

**EFFECTO DE LA N-ACETILCISTEINA SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE
CÉLULAS MADRE DE ORIGEN PULPAR EN ESFEROIDES 3D**

**Nury Tatiana Jiménez Ortegón
Lina Fernanda González Villamil**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ENDODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC.- JULIO 2022**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Endodoncia
Título:	Efecto de la N-acetilcisteína sobre la viabilidad y proliferación de células madre de origen pulpar en esferoides 3D
Grupo de investigación	INMUBO Grupo de Inmunología celular y molecular - Universidad El Bosque
Línea de investigación:	Inmunología celular y molecular del cancer
Tipo de investigación:	Posgrado/Grupo
Estudiantes:	Nury Tatiana Jiménez Ortegón Lina Fernanda González Villamil
Director:	Dra. Sandra Janeth Perdomo Lara
Codirector:	Dr. Henry Sossa Rojas Dra. Angela Fonseca Benítez
Asesor metodológico:	Dr. Luis Fernando Gamboa Martínez

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
NATALIA RUÍZ ROGERS	Vicerrector(a) Académico
RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
DIANA CAROLINA ALZATE MENDOZA	Directora Programa de Endodoncia

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

DEDICATORIA

Muchas veces la malicia o la estupidez pondrán obstáculos a la nueva idea; de ahí que es preciso luchar arduamente para lograr la tolerancia mutua e incondicional. Sólo así la ciencia florece y avanza, pues su fundamento es la libre experimentación e investigación.

Max Nettleau

A mi compañera de tesis, colega y gran amiga Lina Fernanda González Villamil. Siempre me sentiré afortunada y privilegiada por haberla conocido y porque me enseñó el valor de la humildad. Siempre estará en mi memoria.

GUIA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	8
4. Justificación	12
5. Objetivos	14
7. Metodología del Proyecto	15
7.1. Tipo de estudio	15
7.2. Métodos y técnicas para la recolección de la información	15
7.2.1 Cultivo de células DPSC en monocapa (2D)	15
7.2.2 Ensayo de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D)	15
7.2.3 Síntesis de esferoides 3D de células madre de origen pulpar	16
7.2.4 Caracterización de los esferoides 3D	16
7.2.5 Estimación de los parámetros morfológicos	16
7.2.6 Plan de tabulación y análisis	16
8. Consideraciones éticas	19
9. Resultados	20
9.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D)	20
9.2 Caracterización de los esferoides 3D	21
9.3 Estimación de los cambios en los parámetros morfológicos	22
postratamiento	
10. Discusión	26
11. Conclusiones	30
12. Referencias bibliográficas	31

LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
Figura 1	Curva dosis-respuesta sobre células DPSCs cultivadas en monocapa. Obtención de datos y análisis estadístico descriptivo por Dra. Tatiana Jiménez	19
Figura 2	Esferoides tridimensionales de DPSCs y sus respectivas segmentaciones. Fotos realizadas por la Dra Angela Fonseca-Grupo Inmubo, segmentaciones obtenidas por Dra. Tatiana Jiménez	20
Figura 3	Parámetros morfológicos de los esferoides de DPSCs; comparación entre esferoides sin tratamiento y tratados con NAC a 1,83Mm. Obtención de datos y análisis estadístico descriptivo por Dra. Tatiana Jiménez	22
Figura 4	Esferoides tridimensionales de DPSCs y su respectiva reconstrucción 3D; comparación morfológicas con los esferoides controles a las 72h con los esferoides tratados con NAC A 1,83Mm a las 72h. Fotos realizadas por la Dra Angela Fonseca-Grupo Inmubo. Reconstrucciones obtenidas por Dra. Tatiana Jiménez	23
Figura 5	Esferoides tridimensionales de DPSCs y su respectiva reconstrucción 3D pre y postratamiento. Esferoides tridimensionales de DPSCs y su respectiva reconstrucción 3D pre y postratamiento. Fotos realizadas por la Dra Angela Fonseca-Grupo Inmubo. Reconstrucciones obtenidas por Dra. Tatiana Jiménez	24

RESUMEN

EFFECTO DE LA N-ACETILCISTEINA SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE ORIGEN PULPAR EN ESFEROIDES 3D

Antecedentes: La N-acetilcisteína (NAC), un profármaco de cisteína y precursor del glutatión (GSH), inhibe la inflamación/señalización de NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias. Debido a estas propiedades, la NAC podría utilizarse en la terapia pulpar vital (TPV). **Objetivo:** Evaluar el efecto in vitro de NAC sobre la viabilidad y proliferación de esferoides de células madre de pulpa dental humana (DPSCs). **Metodología:** El efecto de NAC sobre la viabilidad en cultivo monocapa de DPSC se determinó con el ensayo Alamar blue, la concentración citotóxica 50 se evaluó utilizando las concentraciones de 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 1.83mM, 2.5mM y 3 mM) en tres tiempos diferentes (24h, 48h y 72h). La caracterización morfológica de los esferoides de DPSCs se determinó con análisis de imágenes utilizando el software AnaSP2 para evaluar la homogeneidad morfológica. Los cambios en los parámetros morfológicos se midieron antes y después del tratamiento con NAC durante 72h en los esferoides. Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado y se repitieron dos veces. Se utilizó el software GraphPad Prism para las gráficas y para determinar la media y la desviación estándar. **Resultados:** En los parámetros de morfología evaluados en los esferoides de DPSCs se evidencia cambios significativos en área, volumen y perímetro incrementando significativamente entre los esferoides pretratados y postratados con NAC a 1,83Mm durante 72h. **Conclusiones:** La NAC incrementa la viabilidad y proliferación celular en esferoides de DPSCs según los resultados obtenidos. Se hace necesario evaluar sobre este modelo experimental más concentraciones para identificar la que mejor promueva la viabilidad y proliferación celular.

Palabras clave: N-Acetilcisteína, células madre de pulpa dental, proliferación, formación de esferoides.

ABSTRACT

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF DENTAL PULP STEM CELLS IN 3D SPHEROIDS

Background N-Acetylcysteine (NAC) a cysteine prodrug and glutathione (GSH) precursor, inhibits inflammation/NF- κ B signaling and expression of proinflammatory cytokines. Possessing antimicrobial property and exerts anticarcinogenic and antimutagenic effects against certain types of cancer. Due to these properties, NAC could be used in vital pulp therapy (VPT). **Aim** Evaluate the in vitro effect of NAC on the viability and proliferation of human dental pulp stem cell (DPSCs) spheroids. **Methods** The effect of NAC on viability of monolayer culture of DPSCs was determined by Alamar blue assay, the cytotoxic concentration 50 will be evaluated using different concentrations (0.1, 0.5, 1, 1.83, 2.5 and 3 mM) in three different times (24h, 48h and 72h). The morphological characterization of DPSCs spheroids was determined with image analysis using AnaSP2 software were used to achieve morphological 2D and 3D (volume, sphericity, solidity, convexity) parameters to assess morphological homogeneity. Changes in morphological parameters will be measured before and after NAC for 72h treatment on the DPSC spheroids. All experiments was done in six replicates and repeated two times. GraphPad Prism software was used for the graphs and for determined the mean and standard deviation. **Results** In the morphology parameters evaluated on spheroids of DPSCs, significant changes in area, volume and perimeter are evidenced, increasing significantly between the spheroids pre-treated and post-treated with NAC at 1.83Mm for 72h. **Conclusions:** NAC increases cell viability and proliferation in spheroids of DPSCs according to the results obtained. More studies are required to evaluate more concentrations of NAC with this experimental model and the study of other variables such as differentiation to be able to use NAC in VPT.

Key words: N-acetylcysteine, Dental pulp stem cells, Proliferation, spheroid formation

Introducción

La N-acetilcisteína (NAC) es un profármaco de cisteína y precursor del glutatión (GSH), se ha empleado durante décadas en la práctica clínica como agente mucolítico y para el tratamiento de trastornos asociados con la deficiencia de GSH. Otras actividades terapéuticas de NAC incluyen; la inhibición de la inflamación, la señalización de NF- κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias. La N-acetilcisteína también es un compuesto no antibiótico que posee propiedades antimicrobianas y ejerce efectos anticancerígenos y antimutagénicos contra ciertos tipos de cáncer. Recientemente, se ha sugerido que NAC por sus actividades biológicas y farmacológicas podría ser un medicamento potencial para uso en la terapia pulpar vital (TPV).

