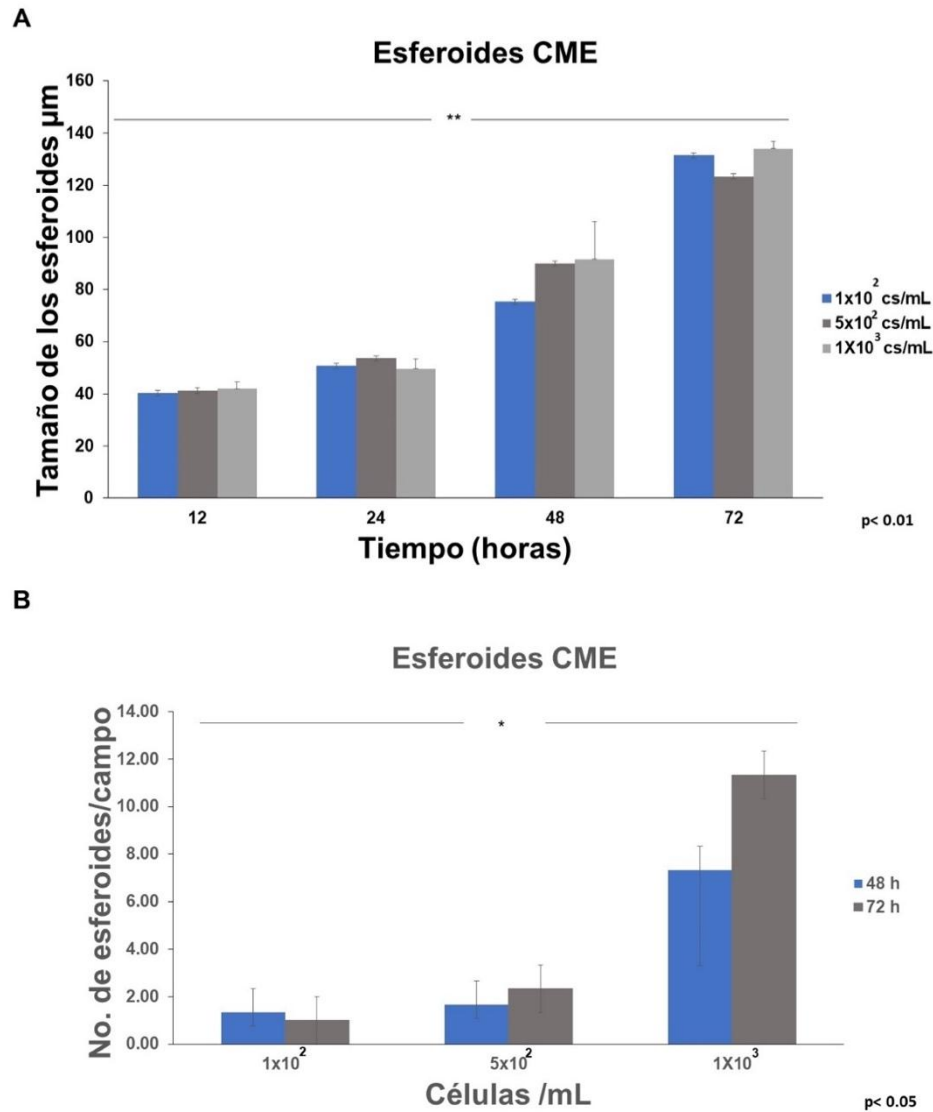


Figura 10. Tamaño y número de los esferoides. **A.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando el diámetro de estas para el análisis a lo largo del ensayo. **B.** El número de esferoides se determinó mediante tres campos aleatorios por cada experimento. Los datos son presentados como la media \pm ES (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas determinadas por la prueba de ANOVA y con post hoc de Tukey.

