EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCI) SOBRE LA VIABILIDAD Y GENES DE AUTO-RENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS STEM DE LA PAPILA APICAL (SCAP)

PAOLA ANDREA ESCOBAR VILLEGAS

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA - MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
BOGOTÁ – FEBRERO 2019

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Maestría en Ciencias Odontológicas
Título:	Efecto del ácido hipocloroso (HOCl) sobre la viabilidad y genes de auto-renovación y pluripotencia de células stem de la papila apical (SCAP)
Grupo de investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral - UIBO
Línea de investigación:	Regeneracion Tisular & Células Stem en Odontología
Institución/Instituciones participante/s:	Universidad El Bosque
Tipo de investigación:	Maestría
Directora:	Dra. SANDRA PERDOMO Biol, PhD Ciencias Biológicas
Codirector:	Dr. JUAN CARLOS MUNÉVAR Od, MSc Ciencias biológicas y biomédicas. MSc Biología Osea y Biomateriales de Reemplazo. Especialización en Biología Oral. Especialización en Bioética. Especialización en Docencia Universitaria
Estudiante:	PAOLA ANDREA ESCOBAR VILLEGAS Od, Endodoncista
Asesora metodológica:	Dra. GLORIA INÉS LAFAURIE Od, Especialista en Periodoncia, MS Epidemiología

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MARIA CONSUELO ROMERO SANCHÉZ	Director(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas
SERGIO MARINO VIÁFARA GARCIA	Coordinador(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a:

Mi esposo: Por haber sido mi apoyo de principio a fin en este proceso y por ser siempre un ejemplo de positivismo, dedicación, esfuerzo y perseverancia.

Mis padres: Por la educación que me han brindado, los valores que me han inculcado, por su apoyo incondicional, su paciencia, por estar siempre a mi lado, por sus consejos y palabras de aliento cuando más las necesité.

UNICOC: Por haberme brindado el respaldo en este proceso de formación.

La Doctora Gloria Lafaurie: Por su apoyo, por transmitirme su confianza en mis capacidades y por la orientación que me proporcionó.

Doctora Sandra Perdomo y Doctor Juan Carlos Munévar: Por su paciencia, dedicación y apoyo en este proceso.

Aquilabs y el Instituto UIBO: Por el apoyo para llevar a cabo los experimentos requeridos en este trabajo de investigación.

“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”.

RESUMEN

EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) SOBRE LA VIABILIDAD Y GENES DE AUTO-RENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS STEM DE LA PAPILA APICAL (SCAP)

Antecedentes: Los irrigantes utilizados en endodoncia regenerativa deben promover la supervivencia, proliferación y diferenciación de células stem de la papila apical (SCAP). Las sustancias utilizadas hasta el momento han demostrado ser citotóxicas. El ácido hipocloroso (HOCl) es una solución antimicrobiana no antibiótica que estimula la proliferación celular y existe poca información relacionada con su acción sobre SCAP.
Objetivo: Evaluar el efecto del HOCl sobre la viabilidad y estabilidad fenotípica pluripotencial de las SCAP.
Métodos: Se realizó obtención y caracterización de SCAP, y se determinó la concentración letal 50(CL50) del HOCl. Se evaluó el efecto sobre el ciclo celular por citometría de flujo y expresión de genes asociados a mineralización con RT-PCR, utilizando concentraciones de 143µM, 95µM y 48µM de HOCl a 1, 15 y 30 minutos de exposición. Con PCRarray se determinó la expresión de 84 genes de autorenovación y pluripotencia en SCAP expuestas a 143µM de HOCl durante 1 y 15 min. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático con STRING V10.5.
Resultados: La CL50 fue 133µM(~70 ppm). Los hallazgos sugieren que el HOCl podría desencadenar una activación metabólica sobre las células, posiblemente induciéndolas hacia la mitosis. El HOCl a 143µM durante 1 y 15 min produjo sobreexpresión de OSX, DSPP y DMP-1, y tendencia a expresión a la baja de RUNX2 en los tres tiempos. El PCRarray evidenció una sobreexpresión de 9 genes en SCAP tratadas con HOCl a 143µM durante 1 minuto y de 26 genes en células sometidas a 15 min. Este último grupo mostró los mayores aumentos en la expresión de genes asociados a diferenciación, cuatro de ellos relacionados con odontogénesis (BMP4, CTNNB1, FGF10, ITGA6). Con STRING se evidenció relación de genes sobreexpresados con ocho procesos biológicos asociados a morfogénesis, diez a proliferación, nueve a diferenciación y dos a odontogénesis. En ambos grupos, estos genes también se asociaron a cuatro vías de señalización involucradas en la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de células stem dentales: Vía de señalización PI3K-Akt, TGF-beta, MAPK y Wnt.
Conclusiones: El HOCl a 143µM favorece la viabilidad y estabilidad fenotípica pluripotencial de las SCAP, induciendo la expresión de genes asociados a diferenciación odontoblástica y dentinogénesis.