En el tejido pulpar existe una población de células madre mesenquimales (DPSC, por sus siglas en inglés) que después de una TPV implica su migración al sitio de la lesión, proliferación y diferenciación a odontoblastos secundarios, seguido de un proceso de dentinogénesis y formación de un puente dentinario sobre la pulpa expuesta (Omidi et al., 2020). En los últimos años con los avances en enfoques moleculares y regenerativos en endodoncia, se sabe que la regeneración del complejo pulpo-dentinal después de una TPV podría verse afectada por las propiedades biológicas de los materiales actualmente empleados, por esto, considerando las actividades biológicas y farmacológicas potencialmente importantes de la NAC se propone como agente terapéutico en TPV.

Se ha demostrado que los esferoides tienen una alta similitud de un modelo in vivo, estos son una organización de células tridimensional que logran simular en gran medida el ambiente in vivo que representan la señalización célula-célula y célula-matriz extracelular, interacciones que modulan procesos esenciales para la célula como su proliferación, supervivencia y secreción de diferentes factores propios del microambiente celular. En la vida real, la formación de esferoides es el comienzo del desarrollo del embrión. Bajo ciertas condiciones en cultivo, las células permanecen o migran juntas y forman una estructura redonda similar a una esfera. El cultivo de esferoides en 3D puede proporcionar una estrategia para aislar y enriquecer la población de células madre a partir de DPSC heterogéneas, por esto se ha demostrado

que son los modelos experimentales más reales que optimizan la predicción en términos de eficacia terapéutica y reproducibilidad in vivo.

Diversos materiales y medicamentos han sido evaluadas en cultivos celulares monocapa que no presentan los mismos resultados frente a su evaluación en modelos in vivo, por esto se pretende emplear los esferoides de DPSC como una aproximación, dado que logran simular algunas características del tejido pulpar in vitro, convirtiéndose en una alternativa robusta y confiable para evaluar aspectos relacionados con la viabilidad, proliferación, diferenciación celular. Pretendiendo así, aportar en la investigación del descubrimiento de medicamentos de origen natural y su evaluación para el tratamiento de la TPV

2. Marco teórico

La N-acetilcisteína (NAC), como medicamento seguro y económico, es comercialmente accesible desde hace mucho tiempo. NAC es un fármaco mucolítico bien tolerado que modera las secreciones mucosas adheridas y mejora la actividad del glutatión S-transferasa. Durante la administración oral, la reacción de desacetilación de NAC ocurre mientras pasa por el intestino delgado y también por el hígado, por lo que su biodisponibilidad se reduce al 4-10%. NAC estimula la biosíntesis de glutatión, promueve la desintoxicación y actúa directamente como eliminador de radicales libres. Es un poderoso antioxidante y una posible opción de tratamiento para enfermedades caracterizadas por la generación de radicales libres de oxígeno. (Mokhtari et al., 2017).

La cavidad bucal es el primer punto de entrada para diferentes formas de agresiones ambientales, que incluyen sustancias químicas tóxicas, infecciones microbianas y lesiones mecánicas. Estas agresiones generan estrés oxidativo, inducen inflamación e incluso pueden iniciar el cáncer. (Moon et al., 2016) Algunos materiales dentales, como resinas, metales y cerámicas, son citotóxicos y tienen el potencial de inducir estrés oxidativo, daño del ADN, reacciones inflamatorias y muerte celular por apoptosis. Las alteraciones en la regulación de las respuestas inflamatorias del huésped a la infección bacteriana en la pulpa dental y los tejidos periodontales dan como resultado pulpitis y periodontitis (Kaufman G & Skrtic D, 2020). Las tensiones mecánicas producidas durante las actividades masticatorias fisiológicas, el movimiento dental ortodóncico o el traumatismo oclusal, así como las tensiones térmicas provocadas por la preparación de la cavidad del diente, la polimerización de resina iniciada por la luz o la irradiación láser, pueden crear tensiones oxidativas y reacciones inflamatorias en la pulpa dental, lo que resulta en la necrosis pulpar (Rushworth & Megson, 2014). Por tanto, existe la necesidad de disminuir eficazmente la toxicidad xenobiótica, neutralizar el estrés oxidativo, matar patógenos invasores y eliminar las respuestas inflamatorias. Debido a las actividades biológicas y farmacológicas potencialmente importantes, la NAC se ha postulado como agente terapéutico en el cuidado de la salud oral.

Actividad anti-inflamatoria:

El factor de transcripción NF- κ B juega un papel crítico en muchos aspectos de la cascada de inflamación y la respuesta inmune al regular la expresión de genes. El efecto antiinflamatorio de NAC está asociado con la disminución de la actividad de NF- κ B; NAC suprime la ubiquitinación y degradación de I- κ B (un inhibidor de NF- κ B) y, por lo tanto, bloquea la translocación y activación nuclear de NF- κ B. La N-acetilcisteína también modula las actividades de transcripción a través de varias vías que involucran c-Fos / c-Jun, STAT e inhibidores de ciclina (Rushworth & Rushworth, 2014; Pinar et al., 2016; Pei et al., 2018).

En la inflamación oral, NAC previene la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos, como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en macrófagos y fibroblastos gingivales. Los materiales de resina restauradora pueden causar respuestas inflamatorias por activación de monocitos y cambios en los niveles de citocinas liberadas. Esto se demuestra por el aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias en el líquido crevicular gingival. La N-acetilcisteína se ha utilizado para prevenir la inflamación en estudios de citotoxicidad de materiales resinoso. (Pinar et al., 2016)

Actividad antimicrobiana:

Aunque NAC no es antibiótico posee actividades antimicrobianas y descompone las biopelículas bacterianas de patógenos medicamente relevantes atacando a microorganismos como *Actinomyces naeslundii* y *Enterococcus faecalis* agentes de enfermedades endodónticas, *Lactobacillus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* que son agentes de patología cariogénica que son todos Gram + y alguno Gram - como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* que están involucrados en patologías endodónticas. (Rushworth & Rushworth, 2014; Moon et al., 2016; Mokhtari et al., 2017). Estas características hacen que sea un medicamento potencial para el manejo de patologías orales, en donde haya formación de biopelículas polimicrobianas, que puede ser capaz de descomponer.

Actividad antioxidante:

El estrés oxidativo intracelular ocurre cuando se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) / especies reactivas de nitrógeno (RNS) más allá de la capacidad antioxidante de la célula. El estrés oxidativo excesivo da como resultado la modificación oxidativa de proteínas, lípidos, ADN y la posterior muerte celular. Este proceso contribuye a numerosas condiciones patológicas, incluidas las enfermedades orales. (Santus et al., 2014; Mokhtari et al., 2017; Pei et al., 2018). Los antioxidantes, naturales o sintéticos, son eficaces para disminuir los efectos acumulativos del estrés oxidativo y la NAC es de particular interés. La N-acetilcisteína es un antioxidante directo que interactúa con los grupos electrofílicos de radicales libres a través de su cadena lateral de tiol libre. Debido a que el NAC reacciona rápidamente con el radical hidroxilo (OH), el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el ion trióxido de carbono (CO₃), desintoxica las ROS producidas por los leucocitos. Aunque el NAC no reacciona directamente con el óxido nítrico (NO), reacciona con su forma reducida y protonada, el nitroxilo (HNO). Además, NAC quelata iones de metales de transición como Cu²⁺ y Fe³⁺, así como iones de metales pesados como Cd²⁺, Hg²⁺ y Pb²⁺, a través de su cadena lateral de tiol para producir complejos. Este proceso de quelación facilita la eliminación de estos iones metálicos del cuerpo. (Santus et al., 2014).

Además de su función como antioxidante directo, NAC también funciona como antioxidante indirecto. La acción antioxidante indirecta de la NAC se basa en la reposición de GSH intracelular, el principal antioxidante del cuerpo con funciones celulares versátiles. Teniendo en cuenta el potencial antioxidante del GSH y las concentraciones muy bajas de NAC dentro de las células, es probable que los efectos antioxidantes predominantes del NAC estén asociados con el mantenimiento de los niveles de GSH en el entorno intracelular. (Kan et al., 2016).

Actividad anticancerígena:

Otra propiedad que se atribuye a este medicamento es la actividad anti carcinogénica, porque tiene la capacidad de modular la genotoxicidad, la oncogenicidad y los procesos de progresión de tumores porque induce a la reparación del ADN, atenúa a ROS genotóxicos,

modula el metabolismo y las vías mitocondriales que inducen a la reparación del DNA, mantiene la viabilidad celular porque regula los mecanismos de apoptosis porque tiene influencia sobre el ciclo celular, lo que también detiene las metástasis. (MONN et al., 2012).