9.3 El hidróxido de calcio es tóxico para las CME. Con el fin de determinar el efecto del Ca(OH)_2 en la proliferación celular y formación de esferoides, se realizaron ensayos clonogénicos con 5×10^2 células/mL a concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50 y 1 mg/mL de Ca(OH)_2 durante 28 días. Los esferoides que fueron considerados como clonas son aquellos que tuvieron un tamaño $\geq 50 \mu\text{m}$. Los datos obtenidos mostraron un número disminuido de clonas por campo a partir de una concentración de 0.125 mg/mL de Ca(OH)_2 e incluso a concentraciones de 0.50 y 1 mg/mL se inhibe la formación de estas por completo. Sugiriendo que este compuesto a partir de concentraciones de 0.125 mg/mL es tóxico para las células mesenquimales de encía (**Figura 11**).

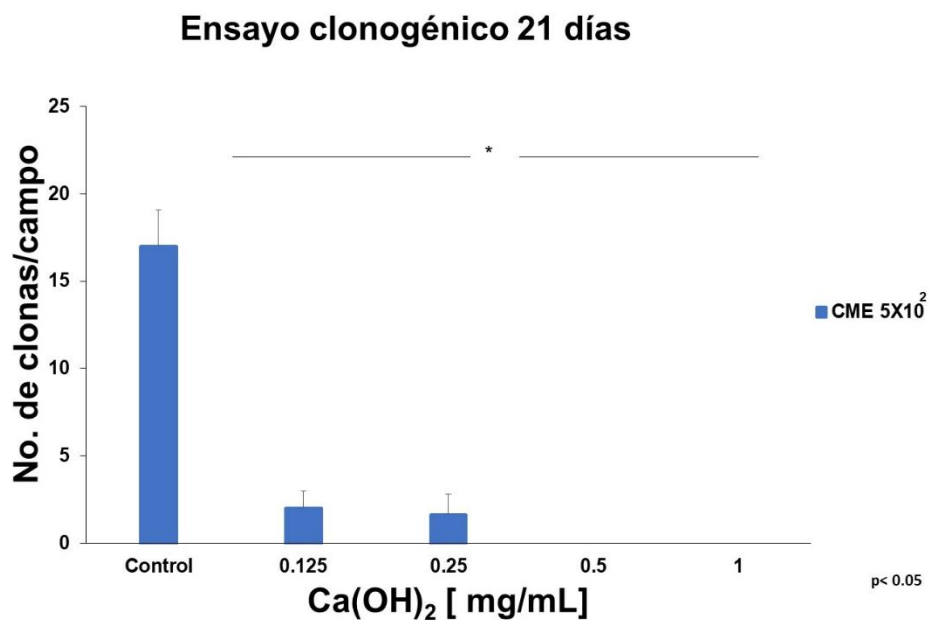


Figura 11. Ensayo clonogénico de células mesenquimales de encía a una concentración de 5×10^2 células/mL con 0.125, 0.25, 0.50 y 1 mg/mL de Ca(OH)_2 . La gráfica representa la media \pm DE de tres experimentos que se realizaron de forma individual. El asterisco indica la diferencia significativa ($*p < 0.05$) determinadas por la prueba de ANOVA y con post hoc de Tukey.

9.4 Viabilidad celular de las CME. La viabilidad celular es indispensable para poder determinar el efecto de los medicamentos utilizados durante la terapéutica odontológica, los esferoides obtenidos a partir de una concentración de 5×10^2 células/mL crecidos durante 72 horas se sometieron a una concentración de 0.125 mg/mL de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Las microfotografías muestran estructuras densas que difieren de la imagen y forma de los esferoides observados en el control, al ser los esferoides sometidos a tinción con azul tripano para determinar viabilidad por exclusión de este, las células disgregadas de los esferoides muestran una disminución significativa de la viabilidad celular confirmando que este compuesto es tóxico incluso para cultivos tridimensionales ya estructurados como los esferoides.