Palabras clave: Ácido hipocloroso, células stem adultas, perfilación de la expresión génica, raíz del diente/crecimiento & desarrollo, odontogénesis/genética

ABSTRACT

HYPOCLOROUS ACID (HOCL) EFFECT ON THE VIABILITY AND SELF-RENEWAL AND PLURIPOTENCE GENES OF STEM CELLS FROM THE APICAL PAPILLA (SCAP)

Background: The irrigants used in regenerative endodontics should stimulate the survival, proliferation and differentiation of stem cells of the apical papilla (SCAP). The substances used so far have been shown to be cytotoxic. Hypochlorous acid (HOCl) is an antimicrobial, non-antibiotic solution that stimulates cell proliferation; however, there is little information related to its action on SCAP.

Objective: To evaluate the effect of HOCl on the viability and pluripotential phenotypic stability of SCAP.

Methods: SCAP were isolated and characterized and the HOCl lethal concentration 50(LC50) was determined. The effect of 143µM, 95µM and 48µM HOCl concentrations at 1, 15 and 30 minutes of exposure on the cell cycle was evaluated by flow cytometry, also the mineralization gene expression by RT-PCR. By means of PCR array, the expression of 84 self-renewal and pluripotency genes in SCAP exposed to 143 µM of HOCl for 1 and 15 minutes was determined. Bioinformatics analysis of data were performed with STRING V10.5.

Results: The HOCl LC50 was 133µM(~70 ppm). The findings suggest that HOCl treatment could generate cell metabolic activation, possibly leading them towards mitosis. 143µM HOCl *in vitro* exposure for 1 and 15 minutes generated an OSX, DSPP and DMP-1 overexpression in SCAP, and a tendency to RUNX2 down expression in all the times evaluated. The PCR array showed 9 SCAP genes overexpression by 143µM HOCl *in vitro* exposure for 1 minute and 26 genes during 15 minutes. The major differentiation gene expression increase was observed in this last group; four of them related to odontogénesis (BMP4, CTNNB1, FGF10, ITGA6). A relationship of overexpressed genes with eight biological processes associated with morphogenesis, ten with proliferation, nine with differentiation and two with odontogenesis was demonstrated by STRING analysis. In both groups, these genes were also associated with four signaling pathways involved in the regulation of the formation, homeostasis and differentiation of dental stem: PI3K-Akt, TGFβ, MAPK and Wnt signaling pathways.

Conclusions: The SCAP viability and pluripotential phenotypic stability were promoted by 143µM HOCl, stimulating odontoblastic differentiation and dentinogenesis gene expression.

Keywords: Hypochlorous acid, adult stem cells, gene expression profiling, tooth root/growth & development, odontogenesis/genetics

GUIA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN _____ *1*

1. MARCO TEÓRICO _____ *3*

1.1 Celulas Stem Mesenquimales (MSC) _____ 4

1.2 Endodoncia Regenerativa _____ 9

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____ 18

3. JUSTIFICACIÓN _____ 21

4. SITUACIÓN ACTUAL _____ *23*

5. OBJETIVOS _____ *27*

5.1 Objetivo general _____ 27

5.2 Objetivos específicos _____ 27

6. 6. METODOLOGÍA _____ *28*

6.1 Tipo de estudio _____ 28

6.2 Población y muestra _____ 28

6.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información _____ 29

6.4 Hipótesis de estudio _____ 40

6.5 Plan de tabulación y análisis _____ 40

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS _____ *42*

7.1 Sustento legal _____ 42

7.2 Consentimiento y asentimiento informado _____ 42

8. RESULTADOS _____ *43*

8.1 Caracterización de células stem mesenquimales de papila apical _____ 43

8.2 Evaluación de la citotoxicidad del tratamiento con HOCl en las SCAP _____ 47

8.3 Evaluación del tratamiento con HOCl sobre el ciclo celular de las SCAP _____ 49

8.4 Evaluación del efecto del ácido hipocloroso sobre los núcleos de las SCAP __ 53

8.5 Análisis de la actividad transcripcional de genes de autorenovación y pluripotencia de las SCAP en presencia del HOCl 55