Los esferoides multicelulares (MSC): Un modelo in vitro para la evaluación de fármacos

Los MSC son agregados tridimensionales de células que logran simular en gran medida el ambiente in vivo que representan la señalización célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM), interacciones que modulan procesos esenciales para la célula como su proliferación, supervivencia y secreción de diferentes factores propios del microambiente.

El cultivo de células 2D (es decir, el cultivo en monocapa) se usa convencionalmente en las pruebas de candidatos a fármacos *in vitro* ; sin embargo, las limitaciones del cultivo en monocapa sugieren considerar un método alternativo. *Estas limitaciones incluyen la falta de señalización célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC) que se produce en el entorno in vivo* 3D (MSC) donde dichas señales son esenciales para la diferenciación celular, proliferación y una variedad de funciones celulares (Breslin S y O'Driscoll., 2013). Un ejemplo de ellos pueden ser las integrinas , que son receptores de superficie celular , anclan las células a la MEC y también participan en la interpretación celular de las señales bioquímicas de su entorno local. Es probable, por lo tanto, que los ensayos celulares en 3D sean más análogos y, por lo tanto, más predictivos de eventos *in vivo* en comparación con cultivos en 2D más simplificados en los que las vías de señalización esenciales pueden haberse perdido o comprometido (Breslin & O'Driscoll., 2013; Angela Fonseca-Benitez et al., 2022). Según Breslin & O'Driscoll (2013) se sugiere que en los modelos de investigación y en el estudio de fármacos los MSC son los ideales para cerrar la brecha entre los cultivos en monocapa y los estudios en modelos animales .

3. Planteamiento del problema

La terapia pulpar vital (TPV) es un tratamiento conservador que implica la eliminación de irritantes locales y posteriormente emplear un material protector directa o indirectamente sobre la pulpa, cuyo principal objetivo es mantener el tejido pulpar sano (Ghoddusi et al., 2013). La vitalidad pulpar es sumamente importante para la viabilidad del diente, ya que aporta nutrición y actúa como biosensor para detectar estímulos patógenos. Además, el depósito de dentina secundaria continuará en la pulpa vital preservada. Como se conoce hasta la actualidad, existe una población de células madre que se encuentran en el tejido pulpar que después de una TPV implica su migración al sitio de la lesión y diferenciación a odontoblastos secundarios, seguido de un proceso de dentinogénesis y formación de un puente dentinario sellado sobre la pulpa expuesta (Omidi et al., 2020). En los últimos años con los avances en enfoques moleculares y regenerativos en endodoncia, se sabe que la regeneración del complejo pulpo-dentinal después de una TPV podría verse afectada por las propiedades biológicas de los materiales usados (Kearney et al., 2018; Omidi et al., 2020).

Los materiales actuales de TPV contemplan el tradicional hidróxido de calcio, que debido a su pH alcalino, tiene acción antimicrobiana y promueve la formación de tejido duro similar a la dentina, no obstante, existen preocupaciones vigentes con respecto a su solubilidad a largo plazo y a la falta de adhesión a la dentina se han sugerido otros materiales. El hidróxido de calcio tiene otras limitaciones, ya que la barrera reparadora de tejido duro formada debajo de este material es generalmente incompleta, con los defectos resultantes asociados a menudo con inflamación o necrosis pulpar (Ghoddusi et al., 2013), por ejemplo el TheraCal, que es un material de silicato tricálcico en un monómero hidrofílico, estimula la síntesis de hidroxiapatita y un puente dentinario secundario a través de liberación de calcio y su pH alcalino, de forma similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio, sin embargo, estudios como el de Jeanneau *et al.*, (2017) se demostró que este medicamento tiene efectos tóxicos sobre fibroblastos de pulpa dental (Jeanneau et al., 2017), Collado-González *et al.*, (2017) demostró que sobre células madre aisladas de dientes primarios exfoliados humanos este medicamento induce a una baja viabilidad celular, casi nula (Collado-Gonzalez et al., 2017).

Por otra parte, el Agregado de Trióxido Mineral (MTA), como cemento a base de silicato de calcio se ha convertido en el material de elección para el recubrimiento pulpar directo en las últimas décadas. Su mecanismo de acción es similar al del hidróxido de calcio, lo que conduce a la formación de un puente calcificado. Sin embargo, el MTA tiene algunas desventajas, como un tiempo de fraguado prolongado, difícil manipulación, decoloración del diente y precios elevados (Torabinejad et al., 2018). Debido a estas desventajas, se han introducido en el mercado nuevos cementos a base de silicato de calcio como CEM y Biodentine. En el estudio de Küçükkaya et al.,(2016) se evaluó los efectos de MTA, CEM y Biodentine después de diferentes tiempos de incubación fibroblastos con del ligamento periodontal humano. En los resultados obtenido en este estudio se encontró que el MTA y CEM presentaron más del 90% de viabilidad celular después de 24 y 48 h de incubación; sin embargo, la viabilidad celular se redujo significativamente después de 72 horas de incubación. Biodentine mostró una viabilidad celular significativamente menor (73%) después de 24 horas de incubación (Küçükkaya et al., 2016). Además, Mozayeni et al., (2012). reportaron una mayor citotoxicidad del cemento CEM en comparación con MTA en fibroblastos L929 en tres diferentes tiempos; a las 1, 24 y 168 h (Mozayeni et al., 2012).

Así, se puede destacar que las preocupaciones recientes y la naturaleza destructiva del tratamiento dental conducen a desarrollar metodologías de tratamientos regenerativos promoviendo soluciones restauradoras de base biológica guiada por células madre que migran al sitio de la lesión, las cuales deben proliferar y diferenciarse a odontoblastos que sean capaces de sintetizar matriz dentinal. Fundamentalmente, el volumen del tejido dentinal formado y su calidad dependen de las propiedades del material aplicado, de su mecanismo de acción y de su concentración (Kearney et al., 2018); sin embargo, actualmente muchos de los materiales dentales disponibles están limitados por su citotoxicidad, acción inespecífica, mala manipulación y capacidad reparadora impredecible (Ghoddusi et al., 2013; Kearney et al., 2018). Por lo tanto, se hace necesario estudiar nuevos materiales dirigidos a los procesos de regeneración pulpar, que eviten la necesidad de un tratamiento endodóntico involucrando la pulpectomía total. Una posible solución es emplear la N-acetilcisteína (NAC).

La NAC es un fármaco, que se obtiene a partir de una modificación del aminoácido L-cisteína, es precursor de glutatión que ayuda a eliminar radicales libres y iones metálicos complejos, por lo que actúa como antioxidante. Tiene propiedades mucolíticas, es decir tiene la capacidad de destruir estructuras quimicofísicas de la secreción bronquial anormal disminuyendo la viscosidad, rompiendo los enlaces disulfuro de estas secreciones por lo que es empleado ampliamente en enfermedades respiratorias (Pei et al., 2018). Posee actividad anti-inflamatoria porque tiene la capacidad de inhibir a NF-KappaB y modula la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL8, IL9, IL1BETA inducidas o formadas por los lipopolisacáridos en células fagocíticas y en fibroblastos gingivales, y aunque no es antibiótico, posee actividades antimicrobianas y descompone las biopelículas bacterianas de patógenos medicamente relevantes atacando a microorganismos como; *Actinomyces naeslundii* y *Enterococcus faecalis* agentes de enfermedades endodónticas, *Lactobacillus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* que son agentes de patología cariogénica y como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* también involucrados en patologías endodónticas. Estas características hacen que sea un medicamento potencial para el manejo de patologías orales, en donde haya formación de biopelículas polimicrobianas, que puede ser capaz de descomponer (Moon et al., 2016).

Otra propiedad que se atribuye a este medicamento es la actividad anti carcinogénica, porque tiene la capacidad de modular la genotoxicidad, la oncogenicidad y los procesos de progresión de tumores porque induce a la reparación del ADN, atenúa a ROS genotóxicos, modula el metabolismo y las vías mitocondriales que inducen a la reparación del DNA, mantiene la viabilidad celular porque regula los mecanismos de apoptosis ya que tiene influencia sobre el ciclo celular, lo que también detiene las metástasis (Moon et al., 2016; Pei et al., 2018).