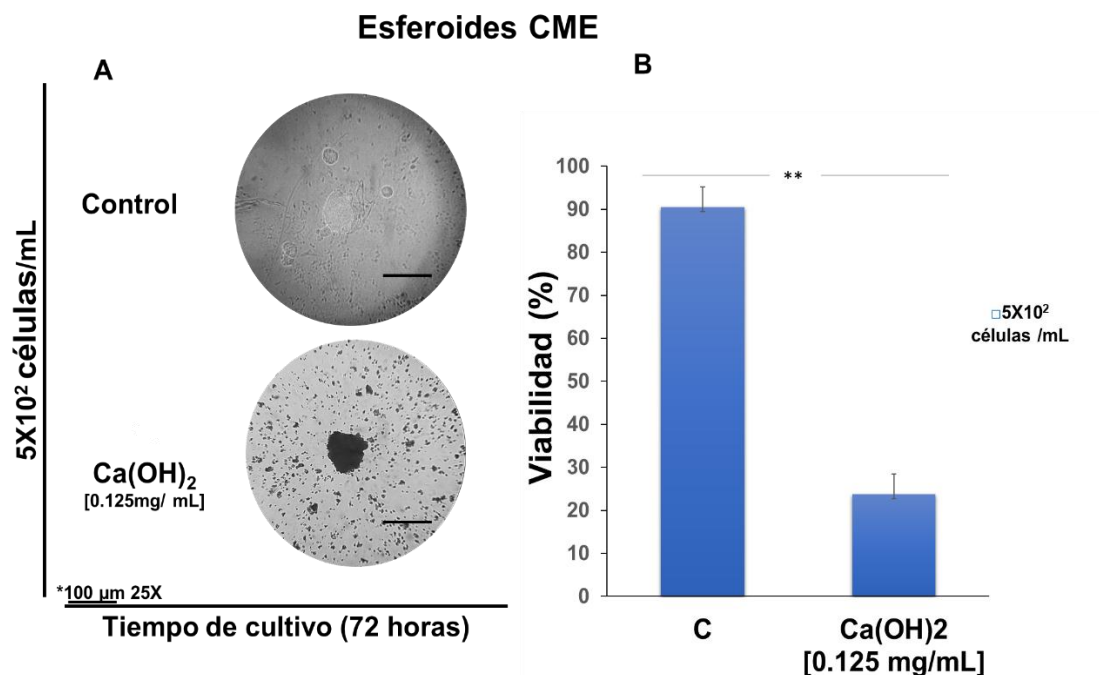


Figura 12. Ensayos de viabilidad de esferoides con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo por exclusión de azul tripano a las 24 horas posteriores al tratamiento de esferoides con 0.125 mg/mL de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. **A.** Se muestra la microfotografía de los esferoides con tratamiento y su control (C). **B.** La gráfica representa la media \pm DE de tres experimentos que se realizaron de forma individual.

10. DISCUSIÓN

La terapéutica de la periodontitis apical en la actualidad ha tenido como objetivo obtener los mejores beneficios en el uso de medicamentos como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$; sin embargo, el mecanismo de acción de estas pastas a base de hidróxido de calcio no se conoce con exactitud, pero sus propiedades se basan en su elevada alcalinidad producida al liberarse iones hidroxilo, y su efecto antimicrobiano, que disminuye la actividad osteoclástica y activa la fosfatasa alcalina, favoreciendo la reparación hística y la aposición de tejidos calcificados (34).

Por otra parte, un evento importante que se busca dentro de la terapia dental es la regeneración de los tejidos dañados y perdidos que se observa en patologías como la periodontitis apical. Las células troncales mesenquimales expresan un espectro de marcadores de superficie celular específico y tienen un potencial de diferenciación de múltiples linajes volviéndose objetivo importante en el proceso de regeneración de tejidos (31).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las células mesenquimales de encía en condiciones de adherencia muestran características de proliferación y viabilidad similares a lo reportado con anterioridad (35), por lo que se pueden utilizar para generar cultivos tridimensionales. Las metodologías de cultivos tridimensionales tienen una ventaja importante y es la de promover un ambiente celular lo más cercano y parecido a la arquitectura de los tejidos en el cuerpo humano, además de que este tipo de cultivos han mostrado incrementar la expresión de marcadores de troncalidad por lo que han tomado importancia en los últimos años (36, 37).