8.6 Análisis de datos con STRING: Construcción de la red génica de asociaciones 65

8.7 Tinción Von Kossa 95

9. DISCUSION 96

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 110

11. LIMITACIONES 111

BIBLIOGRAFÍA 112

ANEXOS 123

Anexo 1 Aval del comité de ética 123

Anexo 2: Consentimiento y Asentimiento informado 124

Anexo 3: Mapa de distribución del RT2 Profiler PCR Array 131

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a diferenciación osteogénica..... 37
Tabla 2. Genes marcadores de Stemness en el PCR Array de QIAGEN®..... 38
Tabla 3. Resultados de las lecturas de absorbancia para establecer el tiempo de doblaje poblacional. 45
Tabla 4. Resultados obtenidos del modelo de regresión lineal para el método de resazurina 47
Tabla 5. Porcentajes de SCAP en las fases de ciclo celular G_0/G_1, S y G_2/M tratadas con HOCl a las concentraciones y tiempos evaluados. 50
Tabla 6. Resultados análisis ciclo celular, modelo mixto de medidas repetidas..... 51
Tabla 7. Expresión de nueve genes de SCAP por qPCR..... 57
Tabla 8. Resultados análisis de expresión génica (RT-PCR), modelo mixto lineal de medidas repetidas..... 59
Tabla 9. Resultados análisis de expresión génica en las diferentes concentraciones y tiempos evaluados, modelo mixto lineal de medidas repetidas 59
Tabla 10. Cambios en la expresión de genes en las SCAP tratadas con HOCl 75 ppm por 1min 63
Tabla 11 Cambios en la expresión de genes en las SCAP tratadas con HOCl 75 ppm por 15 min 64
Tabla 12. Genes sobreexpresados y expresados a la baja en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos..... 65
Tabla 13. Resultados obtenidos en el programa STRING durante el análisis de los genes sobre expresados y con baja expresión de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos 66
Tabla 14. Descripción de los genes sobreexpresados en SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 15 minutos, relacionados con procesos biológicos de morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogenesis..... 69
Tabla 15. Descripción de los genes con expresión a la baja en SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 15 minutos, relacionados con procesos biológicos de morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogénesis..... 75

Tabla 16. Procesos biológicos relacionados con morfogénesis, asociados a los genes sobreexpresados y expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos 81
Tabla 17. Procesos biológicos relacionados con proliferación, asociados a los genes sobreexpresados y expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos 85
Tabla 18. Interacciones de los genes sobreexpresados (**A** y **B**) y expresados a la baja (**C** y **D**) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación 88
Tabla 19. Procesos biológicos relacionados con odontogénesis, asociados a los genes sobreexpresados y con baja expresión en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos 90
Tabla 20. Vías de señalización KEGG relacionadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta, asociadas a la expresión génica de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dientes de donde se obtuvieron las papilas apicales para la estandarización del cultivo. 30
Figura 2. Microfotografía de las SCAP 43
Figura 3. Unidades formadoras de colonias (UFC). Fotografías con microscopio invertido de las SCAP. Se observa morfología fibroblastoide y unidades formadoras de colonia (UFC), características de las células stem mesenquimales 44
Figura 4. Fotografías de cultivo celular en monocapa. A) SCAP en la primera semana de cultivo, se observan células con morfología fibroblastoide. B) SCAP a la segunda semana de cultivo, se observa formación de la monocapa celular con un 90% de confluencia..... 44
Figura 5. Tiempo de doblaje poblacional..... 45
Figura 6. Histogramas de citometría de flujo de las SCAP. Se observan los porcentajes de expresión de las SCAP y de las DPSC. 46
Figura 7. Determinación del rango de linealidad de las SCAP a 24, 48 y 72 horas utilizando el método de resazurina 48
Figura 8. Evaluación de la actividad citotóxica del HOCl a pH 5,6 en las SCAP. A y B: Citotoxicidad del HOCl (CL50) pH 5.6 en ocho concentraciones 650ppm (1235µM), 500ppm (950µM), 250ppm (475µM), 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50 ppm (95µM) y 25ppm (48µM). C y D. CL50 del HOCl pH 5.6 a siete concentraciones 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50ppm (95µM), 25ppm (48µM), 12.5ppm (24µM), 7ppm (13µM) y 3 ppm (6µM). Cada línea corresponde a una réplica del experimento. 49
Figura 9. Análisis del efecto del HOCl sobre el contenido de ADN en SCAP evaluado por citometría de flujo. FaseG0/ G1 (Rojo), Fase G2/M (Amarillo) Fase S (Azul). A. SCAP tratadas con HOCl 25 ppm a 1 minuto de exposición. B. HOCl 25 ppm 15 minutos de exposición. C. HOCl 25 ppm 30 minutos de exposición. D. HOCl 50 ppm 1 minuto de exposición. E. HOCl 50 ppm 15 minutos de exposición. F. HOCl 50 ppm 30 minutos de exposición. G. HOCl 75 ppm 1 minuto de exposición. H. HOCl 75 ppm 15 minutos de exposición. I. HOCl 75 ppm 30 minutos de exposición. J. Control: células sin tratamiento. 52
Figura 10. Tinción DAPI - SCAP tratadas con HOCl 54
Figura 11. Expresión de nueve genes por qPCR en SCAP sometidas a tres concentraciones de HOCl durante 1, 15 y 30 minutos. **A.** 25 ppm de HOCl; **B.** 50 ppm de HOCl; **C.** 75 ppm de HOCl 60