Según lo reportado por Lin *et al* NAC aumenta la tasa de proliferación de las Células madre mesénquimales aisladas de la médula ósea y el tejido adiposo, sin signos de envejecimiento celular, al tiempo que conserva la capacidad de las células para diferenciarse (Komada et al., 2012). Por el contrario, NAC según lo reportado por Sato et al inhibió la proliferación de fibroblastos y células epiteliales de la mucosa de la cavidad oral de una manera

dependiente de la dosis. Por tanto, para obtener un efecto deseable, *es decir*, la estimulación del crecimiento celular, se deben probar diferentes concentraciones de NAC para el tipo de célula específico (Sato et al., 2009).

Respecto a la pulpa dental, según lo reportado por Kojima et al (2008), al incorporar NAC en resinas compuestas evita la muerte y restaura el crecimiento de células madre de pulpa dental de rata (DPSC) *in vitro* cuando esas resinas se usaron como superficie de crecimiento. La NAC también inhibió la apoptosis y promovió la diferenciación osteogénica *in vitro* de las células de la pulpa dental de ratas adultas y humanas al aumentar los genes de diferenciación (Kojima et al., 2008).

Para mejorar el desarrollo y el estudio de los fármacos mediante el cultivo 3D, se debe considerar la unidad funcional de los tejidos en lugar de las células individuales, limitación que encontramos presente en los cultivos monocapa (2D). El tejido Pulpar tiene una arquitectura celular. Estas células tienen contactos especializados entre ellas, una morfología polarizada y están unidas a una membrana basal subyacente. El mantenimiento de estas características es esencial para la función normal del tejido, incluyendo la proliferación, diferenciación y supervivencia. Por lo tanto, el uso de cultivo celular 3D, que permite el crecimiento de cultivos 3D multicelulares pueden homologar las características esenciales del tejido, en este caso el tejido pulpar.

En la actualidad, no existe literatura científica que haya reportado la concentración de NAC que favorezca la viabilidad y proliferación de células madre de origen pulpar en esferoides 3D. Por lo tanto, nuestra pregunta de investigación es: ¿Cuál es la concentración de NAC requerida para estimular la viabilidad y proliferación celular en esferoides 3D de células madre de origen pulpar *in vitro*?

4. Justificación

La NAC posee efectos terapéuticos sobre una amplia gama de trastornos. Estos trastornos incluyen fibrosis quística, intoxicación por paracetamol, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, infección por virus de inmunodeficiencia humana, toxicidad por metales pesados y trastornos psiquiátricos / neurológicos. (Pei et al., 2018), he incluso recientemente se ha empleado como fármaco que contribuye a contrarrestar síntomas asociados a la enfermedad de Covid 19. Al ser un derivado N-acetilo del aminoácido L-cisteína, NAC es un profármaco de cisteína y un precursor del glutatión (GSH) que ayuda a eliminar los radicales libres y unir los iones metálicos en complejos.

Debido a que la NAC posee actividad antiinflamatoria a través de la inhibición del factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF- κ B) y la modulación de la síntesis de citocinas proinflamatorias, se ha utilizado para modular el estrés oxidativo y la inflamación en enfermedades relacionadas (Pinar et al., 2016). Aunque NAC no es un antibiótico, posee propiedades antimicrobianas y descompone las biopelículas bacterianas de patógenos médicamente relevantes (Moon et al., 2016). Estas características hacen que la NAC sea un candidato potencial para el manejo de enfermedades de origen endodóntico (Moon et al., 2016; Debeljak et al., 2016; Pei et al., 2018).

La cavidad bucal es el primer punto de entrada para diferentes formas de agresiones ambientales, que incluyen sustancias químicas tóxicas, infecciones microbianas y lesiones mecánicas. Estas agresiones generan estrés oxidativo, inducen inflamación e incluso pueden iniciar el cáncer. Algunos materiales dentales, como resinas, metales y cerámicas, son citotóxicos y tienen el potencial de inducir estrés oxidativo, daño del ADN, reacciones inflamatorias y muerte celular por apoptosis (Moon et al., 2016). Las alteraciones en la regulación de las respuestas inflamatorias del huésped a la infección bacteriana en la pulpa dental dan como resultado pulpitis y subsecuentemente la necrosis pulpar.

Por tanto, existe una necesidad en las células y en los tejidos orales de desintoxicar eficazmente, neutralizar el estrés oxidativo, matar patógenos invasores y eliminar las respuestas inflamatorias. A la luz de sus actividades biológicas y farmacológicas potencialmente importantes, la NAC se ha defendido como agente terapéutico potencial en

tratamientos de TPV. Así mismo lo reporta Yanping Pei *et al.*,(2018) donde se argumenta que debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, su actividad biológica y su capacidad para eludir los mecanismos de progresión de la enfermedad lo convierten en un agente terapéutico potencial para la intervención en trastornos pulpo-dentinales (Pei *et al.*, 2018). Por lo que se requiere más investigaciones, tales como identificar la concentración adecuada que potencie sus propiedades y mecanismos de acción modulando de esta forma la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células madre de origen pulpar hacia linaje odontoblástico y así se propicie la regeneración pulpo dentinal. Se han realizados estudios que han evaluado algunas de estas variables anteriormente mencionadas, no obstante, esto se ha realizado en cultivos monocapa de diferentes tipos celulares, no se han reportado estudios que empleen el modelo de esferoides 3D, que se aproximan más al comportamiento *in vivo* del tejido pulpar.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general: Evaluar el efecto *in vitro* de NAC sobre la viabilidad y proliferación de esferoides de células madre de pulpa dental humana.

6.2 Objetivos específicos:

- Hallar la concentración citotóxica 50 en cultivo monocapa de células madre de pulpa para elegir las concentraciones a evaluar sobre los esferoides.
- Preparar esferoides de células madre de pulpa dental
- Evaluar la viabilidad y proliferación celular en esferoides de células madre de pulpa dental.

7. Metodología del Proyecto

7.1 Tipo de estudio: Experimental in vitro

7.2 Métodos y técnicas para la recolección de la información (Materiales y métodos):

7.2.1 Cultivo de células DPSC en monocapa (2D):

Se sembraron y cultivaron células madre de pulpa dental de cuarto pasaje, previamente caracterizadas y donadas por el grupo de investigación en cajas de cultivo de 25cm² y medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Lonza), y se mantuvieron en incubadora al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa hasta que alcanzaron una confluencia entre el 80 - 90% para realizar el ensayo de citotoxicidad en cultivo 2D, previo a los ensayos sobre los esferoides para elegir la concentración por debajo de la concentración citotóxica 50 .

7.2.2 Ensayo de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D):

La citotoxicidad de NAC fue inicialmente evaluada en cultivos en monocapa (2D), este ensayo determina si la NAC tendrá efectos tóxicos sobre células vivas (DPSCs). Según Debeljak Martacic J *et al.*,(2016). La dosis más baja de NAC (0.1mM) en su estudio ejerció un efecto positivo significativo en la proliferación de DPSCs, así como en la protección antioxidante, creando un entorno beneficioso para el cultivo in vitro de células madre. Para este ensayo se emplearon n=1.080.000 células.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 10.000 células por pozo; posteriormente, se trataron con 6 concentraciones de NAC (0.1mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 2.5mM y 3mM), preparadas en medio de cultivo a partir de una solución stock a 15mM. Las concentraciones fueron evaluadas a las 48 y 72 horas. El efecto citotóxico de NAC se evaluó a través del ensayo de reducción de resazurina, utilizando como controles células sin tratamiento. La fluorescencia se midió con el lector de placas TECAN a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una de emisión de 590 nm

7.2.3 Síntesis de esferoides 3D de células madre de origen pulpar:

Para obtener el cultivo tridimensional tipo esferoide, se utilizaron placas de cultivo celular no adhesivas de 96 pozos (Corning® Costar®). Las DPSCs se sembraron a una densidad de 2.000 células/pozo utilizando medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Lonza). Posteriormente los esferoides se

obtuvieron por centrifugación a 1.300 rpm a 500g, después las DPSCs se mantuvieron en incubadora al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Después de 72 horas de cultivo, la formación de los esferoides se determinó con microscopio óptico invertido.

7.2.4 Caracterización de los esferoides 3D

La formación de los esferoides de las DPSCs se evaluó mediante parámetros morfológicos (área, convexidad, esfericidad, circularidad, solidez y diámetro) a las 72 horas posteriores a la siembra. Para esto, se obtuvieron imágenes del cultivo con el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Se calculó la circularidad, la esfericidad, la solidez y el diámetro de los esferoides con el software de análisis de imágenes para esferoides AnaSP (Piccinini,2015). Así como la reconstrucción y visualización a partir de una herramienta conocida como ReViSP que a partir de proyección permite reconstruir la forma tridimensional de los esferoides multicelulares, además de estimar el volumen contando los vóxeles (píxeles 3D) totalmente incluidos en la superficie tridimensional (Zanoni et al., 2019).