De acuerdo con los datos obtenidos, se muestra que hay una homogeneidad en las estructuras tridimensionales o esferoides a una concentración de 5×10^2 células/mL; Mientras que en 1×10^3 células/mL hay un aumento considerable del número de células cabe señalar que la irregularidad en el tamaño de los esferoides incrementa; por lo que es importante, para los ensayos con hidróxido de calcio, obtener esferoides similares en

características. En la literatura no existen publicaciones que indique cuáles son las concentraciones que se han utilizado en la formación de esferoides mesenquimales de encía para el tratamiento con Ca(OH)_2 .

Algunos autores están a favor de la extrusión del hidróxido de calcio hacia los tejidos apicales, ya que en la literatura se menciona que puede reducir las reacciones inflamatorias al disminuir la capacidad de adherencia de los macrófagos (34); sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo en ninguna de las tres concentraciones probadas se favorece la viabilidad en los cultivos tridimensionales.

Por muchos años el hidróxido de calcio ha sido el material estándar en el mantenimiento de la pulpa dental, aún es importante determinar las concentraciones del uso correcto de este material, y en los casos particulares donde se contraindique el uso por perforaciones periapicales, que induzcan la extrusión de este material, provocando efectos citotóxicos en las células del ligamento periodontal.

11. CONCLUSIÓN

Si bien el uso del hidróxido de calcio es común en la terapéutica odontológica, también se han buscado alternativas para disminuir el efecto citotóxico que tiene sobre las células. Sin embargo, es importante recordar que la extrusión de este tipo de medicamento, no es benéfica y retrasa el proceso de cicatrización, por lo que su uso se debe limitar al zona intraconducto, cuando se utilicen preparaciones con concentraciones mayores a 0.125 mg este compuesto.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carranza F. Newman.(2004) Periodontología Clínica, 9ª edición, México, Editorial Interamericana McGraw Hill..
2. Lindhe J. Karting T. Lang N. (2009) Periodontología Clínica e Implantológica, 4ª edición. Buenos Aires. Editorial Panamericana.
3. Park, C. H., Kim, K. H., Lee, Y. M., & Seol, Y. J. (2016). Advanced Engineering Strategies for Periodontal Complex Regeneration. *Materials* (Basel, Switzerland), 9(1), 57. <https://doi.org/10.3390/ma9010057>
4. Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
5. Loesche, W. J., & Grossman, N. S. (2001). Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.727-752.2001>
6. Hasturk, H., & Kantarci, A. (2015). Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontology 2000*, 69(1), 255–273. <https://doi.org/10.1111/prd.12105>
7. Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*, 11(3), 30. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z>
8. Naginyte, M., Do, T., Meade, J., Devine, D. A., & Marsh, P. D. (2019). Enrichment of periodontal pathogens from the biofilms of healthy adults. *Scientific reports*, 9(1), 5491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41882-y>
9. Bourgeois, D., Bravo, M., Llodra, J. C., Inquimbert, C., Viennot, S., Dussart, C., & Carrouel, F. (2019). Calibrated interdental brushing for the prevention of periodontal pathogens infection in young adults - a randomized

- controlled clinical trial. *Scientific reports*, 9(1), 15127.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51938-8>
10. Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30–44.
<https://doi.org/10.1038/nri3785>
 11. Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S1–S8.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
 12. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 89 Suppl 1, S159–S172.
<https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
 13. Cotti, E., Schirru, E., Acquas, E., & Usai, P. (2014). An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *Journal of endodontics*, 40(12), 1902–1911.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.013>
 14. Estrela, C., Freitas Silva, B. S., Silva, J. A., Yamamoto-Silva, F. P., Pinto-Júnior, D. D., & Gomez, R. S. (2017). Stem Cell Marker Expression in Persistent Apical Periodontitis. *Journal of endodontics*, 43(1), 63–68.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.002>
 15. . Abbott PV. (2004) Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical Periodontitis. *Endodontic Topics*. 2004; 8(1): 36-54.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00098.x>
 16. Nair, P.N.. (2003). Non-microbial etiology: Foreign body reaction maintaining post-treatment apical periodontitis. *Endodontic Topics*. 6(1). 114 - 134. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00052.x>