Figura 12. Red de interacciones de los genes sobreexpresados (**A** y **B**) y expresados a la baja (**C** y **D**) en las SCAP expuestas al HOCl a 75 ppm durante 1 y 15 minutos 67
Figura 13. Interacciones de los genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos (A y B) y expresados a la baja (C y D), asociados a procesos biológicos relacionados con morfogénesis..... 82
Figura 14. Interacciones de los genes sobreexpresados (A y B) y expresados a la baja (C y D) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con proliferación 86
Figura 15. Interacciones de los genes sobreexpresados (A y B) y expresados a la baja (C y D) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación 89
Figura 16. Interacción de genes sobreexpresados y con expresión a la baja, asociados a procesos biológicos relacionados con odontogénesis en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto. **A.** Genes sobreexpresados. **B.** Genes con expresión a la baja 91
Figura 17. Interacción de genes sobreexpresados, asociados a procesos biológicos relacionados con odontogénesis en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos 91
Figura 18. Red de acciones moleculares ligadas a la expresión génica de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, y relación de los genes sobreexpresados y expresados a la baja con las vías KEGG asociadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta 94
Figura 19. Tinción Von Kossa de SCAP tratadas con HOCl a 25 ppm, 50 ppm y 75 ppm durante 1 y 15 minutos. 95

INTRODUCCIÓN

La infección endodóntica o un trauma físico de un diente permanente inmaduro pueden producir necrosis pulpar e interrupción del desarrollo dental (1). El tratamiento más recomendado en la actualidad para este tipo de casos es conocido como Endodoncia Regenerativa, debido a que ha demostrado beneficios frente a la apexificación y tiene como base los principios de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Este tratamiento se ha definido como aquellos procedimientos basados biológicamente y diseñados para reemplazar las estructuras dañadas, incluyendo la dentina y estructuras radiculares, así como las células del complejo dentinopulpar, favoreciendo de esta manera el continuo desarrollo radicular, cierre apical y el restablecimiento de la competencia inmunológica y sensorial pulpar (2).

Teniendo en cuenta la evidencia disponible en este campo, la Asociación Americana de Endodoncia y la Sociedad Europea de Endodoncia han propuesto unos protocolos para llevar a cabo el Procedimiento de Endodoncia Regenerativa (PER) (3). Los puntos clave para tener en cuenta durante la ejecución de este tratamiento son: 1) Mínima o ninguna instrumentación de los conductos radiculares, 2) Desinfección con irrigantes, 3) Aplicación de un medicamento intraconducto, 4) Inducción de sangrado que ingrese al conducto radicular y la creación de un coágulo de sangre, 5) Recubrimiento con un cemento de silicato, 6) Adecuado selle coronal (4).

Se ha demostrado que la hemorragia inducida de los tejidos periapicales durante el PER permite una afluencia significativa de células stem mesenquimales (MSCs) provenientes de la papila apical (SCAP), ligamento periodontal, hueso alveolar y tejidos periapicales inflamados, que podrían tener el potencial de favorecer la regeneración de la pulpa dental (5-7). En los dientes inmaduros, la papila apical representa una fuente importante de MSCs debido a que está en contacto directo con el ápice radicular, y las SCAP parecen ser el origen de odontoblastos primarios que son los responsables de la formación de la dentina radicular (8-11).

El equilibrio entre la desinfección y la creación de un microambiente intraconducto favorable para la proliferación de las SCAP en el conducto radicular, es de vital importancia para el éxito de las terapias endodónticas regenerativas. La presencia de un agente tóxico podría crear condiciones desfavorables para la supervivencia, migración, adherencia y proliferación de las células implicadas en los procesos de regeneración tisular. El hipoclorito de sodio (NaOCl) a pesar de ser irrigante más utilizado en endodoncia, no cumple con las propiedades físico químicas ideales que debe tener una solución irrigante para uso en terapias regenerativas pulpares, disminuye la

supervivencia celular y a altas concentraciones se ha observado que desnaturaliza los factores de crecimiento derivados de la dentina, los cuales son indispensables para la adherencia y diferenciación de MSCs (12).

Teniendo en cuenta que la elección de irrigantes y medicamentos intraconducto debe realizarse con base en su eficacia antimicrobiana y con el menor daño para las células stem y factores de crecimiento presentes en ese microambiente, han sido evaluadas otras sustancias como el ácido hipocloroso (HOCl) con el fin de establecer su efecto sobre las células. El HOCl es el componente activo del hipoclorito de sodio y no genera sus efectos adversos, ha demostrado ser biocompatible y tener un efecto antimicrobiano contra una amplia gama de microorganismos (13) .

Investigaciones previas han sugerido el uso del HOCl como agente antiplaca y para la cicatrización de heridas de la mucosa oral por su baja toxicidad, su efectividad antimicrobiana, capacidad antinflamatoria e inductora de la proliferación celular y en medicina, por sus antecedentes como sustancia de uso tópico para la desinfección de heridas (13-17). En el área de endodoncia regenerativa un estudio previo demostró que las células stem de pulpa dental presentaron mayor adherencia a las paredes del conducto radicular cuando se utilizó Aquatine (HOCl) con EDTA como irrigantes del conducto radicular(18) (19)

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del HOCl sobre las SCAP y se identificaron patrones de expresión de genes asociados con la viabilidad, pluripotencia, proliferación y autorenovación de estas células tratadas con HOCl. Esta información fue utilizada para construir una red de asociaciones de genes que permitió establecer los procesos biológicos que podrían favorecer los procedimientos de endodoncia regenerativa.