7.2.5 Estimación de los parámetros morfológicos

Luego de la adquisición de las imágenes y teniendo en cuenta que cada una debe contener un solo esferoide, el software las convierte a niveles de grises para hacer la segmentación de los esferoides y finalmente lograr una máscara binaria que permite extraer los parámetros morfológicos como se describe a continuación:

- Convexidad o circularidad: El índice permite determinar la integridad del esferoide antes del tratamiento. Valores cercanos a 1.0 indican círculos perfectos (Ware MJ et al.,2016). Se define como se muestra en la ecuación 1;

$$4\pi \frac{\text{Área del esferoide}}{\text{Perímetro esferoide}^2}$$

Ecuación 1.

- Diámetro: Es calculado con el diámetro del círculo que tiene la misma área que el área de la sección transversal del esferoide analizado.
- Solidez: Se relaciona con la cohesión de las células que componen el esferoide en relación con la densidad del mismo. Se obtiene utilizando la ecuación 2;

$$\frac{\text{Área del esferoide}}{\text{Área convexa}}$$

Ecuación 2.

- Esfericidad: Se muestra como un índice calculado de acuerdo a la ecuación mostrada a continuación (ecuación 3),

$$S = \frac{\pi \sqrt{4A/\pi}}{P}$$

Ecuación 3.

Finalmente, con el software ReViSP se realizó la reconstrucción de la morfología 3D del esferoide con base al volumen de este y obtenida a partir de la sección transversal 2D. La fórmula se describe a continuación (ecuación 4.):

$$V_{SPHERE} = \frac{\pi}{6} \cdot D^3.$$

Ecuación 4.

Dicha reconstrucción tridimensional se realiza a partir de suponer una simetría esférica local alrededor del eje máximo y calculada como el número de vóxeles. El software realiza la reconstrucción en diagramas que presentan gradientes de colores, los cuales expresan la ubicación del vóxel dentro de la figura tridimensional reconstruida y ubicada espacialmente en un cubo.

A partir de los resultados obtenidos en monocapa y basados en la literatura donde se describe que el cultivo tridimensional aporta cierta resistencia de las células a los tratamientos, se determinó evaluar el efecto de NAC a las 72 horas postratamiento. Así mismo, teniendo en

cuenta lo anterior las concentraciones empleadas fueron de 1.83mM y de 1mM. Todos los experimentos se realizaron en tiempos independientes; en cada ensayo se incluyeron como controles esferoides no tratados con NAC.

7.2.5 Plan de tabulación y análisis de datos.

Los datos se presentan como las medianas y desviaciones estándar de los experimentos independientes de los tiempos evaluados (48 y 72h horas en el cultivo 2D y 72 horas en el cultivo 3D). La tabulación y la representación gráfica de los resultados se realizó utilizando el software Graphpad Prism.

8. Consideraciones éticas

Este estudio empleó un modelo de cultivo tridimensional de células tumorales, por lo que de acuerdo a la guía de Buenas Prácticas Clínicas del Comité Institucional de Ética en Investigación descrito para la Universidad el Bosque y en concordancia con la resolución 008430 de 1993, este estudio es considerado sin riesgo, por lo que no requiere aval ético.

9. Resultados

9.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D):

Se realizó una evaluación inicial en las células DPSCs cultivadas en monocapa con el fin de conocer el efecto citotóxico de NAC sobre las DPSCs, así como las concentraciones más efectivas en términos de disminución del porcentaje de viabilidad.

Mediante los resultados obtenidos en el ensayo de reducción de resazurina en el cultivo 2D, se observó una disminución del porcentaje de viabilidad celular al emplear la concentración

1,83mM de NAC comparado con el control (células no tratadas) en ambos tiempos evaluados (48 y 72h). Por otra parte, se evidencia que la concentración de 0,1mM de NAC incrementó la proliferación de las DPSCs en comparación con el control a las 72h. (Figura 1). Posteriormente se halló la IC50 en donde para las 48h fue de 2,9 y para las 72h fue de 1.53.

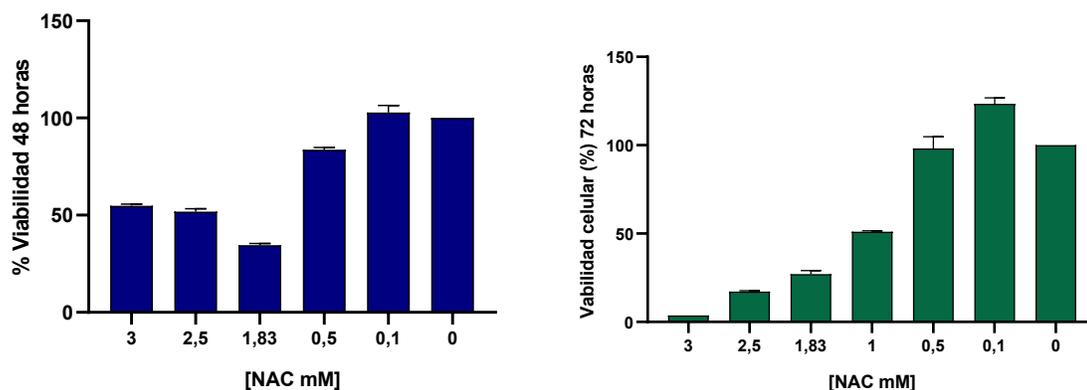


Figura 1. Curva dosis-respuesta sobre células DPSCs cultivadas en monocapa. Las células fueron tratadas con cinco concentraciones de NAC (3, 2.5, 1.83, 1, 0.5 y 0.1mM). Cada barra representa la media de 6 experimentos independientes para ambos tiempos de evaluación 48 y 72 horas. Obtención de datos y análisis estadístico descriptivo por Dra. Tatiana Jiménez

9.2 Caracterización de los esferoides

La formación de los esferoides tridimensionales de células DPSCs se evaluó a las 72 horas posteriores a la generación del cultivo en condiciones de baja adherencia. Los esferoides se cultivaron durante 72h antes del primer cambio de medio para permitir la formación de la matriz extracelular y la compactación. El análisis de imágenes mostró que las DPSCs forman esferoides homogéneos y regulares. En la figura 2 se muestran las imágenes más representativas de los esferoides antes del tratamiento y sus respectivas segmentaciones

realizadas por el software de análisis AnaSP. Estos esferoides fueron generados partiendo de 10.000 células cultivadas en medio DMEM suplementado al 10 % de SFB.

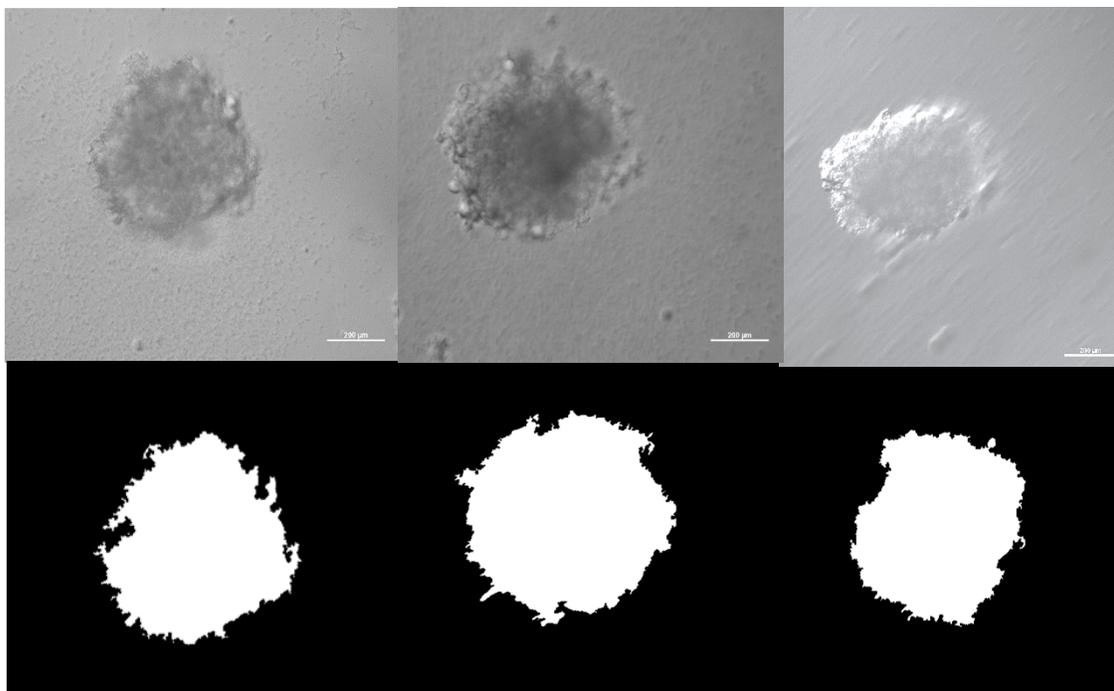


Figura 2. Esferoides tridimensionales de DPSCs y sus respectivas segmentaciones. Imágenes obtenidas a las 72 horas de generación del cultivo tridimensional tipo esferoide de células DPSCs utilizando el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Barra de escala 200 μ M y sus respectivas segmentaciones con el software AnaSP. Se muestra una imagen representativa de cada grupo antes del tratamiento. Fotos realizadas por la Dra Angela Fonseca-Grupo Inmubo