17. Siqueira, J. F., Jr, Rôças, I. N., Ricucci, D., & Hülsmann, M. (2014). Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *British dental journal*, 216(6), 305–312. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.200>
18. Siqueira, J. F., Jr, & Rôças, I. N. (2013). Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 255–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00082-12>
19. Morse D. R. (1977). Immunologic aspects of pulpal-periapical diseases. A review. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 43(3), 436–451. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(77\)90331-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(77)90331-0)
20. Farhad, A., & Mohammadi, Z. (2005). Calcium hydroxide: a review. *International dental journal*, 55(5), 293–301. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2005.tb00326.x>
21. Arias S. Más Sarabia M., García J., Rodríguez G., Álvarez M. (2005). El hidróxido de calcio: su uso clínico en la endodoncia actual. *Archivo Médico de Camagüey*, 9(3).
22. Fava, L. R., & Saunders, W. P. (1999). Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International endodontic journal*, 32(4), 257–282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00232.x>
23. Fahd A., Stephenson G., Lyons N., Young A., Stetson W. (2014) Human Periodontal Ligament Cells Response to Commercially Available Calcium Hydroxide Pastes. *Int J Dentistry Oral Sci.* 1(1), 6-9. <http://dx.doi.org/10.19070/2377-8075-140002>
24. Zare Jahromi, M., Ranjbarian, P., & Shiravi, S. (2014). Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 8(3), 130–133. <https://doi.org/10.5681/joddd.2014.024>
25. Rodríguez-Lozano, F. J., Collado-González, M., Tomás-Catalá, C. J., García-Bernal, D., López, S., Oñate-Sánchez, R. E., Moraleda, J. M., & Murcia, L. (2019). GuttaFlow Bioseal promotes spontaneous differentiation of human periodontal ligament stem cells into cementoblast-like

- cells. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 35(1), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.003>
26. Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
27. Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkowicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta biochimica Polonica*, 62(3), 329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
28. Rady, D., Abbass, M., El-Rashidy, A. A., El Moshy, S., Radwan, I. A., Dörfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2020). Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Prospect of Human Clinical Translation. *Stem cells international*, 2020, 8837654. <https://doi.org/10.1155/2020/8837654>
29. Kim, D., Lee, A. E., Xu, Q., Zhang, Q., & Le, A. D. (2021). Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Comprehensive Review. *Frontiers in immunology*, 12, 667221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667221>
30. Fawzy El-Sayed, K. M., & Dörfer, C. E. (2016). Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem cells international*, 2016, 7154327. <https://doi.org/10.1155/2016/7154327>
31. Gan, L., Liu, Y., Cui, D., Pan, Y., Zheng, L., & Wan, M. (2020). Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application. *Stem cells international*, 2020, 8864572. <https://doi.org/10.1155/2020/8864572>
32. Ruiz C, Shachez M, Yactine S. (2010) La ingeniería de tejidos como tratamiento del absceso periapical. URJC, España.
33. Zhou, L. L., Liu, W., Wu, Y. M., Sun, W. L., Dörfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2020). Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters. *Stem cells international*, 2020, 1327405. <https://doi.org/10.1155/2020/1327405>

34. Chu S, Perea B., Labajo E., Santiago A., García F. (2011). Lesiones causadas por extrusión de hidróxido de calcio al periápice: Causas y recomendaciones de actuación. *Científica Dental*, 8 (2), 141-147.
35. Rao, S. R., Subbarayan, R., Dinesh, M. G., Arumugam, G., & Raja, S. T. (2016). Differentiation of human gingival mesenchymal stem cells into neuronal lineages in 3D bioconjugated injectable protein hydrogel construct for the management of neuronal disorder. *Experimental & molecular medicine*, 48(2), e209. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.113>
36. Ong, C. S., Zhou, X., Han, J., Huang, C. Y., Nashed, A., Khatri, S., Mattson, G., Fukunishi, T., Zhang, H., & Hibino, N. (2018). In vivo therapeutic applications of cell spheroids. *Biotechnology Advances*, 36(2), 494-505. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.003>
37. Subbarayan, R., Murugan Girija, D., & Ranga Rao, S. (2018). Gingival spheroids possess multilineage differentiation potential. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 1952–1958. <https://doi.org/10.1002/jcp.25894>