MARCO TEÓRICO

La infección endodóntica o trauma físico de un diente permanente inmaduro puede generar necrosis pulpar que conlleva a la interrupción del desarrollo dental, formación radicular incompleta, ápices abiertos, longitud radicular corta y paredes dentinales delgadas y frágiles (20,21). El protocolo clínico que era tradicionalmente utilizado para el tratamiento de dientes inmaduros con necrosis pulpar y conductos radiculares infectados denominado apexificación, consistía en aplicar hidróxido de calcio como medicamento intraconducto para eliminar en primer lugar, la infección intraradicular, e inducir una barrera apical. Sin embargo, este era un tratamiento que requería múltiples visitas y un período de tiempo prolongado antes de que se pudiera realizar la obturación del conducto radicular. Posteriormente surgió una nueva alternativa para llevar a cabo el proceso de apexificación que consistía en aplicar una matriz de Mineral Trióxido Agregado (MTA) en el tercio apical, el cual actuaba como una matriz artificial sobre la que se formaría la barrera de tejido duro, permitiendo al mismo tiempo realizar la posterior obturación del conducto radicular con gutapercha y cemento sellador, sin el riesgo de una extrusión del material hacia el periápice. Una de las ventajas de ese procedimiento es que se lleva a cabo en una o dos citas, sin embargo, las técnicas de apexificación ya sea con hidróxido de calcio o MTA, no permitían un desarrollo completo de la raíz, por lo tanto, existía un mayor riesgo de fractura como consecuencia de paredes dentinarias delgadas, pudiendo llegar a generar la pérdida prematura del diente (22).

Uno de los objetivos de la endodoncia es preservar la dentición en un estado fisiológicamente funcional para el mantenimiento de la salud oral y sistémica. Sin embargo, los procedimientos de endodoncia efectuados en los dientes inmaduros presentan desafíos en la limpieza y conformación, debido a que sus conductos son amplios y con ápices abiertos (1). Por lo tanto, un enfoque óptimo para el tratamiento de los dientes permanentes inmaduros con una pulpa necrótica sería lograr inducir la regeneración del tejido pulpar. Es así como la Asociación Dental Americana (ADA) en su publicación de Códigos de Procedimientos Dentales y Nomenclatura, año 2011 – 2012, implementó la “Regeneración pulpar” como un procedimiento de endodoncia, asignándole el código (D3354) (23,24). La endodoncia regenerativa se ha definido como aquellos procedimientos basados biológicamente, diseñados para reemplazar las estructuras dañadas, incluyendo la dentina y estructuras radiculares, así como las células del complejo dentinopulpar, favoreciendo de esta manera el continuo desarrollo radicular, cierre apical y el restablecimiento de la competencia inmunológica y sensorial pulpar (25). Por lo tanto, este procedimiento busca generar un aumento en el diámetro y longitud radicular, así como el cierre apical, realizando la inducción de un sangrado producido por la manipulación de la zona periapical, que al ingresar al

conducto radicular permita restaurar posteriormente la vitalidad de la pulpa dental en dientes permanentes inmaduros y jóvenes (26).

Múltiples estudios han empleado estrategias de ingeniería tisular destinadas a la reconstitución de un órgano dentino-pulpar funcional y al desarrollo de las raíces. Estos estudios se basan en el potencial de las células stem (progenitoras) que podrían participar en la regeneración dental (20). El primer elemento de la ingeniería de tejidos es una fuente de células capaces de diferenciarse en el componente de tejido deseado, que en el caso de regeneración pulpar serían las células stem provenientes de la papila apical principalmente, entre otras. El segundo elemento son los factores de crecimiento u otros mediadores inductores. Las células stem al exponerse a estímulos ambientales, tales como factores de crecimiento, matriz extracelular, la hipoxia u otras condiciones tienen la capacidad de diferenciarse en una serie de fenotipos de células en función de su linaje. Por lo tanto, el medio ambiente es un factor crítico en la regulación de la diferenciación celular. El tercer elemento de la ingeniería de tejidos es un andamio o matriz, el cual tiene un papel clave en la regulación de las células stem, así como en su diferenciación debido a la liberación local de factores de crecimiento, o por la activación de vías de señalización específicas cuando éstas se unen a la matriz extracelular (27).

1.1 Celulas Stem Mesenquimales (MSC)

Los progenitores mesenquimales son un grupo de células stem adultas que fueron caracterizadas por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide. En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células stem mesenquimales (MSC): Primero, éstas células deben ser adherentes en cultivo; segundo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, que son marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, las MSC deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Además de lo propuesto por ISCT, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células stem: Que las MSC realicen procesos de autorenovación, es decir, durante la división celular solo una de las células hijas debe iniciar programas de diferenciación celular, y que sean capaces de desarrollar “Plasticidad clonogénica” o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo (28,29).