9.3 Estimación de los cambios en los parámetros morfológicos postratamiento

Para el análisis de los parámetros morfológicos se midieron un total de 21 esferoides. El índice de circularidad permitió establecer que la mayoría de los esferoides varió entre 0.6 y 0.9 indicando círculos casi perfectos, sin presentar diferencias entre los esferoides tratados con NAC y sin tratar (figura 3A). El índice de esfericidad para todos los esferoides tratados y no tratados osciló entre 0.45 y 0.56, sin evidenciarse cambios significativos por el tratamiento de los esferoides de DPSCs con NAC (Figura 3B). Con respecto a la solidez (SLD)

los datos se encontraron entre 0.66 y 0.89 SLD en ambos grupos de esferoides (tratados y sin tratar) sin presentarse diferencias significativas (Figura 3C). Las mediciones de perímetro variaron notoriamente entre los esferoides sin tratar versus los tratados, el de los esferoides sin tratar fue de 5735,61 μm (media) mientras que los esferoides tratados con NAC por 72h incrementaron su perímetro a 7061,5 μm (media). Por otra parte, el área de los esferoides también presentaron diferencias notorias, incrementando su área en el grupo de los esferoides tratados con NAC versus los no tratados (figura 3E), evento que ocurre de similar forma con el volumen (Figura 3F). Todas las mediciones iniciales se realizaron a 72 horas posterior a la generación del cultivo 3D.

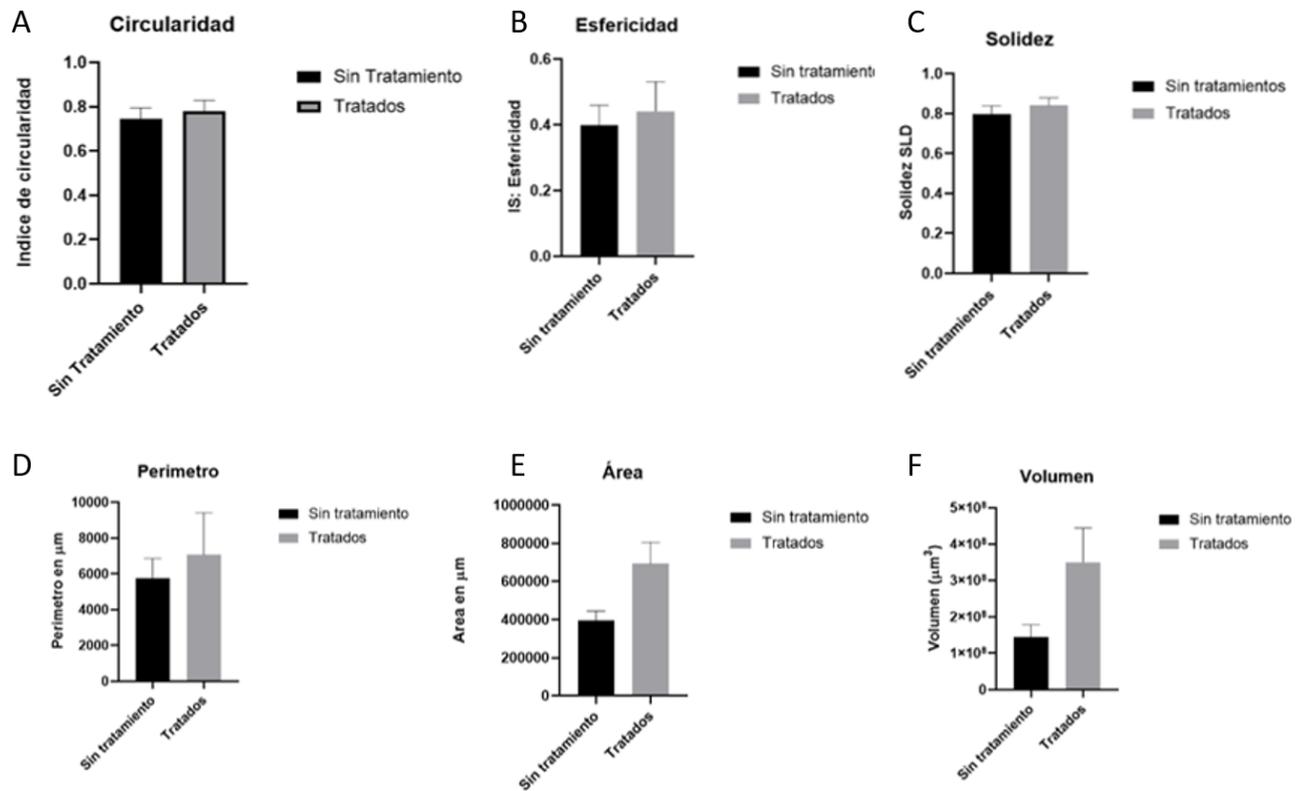


Figura 3. Parámetros morfológicos de los esferoides de DPSCs; comparación entre esferoides sin tratamiento y tratados con NAC a 1,83Mm. Los parámetros morfológicos de (A) Circularidad/Convexidad, (B) Esfericidad, (C) Solidez, (D) Perímetro, (E) Área y (F) Volumen se midieron a las 72 horas pretratamiento. Obtención de datos y análisis estadístico descriptivo por Dra. Tatiana Jiménez

Con respecto a los cambios observados en la reconstrucción tridimensional, los esferoides tratados con NAC mostraron modificaciones en la morfología relacionadas con el tamaño del esferoide en comparación con los esferoides no tratados a las 72h de tratamiento con NAC, los esferoides control mantienen su morfología sin cambios evidentes (figura 4). Resultados que coinciden con los obtenidos en la estimación de los parámetros morfológicos postratamiento, específicamente con área, volumen y perímetro. Al realizar el análisis de cambios morfológicos en las reconstrucciones tridimensionales de los esferoides pretratado y tratados con NAC, también se evidencia cambios relacionados con el tamaño incrementándose al tratamiento con NAC (figura 5).

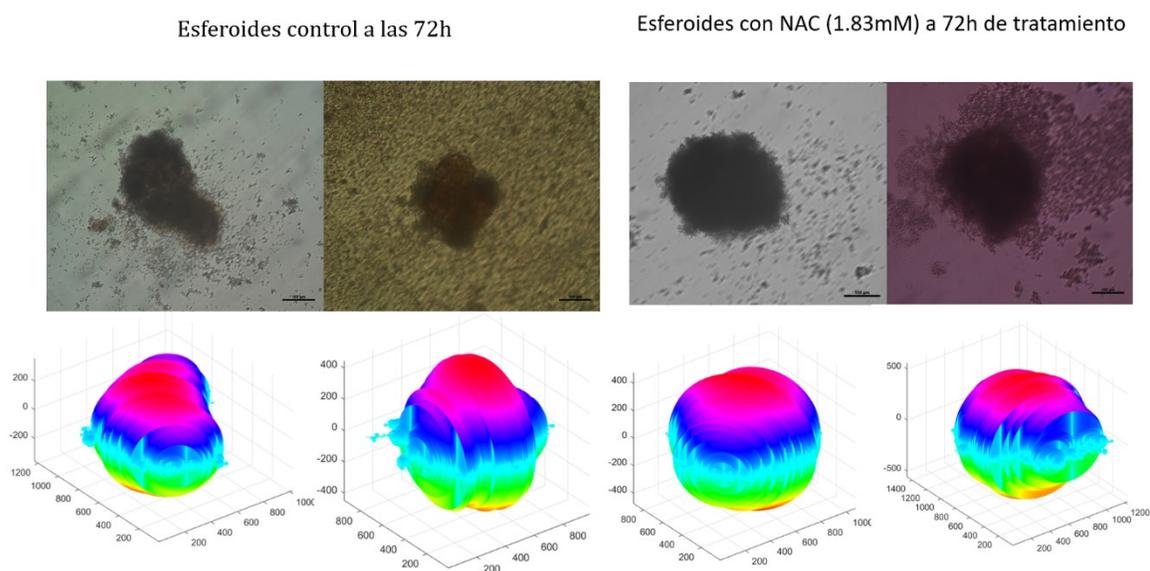


Figura 4. Esferoides tridimensionales de DPSCs y su respectiva reconstrucción 3D; comparación morfológicas con los esferoides controles a las 72h con los esferoides tratados con NAC A 1,83Mm a las 72h. Se muestran algunas de las imágenes más representativas de los esferoides. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Barra de escala 200 μ M. Adicionalmente, se observa la reconstrucción tridimensional realizada con el software ReViSP. Tenga en cuenta que la densidad de color muestra esquemáticamente la localización de los vóxeles dentro de la figura tridimensional. Fotos realizadas por la Dra

Angela Fonseca-Grupo Inmubo, reconstrucciones tridimensionales obtenidas por Dra.
Tatiana Jiménez

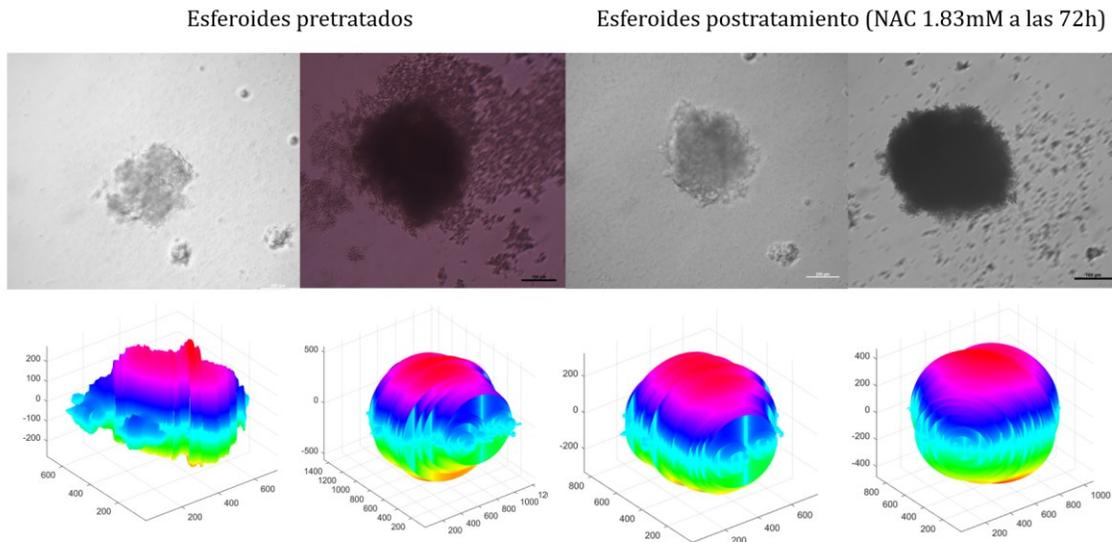


Figura 5. Esferoides tridimensionales de DPSCs y su respectiva reconstrucción 3D pre y postratamiento. Se muestran algunas de las imágenes más representativas de los esferoides antes y después de los tratamientos con NAC a 1.83mM a 72 horas. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Barra de escala 200 μ M. Adicionalmente, se observa la reconstrucción tridimensional realizada con el software ReViSP. Tenga en cuenta que la densidad de color muestra esquemáticamente la localización de los vóxeles dentro de la figura tridimensional. Fotos realizadas por la Dra Angela Fonseca-Grupo Inmubo, reconstrucciones tridimensionales obtenidas por Dra. Tatiana Jiménez

10. Discusión

La terapia pulpar vital (TPV) es un tratamiento conservador que implica la eliminación de irritantes locales y posteriormente emplear un material protector directa o indirectamente sobre la pulpa, cuyo principal objetivo es mantener el tejido pulpar sano (Ghoddusi et al., 2013). Como se conoce hasta la actualidad, existe una población de células madre que se encuentran en el tejido pulpar que después de una TPV implica su migración al sitio de la lesión y diferenciación a odontoblastos secundarios, seguido de un proceso de dentinogénesis y formación de un puente dentinario sellado sobre la pulpa expuesta (Omidi et al., 2020). En los últimos años con los avances en enfoques moleculares y regenerativos en endodoncia, se sabe que la regeneración del complejo pulpo-dentinal después de una TPV podría verse afectada por las propiedades biológicas de los materiales usados (Kearney et al., 2018; Omidi et al., 2020). Por lo tanto, se hace necesario estudiar nuevos materiales o fármacos dirigidos a los procesos de regeneración pulpar, que eviten la necesidad de un tratamiento endodóntico involucrando la pulpectomía total. Una posible solución es emplear la N-acetilcisteína (NAC).

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un compuesto de aminotiol que puede actuar como precursor del glutatión reducido y como eliminador de especies reactivas directas de oxígeno (ROS), regulando la capacidad antioxidante de las células y previniendo el daño oxidativo, un papel importante cuando se considera la expansión *in vitro* de DPSCs.

Se ha demostrado que NAC aumenta la tasa proliferativa de MSC aisladas de médula ósea y tejido adiposo, sin signos de envejecimiento celular, al tiempo que preserva la capacidad de diferenciación de las células (Lin et al., 2005; Wang et al., 2008). Por el contrario, la NAC inhibía la proliferación de fibroblastos y células epiteliales de la mucosa de la cavidad oral de forma dependiente de la dosis (Sato et al., 2009). Por lo tanto, para obtener un efecto deseable, es decir, la estimulación del crecimiento celular, se deben probar diferentes concentraciones de NAC para un tipo de célula específico. Con respecto a la pulpa dental, la

NAC incorporada en resinas compuestas evitó la muerte y restauró el crecimiento de las DPSCs *in vitro* cuando esas resinas se utilizaron como superficie de crecimiento (Kojima et al., 2008). NAC también inhibió la apoptosis y promovió *la diferenciación osteogénica in vitro* de células de pulpa dental humana y de rata adulta mediante el aumento de genes clave de diferenciación (Paranjpe, Cacalano, Hume y Jewett, 2007). Según nuestro conocimiento, nunca se ha evaluado el efecto de la NAC sobre las células madre que se originan en la pulpa dental.

En este estudio se realizó un ensayo de citotoxicidad de NAC sobre células DPSCs en cultivo monocapa con el objetivo de determinar las IC50 y así emplear la concentración requerida de NAC para estimular la viabilidad y proliferación celular. Las concentraciones evaluadas fueron 0.1, 0.5, 1, 1.83, 2.5 y 3mM en 2 tiempos diferentes 48 y 72h. En los resultados obtenidos se evidencia que a las 48h la IC50 fue de 2.9 y a las 72h de 1.53, al obtener estos resultados la concentración que se escogió para evaluar el efecto de NAC sobre los esferoides fue de 1.83mM dado que en este modelo experimental al tener una configuración 3D como el tejido pulpar se hacen más resistentes a los fármacos, además se tuvo en consideración que la presentación de NAC en ampolla lista para uso clínico tiene esta concentración (1.83mM), lo que brindaría mayor practicidad para su uso en la práctica clínica endodóntica.

En la curva dosis-respuesta de NAC sobre células DPSCs cultivadas en monocapa, se evidencia que en ambos tiempos la concentración de NAC de 1.83mM fue la que menor viabilidad y proliferación celular promovió. Se observa además que las concentraciones más bajas de NAC (0.5mM y 0.1mM) fueron las que promovieron mayormente la viabilidad y proliferación con respecto a las células sin tratar en los 2 tiempos evaluados. Nuestra hipótesis es que a mayor tiempo de tratamiento, mayor es la viabilidad y la proliferación celular, por lo que se requiere más investigaciones sobre estas variables. Estos resultados coinciden con los reportados por Debeljak Martacic et al., (2016); en su estudio ellos evaluaron diferentes concentraciones de NAC (0,1 mM, 1,0 mM, 2,0 mM) sobre DPSCs en cultivo monocapa evaluando células senescentes, apoptosis, viabilidad y proliferación celular. Ellos reportaron que la concentración más baja de NAC (0,1mM) estimuló la proliferación celular, mientras que la más alta (2mM) la inhibió. La concentración de 0.1mM de NAC estimuló la entrada de las

DPSCs a fase S de ciclo celular y ejerció un efecto positivo significativo sobre la defensa antioxidante de las DPSCs (Debeljak Martacic et al.,2016).