Las células stem se pueden clasificar como pluripotenciales o multipotenciales. Las células stem pluripotentes tienen la capacidad de convertirse en células especializadas de cualquiera de los tres linajes embrionarios. Las células stem multipotentes también tienen la capacidad de diferenciación, pero sólo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario (30). Las células stem mesenquimales (MSCs) se derivan del mesodermo y están presentes en muchos tejidos postnatales y órganos. Han sido aisladas a partir de tejidos como médula ósea, tejido adiposo, periostio, sinovia, músculo esquelético, piel, vasos sanguíneos, células sanguíneas, ligamento periodontal, cordón umbilical y pulpa dental de dientes permanentes y deciduos. La terapia con células stem se ha ido desarrollando rápidamente como una estrategia para inducir la regeneración de tejidos u órganos en muchas enfermedades.

1.1.1 Regulación del fenotipo de células stem ("Stemness")

El mantenimiento de las células stem en un organismo adulto es esencial para la homeostasis tisular, así como para el inicio de la regeneración de los tejidos y la respuesta a injurias. El estado *"Stemness"* ha sido descrito como un patrón de expresión génica que es común entre todas las células stem, y hace referencia a su mantenimiento en un estado indiferenciado y multipotente (31) . Aunque existen ciertas características específicas y compartidas en todas las células stem como son su capacidad de autorrenovación y la generación de una progenie diferenciada, estas células pueden tener diversas demandas fisiológicas y por lo tanto, distintos programas moleculares asociados a los diversos microambientes o nichos celulares en los que se encuentren (32) .

Las células stem permanecen más frecuentemente en un estado quiescente, sin embargo, pueden desencadenarse procesos de autorenovación o diferenciación cuando son estimuladas por factores intrínsecos y/o extrínsecos. Los perfiles de expresión de genes y proteínas de las MSC difieren entre el estado indiferenciado y diferenciado de estas células (32).

1.1.2 Las células stem en regeneración pulpar

El objetivo de la terapia celular en medicina regenerativa es reemplazar, reparar o mejorar las funciones biológicas de los tejidos u órganos dañados irreversiblemente. Actualmente, las MSCs autólogas no presentan limitaciones éticas para ser utilizadas en estos procedimientos, siendo relativamente fácil obtener grandes cantidades de estas células y cuya ventaja es que poseen una gran capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación a múltiples linajes (33).

En los tejidos de la cavidad oral han sido identificadas diferentes poblaciones de células stem adultas, dentro de las cuales se incluyen las células stem de la papila apical (SCAP), células progenitoras periapicales inflamatorias (iPAPCs), células stem del folículo dental (DFSCs), células stem de la pulpa dental (DPSCs), células stem del ligamento periodontal (PDLSCs) , células stem de la médula ósea (BMSC), células progenitoras del germen dental (TGPCs), células stem de glándulas salivales (SGSCs), células stem de dientes deciduos exfoliados (SHEDs), células stem epiteliales orales (OESCs), células stem mesenquimales derivadas de tejido gingival (GMSCs) y células stem derivadas de periostio (PSCs). Aunque las células stem han sido identificadas en la mayoría de los tejidos orales, las que rodean la región periapical tienen mayor probabilidad de participar en procedimientos regenerativos endodónticos. Este tipo de células incluye las SCAP, PDLSCs, BMSCs y iPAPCs. Se incluyen también las DPSCs en aquellos casos en los cuales existe tejido pulpar vital remanente en la zona apical (2).

Las DPSCs son células multipotenciales que pueden obtenerse fácilmente de dientes permanentes extraídos y pueden ser cultivadas y expandidas de forma segura. Estas células son altamente proliferativas, tienen mayor potencial angiogénico, neurogénico y regenerativo comparado con las células stem de médula ósea y células stem adiposas debido a que tienen la capacidad de regenerar tejidos y órganos dañados o pérdidos, incluyendo la dentina, pulpa, tejido periodontal, hueso, tejido neuronal, vasos sanguíneos, músculo, cartílago, folículo piloso y córnea. Teniendo en cuenta lo anterior, estas células son una fuente alternativa de células stem para terapia celular, específicamente en patologías o malformaciones craneofaciales (33).

Cuando ocurre un daño grave a la pulpa dental por una agresión mecánica o exposición por caries, los odontoblastos ubicados por debajo de la zona de la injuria son frecuentemente lesionados de forma irreversible. Bajo estas circunstancias, las DPSCs tienen el potencial de diferenciarse en células tipo odontoblasto, capaces de sintetizar y secretar la matriz de dentina reparativa (34,35). Estudios previos han confirmado la capacidad que poseen las DPSCs de auto renovación, diferenciación a múltiples linajes y capacidad clonogénica, así como su potencial para

formar dentina asociada con tejido pulpar in vivo. Otros estudios, por medio de la evaluación de la expresión de ARNm de sialofosfoproteína dentinal (DSPP) y metaloproteínasas de la matriz 20 (MMP20), han confirmado la diferenciación de DPSCs en odontoblastos al ser estimuladas por proteínas morfogenéticas óseas (36).