Los cultivos monocapa (2D) se emplean convencionalmente en pruebas de candidatos a fármacos *in vitro*, sin embargo este modelo experimental presenta algunas limitaciones tales como; la falta de señalización célula-célula y célula-matriz extracelular que ocurre en el entorno *in vivo* 3D (esferoides multicelulares tridimensionales) donde tales señales son esenciales para la diferenciación, proliferación y una variedad de funciones celulares (Breslin & O'Driscoll, 2013). Por ejemplo, las integrinas, que son receptores de la superficie celular, anclan las células a la MEC y también participan en la interpretación celular de las señales bioquímicas de su entorno local. Es probable, por lo tanto, que los ensayos celulares en 3D sean más análogos y, por lo tanto, más predictivos de eventos *in vivo* en comparación con cultivos en 2D más simplificados en los que las vías de señalización esenciales pueden haberse perdido o, al menos, comprometido, por esta razón evaluamos el efecto de NAC sobre esferoides de DPSCs después de realizar el ensayo preliminar de citotoxicidad en cultivo monocapa.

Los resultados obtenidos de los efectos de la NAC sobre los esferoides de DPSCs a una concentración de 1.83mM distan de los resultados obtenidos en cultivo monocapa, en estos últimos esta concentración disminuye la viabilidad y proliferación celular, según nuestros resultados y los reportados en el estudio de Martacic et al (2016). Por el contrario, los resultados obtenidos al realizar la estimación de cambios en los parámetros morfológicos postratamiento con NAC (1.83mM) sobre los esferoides a las 72h, se encontró que hubo cambios significativos en área, perímetro y volumen de los esferoides tratados con NAC versus los controles (esferoides sin tratamiento) a las 72h, además al comparar estos parámetros antes del tratamiento y postratamiento en los mismos esferoides, se evidenció que el área, el perímetro y el volumen habían incrementado, esto nos permite inferir que esta concentración de NAC (1.83mM) promovió la proliferación de las DPSCs, no obstante, se hace necesario realizar más adelante ensayos de viabilidad y proliferación con diferentes concentraciones sobre este modelo experimental. Estos resultados no pudieron ser

comparados con otros estudios dado que en la actualidad aun no existen estudios que hayan evaluado el efecto de NAC sobre esferoides de DPSCs para determinar la concentración ideal de NAC para ser empleada como fármaco en la TPV.

Se recomienda realizar este mismo estudio con concentraciones más bajas para poder comparar estos resultados, además es ideal confirmar con ensayos de viabilidad y proliferación si NAC a 1.83mM promueven la viabilidad y proliferación celular, además de incluir otras variables de estudio como la diferenciación celular hacia lineaje odontogénico dado que se requiere para que se dé una TPV con éxito.

10. Conclusiones

- Las células crecen naturalmente en un entorno 3D. La disposición espacial de las células dentro de este entorno, incluido la MEC, afecta la forma en que interactúan entre sí y con su microentorno. A su vez, estas señales afectan la proliferación, la diferenciación, la morfología y una variedad de funciones celulares, por lo tanto, método de crecimiento celular más natural que imita el tejido para aplicaciones de descubrimiento y estudios de fármacos es el 3D. Esto se demuestra con la diferencia en los resultados obtenidos entre cultivo monocapa (2D) y en esferoides de DPSCs .
- La concentración de NAC a 1.83mM estimuló la viabilidad y proliferación celular de las DPSCs en los esferoides a las 72h, sin embargo es necesario evaluar más concentraciones para compararlas entre sí en tiempos de estudios más prolongados.
- Se recomienda estudiar otras variables tales como diferenciación celular, es imprescindible para que se de una TPV con éxito.
- Este es el primer estudio que evalúa a la NAC como fármaco candidato para emplear en TPV con el modelo experimental en esferoides de DPSCs evaluando viabilidad y proliferación celular, abriendo una nuevo campo de estudio en endodoncia.

10. Referencias

1. Angela Fonseca-Benitez, Sandra Johanna Morantes Medina, Diego Ballesteros-Vivas, Fabian Parada-Alfonso y and Sandra J Perdomo. Passiflora mollissima Seed Extract Induced Antiproliferative and Cytotoxic Effects on CAL 27 Spheroids. *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2022; 2022:4602413 [15 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9174002/>
2. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discov today* 2013; 18(5-6):240-249
3. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Álvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J* 2017 50:e19–30
4. Debeljak Martacic J, Borozan S, Radovanovic A, Popadic D, Mojsilovic S, Vucic V, et al. N-Acetyl-l-cysteine enhances ex-vivo amplification of deciduous teeth dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol* 2016; 70:32–38
5. Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iran Endo J* 2013; 9(3):15–22
6. Jeanneau C, Laurent P, Rombouts C, Giraud T, About I. Light-cured Tricalcium Silicate Toxicity to the Dental Pulp. *J Endod* 2017; 43(12):2074–80
7. Kan Yeung AW, Tzvetkov NT, El-Tawil OS, Bungău SG, Abdel-Daim MM, Atanasov AG. Antioxidants: Scientific literature landscape analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 8278454 [11 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6341248/>
8. Kaufman G, Skrtic D. N-Acetyl Cysteine Modulates the Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Rescued Growth-Arrested Dental Pulp Microtissues Exposed to TEGDMA in ECM. *Int J Mol Sci* 2020; 21(19):7318 [21 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7582816/>
9. Kearney M, Cooper PR, Smith AJ, Duncan HF. Epigenetic approaches to the treatment of dental pulp inflammation and repair: Opportunities and obstacles. *Front Genet* 2018; 9: [18 pantallas] Disponible en:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00311/full>

10. Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, et al. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent Mater* 2008; 24(12):1686–1693
11. Komada Y, Yamane T, Kadota D, Isono K, Takakura N, Hayashi S-I, et al. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. *PLoS ONE* 7(11): e46436 [13 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504117/>
12. Küçükkaya S, Görduysus MÖ, Zeybek ND, Müftüoğlu SF. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-Based Endodontic Cement as Root-End Filling Materials. *Scientifica (Cairo)* [serial online] 2016: [5 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745895/>
13. Lin T.M, Tsai J.L, Lin S.D, Lai C.S, Chang C.C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005; 14(1):92-102
14. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Sulphur-containing non enzymatic antioxidants: Therapeutic tools against cancer. *Front Biosci - Sch* 2012; 4(2):722–48
15. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell j* 2017; 19(1):11-17
16. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol* 2016; 54(4):322–32.
17. Mozayeni MA, Milani AS, Marvasti LA, Asgary S. Cytotoxicity of calcium enriched mixture cement compared with mineral trioxide aggregate and intermediate restorative material. *Aust Endod J* 2012; 38(2):70–75
18. Omid S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2020; 23(6):768–75

19. Pei Y, Liu H, Yang Y, Yang Y, Jiao Y, Tay FR, et al. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: Progress and prospects. *Oxid Med Cell Longev* 2018 [serial online] 2018 [14 pantallas]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937417/>
20. Piccinini F. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Comput Methods Programs Biomed* 2015; 119(1):43-52
21. Pinar Karapinar S, Ulum YZA, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol* 2016; 68:48–54.
22. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014; 141(2):150–159.
23. Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: Pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD* 2014; 11(6): 705–717
24. Sato N, Ueno T, Kubo K, Suzuki T, Tsukimura N, Att W, et al. N-Acetyl cysteine (NAC) inhibits proliferation, collagen gene transcription, and redox stress in rat palatal mucosal cells. *Dent Mater* 2009; 25(12):15-32
25. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018; 51(3):284-317
26. Wang K.H, Kao A.P, Wangchen H, Wang F.Y, Chang C.H, Chang C.C *et al.* Optimizing proliferation and characterization of multipotent stem cells from porcine adipose tissue. *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 51 (4):159-166
27. Ware MJ, Keshishian V, Law JJ, Ho JC, Favela CA, Rees P, Smith B, Mohammad S, Hwang RF, Rajapakshe K, Coarfa C. Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials* 2016; 108:129-42
28. Zanoni M, Pignatta S, Arienti C, Bonafè M, Tesei A. Anticancer drug discovery using

multicellular tumor spheroid models. *Expert Opin Drug Discov* 2019; 14(3):289-301.