Entre las diversas células stem postnatales, se encuentran las SCAP de la papila apical de los dientes permanentes inmaduros humanos, población celular que fue caracterizada inicialmente por Sonoyama *et al* en el 2006 y quien ha evaluado sus características físicas e histológicas (9,37,38). Las SCAP son un tipo de células stem mesenquimales derivadas de la cresta neural embrionaria con mayor capacidad odonto/osteogénica y dentinogénesis sobresaliente (38,39). Las SCAP expresan marcadores mesenquimales como CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 y CD146, pero no CD18, CD34, CD45 o CD150 (38).

La papila apical es un reservorio denso de MSCs indiferenciadas con gran capacidad proliferativa y de diferenciación odontogénica. Las SCAP son reguladas por la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS) a través de una serie de interacciones epitelio–mesenquimales complejas que dictan el desarrollo y forma de las raíces. La estrecha proximidad de la papila apical a los ápices de los dientes hace que esta fuente rica en células stem, esté fácilmente disponible para llevar a cabo procedimientos de regeneración endodóntica (2).

Es conocido que la papila dental participa en la formación del diente y posteriormente forma el complejo dentinopulpar. En dientes inmaduros, cuando las raíces están en desarrollo, la papila dental asume una posición apical al tejido pulpar y al diafragma epitelial (38), la papila apical posteriormente queda en contacto conel ápice radicular. En medio de la papila apical y la pulpa dental subyacente está presente una capa altamente poblada en células. La papila apical es menos celular y vascular en comparación con la papila dental, sin embargo las SCAP en comparación con las DPSCs han mostrado una tasa de proliferación 2 a 3 veces mayor. Por otro lado, se ha observado que las SCAP exhiben capacidades de diferenciación osteogénica, dentinogénica, adipogénica y neurogénica cuando se exponen a los respectivos estímulos (37).

No es claro como las SCAP pueden sobrevivir durante la periodontitis apical donde está presente una microflora compleja, mediadores inflamatorios, células inmunes y presumiblemente una baja tensión de oxígeno. La razón biológica de esta aparente supervivencia a pesar de las condiciones difíciles ha sido explicada por la relativamente baja densidad de vasos sanguíneos en la papila

apical en comparación con la pulpa dental adyacente, mientras que el folículo dental que rodea la papila apical es altamente vascularizado y puede actuar como un lecho capilar para suministrar nutrientes a las SCAP. Por lo tanto, parece que las SCAP pueden recibir nutrientes y el oxígeno a través de la difusión de los tejidos circundantes apicales tales como el folículo dental y posiblemente del tejido granulomatoso presente en la periodontitis apical, el cual es muy vascularizado. Adicionalmente, se ha demostrado que un entorno de hipoxia mejora la proliferación, supervivencia y potencial angiogénico de las células stem dentales (40,41).

Por otra parte, se ha observado efectos similares cuando las células stem dentales han sido expuestas a extractos de bacterias orales, que han mostrado tener un efecto positivo en la diferenciación celular de células stem humanas derivadas de pulpa dental (42). Debido a su capacidad antiinflamatoria, las SCAP pueden sobrevivir en situaciones inflamatorias y continuar desempeñando un papel crítico durante la regeneración de raíces en desarrollo, el cual se ha detenido por la presencia de patologías periapicales (39,43). Por lo tanto, parece que las SCAP y las células stem circundantes tienen la capacidad de sobrevivir y mantener su potencial de diferenciación en condiciones adversas como la periodontitis apical y abscesos apicales.

La papila apical representa un tejido precursor de la pulpa radicular. Debido a que las SCAP son derivadas de un tejido en desarrollo y no de un tejido maduro como las DPSC, se ha sugerido que ellas podrían representar una población menos comprometida de células stem, y considerarse unas células precursoras/progenitoras tempranas que podrían ser una fuente superior para la regeneración de tejidos. Las SCAP parecen ser la fuente de odontoblastos primarios, que son los responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las DPSC son la fuente de odontoblastos de reemplazo encargados de formar la dentina reparativa (8)

1.1.3 Diferenciación Osteoblastica/Odontoblastica de las MSC

La generación de células especializadas a partir de células stem es un proceso conocido como diferenciación y se desencadena a partir de procesos de señalización celular. Las señales internas son controladas por los genes, que, intercalados en largas cadenas de ADN, llevan instrucciones codificadas para todas las estructuras y funciones celulares. Las señales externas que promueven la diferenciación celular incluyen señales bioquímicas secretadas por otras células, contacto físico con células vecinas y moléculas del microambiente como la matriz extracelular (44).

La diferenciación de células stem en células secretoras de tipo odontoblástico es necesaria para la formación de dentina reparativa. Algunos genes que se han relacionado con la diferenciación odontoblástica de células stem mesenquimales son colágeno I (COL1) y fosfatasa alcalina (ALP) (marcadores de desarrollo temprano de odontoblastos), osteocalcina (OCN, marcador de desarrollo odontoblástico tardío), sialoproteina osea (BSP, actúa como un núcleo para la formación de los primeros cristales de apatita), sialofosfoproteína dentinal (DSPP) y proteína de la matriz dentinaria 1 – DMP1 (Marcadores asociados con dentinogenesis). Estudios previos han relacionado un aumento en la capacidad de diferenciación odonto/osteoblástica con el incremento de la actividad de la ALP, y una sobre expresión de marcadores odonto/osteoblásticos como ALP, Runx2, OSX, OCN y DSP *in vitro* (39,45). La ALP, Runx2, OSX y OCN son factores muy importantes involucrados tanto en la diferenciación osteogénica de fase temprana o tardía como en la odontogénesis (46).

El factor de transcripción Runx2 es necesario para la diferenciación de osteoblastos y odontoblastos y regula las expresiones de genes relacionados con tejido óseo y dientes. Runx2 determina el linaje hacia osteoblastos y odontoblastos de las MSCs. Se ha observado que las personas con mutaciones de este gen presentan desordenes dentales, dientes supernumerarios, erupción dental alterada e hipoplasia dental (46).

Osterix (OSX) es otro factor de transcripción de osteoblastos expresado en células mesenquimales dentales. Su patrón de expresión es similar al de RUNX2 en una etapa temprana del desarrollo dental. Pero a diferencia de la expresión RUNX2, las transcripciones OSX permanecen intensas en odontoblastos y células de pulpa dental en las últimas etapas (47). Se ha sugerido que OSX podría inducir la diferenciación celular y la expresión génica relacionada con las etapas posteriores del desarrollo dental mediante la regulación positiva de la expresión del gen DSPP y DMP (48)

1.2 Endodoncia Regenerativa

En casi todos los procedimientos de endodoncia regenerativa o revascularización en dientes humanos permanentes inmaduros con un diagnóstico clínico de necrosis pulpar se realiza

desinfección del conducto radicular, medicación intraconducto con una pasta triantibiótica y posteriormente se induce un sangrado en la zona periapical, el cual es provocado con el fin de incorporar células stem de los tejidos periapicales (SCAP) en el conducto radicular y formar un coágulo de fibrina que pueda actuar como una plataforma para la proliferación celular, que a su vez proporcione factores de crecimiento presentes en las plaquetas (49). Lovelace et al, 2011, demostraron que al inducir el sangrado a nivel de la papila apical se desencadena un flujo sangre que ingresa en el conducto radicular y éste tiene alrededor de 400 a 600 veces una mayor concentración de células stem mesenquimales que expresan los marcadores (CD73 y CD105) en comparación con las concentraciones de estas células circulantes en la sangre sistémica del paciente (7).

1.2.1 Irrigantes utilizados en Endodoncia Regenerativa

Para llevar a cabo una terapia endodóntica regenerativa, es necesario estimular la unión de las células stem a las paredes dentinarias del conducto radicular, sin embargo, la información con respecto a cómo afectan a estas células las diferentes soluciones de irrigación del conducto radicular es escasa al igual que el potencial efecto citotóxico de estas sustancias en la supervivencia de las SCAP.

Con respecto a la irrigación durante los procedimientos de endodoncia regenerativa, diversas sustancias han sido propuestas, entre ellos se encuentran:

1) Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 5,25% seguido por solución salina y clorhexidina (CHX) al 0,12%
2) NaOCl al 5,25% o 2,5%
3) NaOCl al 6% seguido de CHX al 2%
4) NaOCl 1.5%

El uso de estos irrigantes se basa en efectos bactericidas y bacteriostáticos conocidos, sin embargo, algunas de estas soluciones pueden ser citotoxicas para las células stem, como se ha demostrado para otros tipos de células tales como las células del ligamento periodontal humano, fibroblastos cultivados, células HeLa, y las células SHED (50).

El hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones desde 0,5% hasta 6% ha sido usado para la irrigación del conducto radicular en terapia pulpar regenerativa al igual que en la preparación convencional del conducto radicular, donde es el agente más utilizado por su potente actividad antimicrobiana y proteolítica, logrando disolver tejido orgánico. Concentraciones superiores incrementan este efecto antimicrobiano y proteolítico, así como también la toxicidad debido a que el NaOCl provoca una respuesta inflamatoria y daño grave al entrar en contacto con el tejido vital. Por otra parte, el NaOCl es incapaz de eliminar la capa de barrillo en la superficie de la dentina después de la preparación del conducto radicular, por lo que se han usado soluciones adicionales como agentes quelantes (EDTA) que tienen la capacidad de eliminar la capa de barrillo dentinario dejando una superficie dentinal limpia con túbulos dentinales abiertos una vez se ha realizado la instrumentación del conducto radicular (51).

A pesar de que el NaOCl es recomendado por la Asociación Americana de Endodoncia para la irrigación del conducto radicular, éste no está aprobado por la FDA debido a su alta toxicidad, es cáustico, existe el riesgo de enfisema en caso de extrusión y las reacciones alérgicas graves que puede sufrir el paciente. El uso generalizado del NaOCl como una solución irrigante en endodoncia puede explicarse por su bajo precio, excelente disolución del tejido pulpar y sus propiedades antimicrobianas.

Debido a que el éxito de cualquier procedimiento regenerativo es dependiente o está condicionado por la migración de las células stem residentes en la papila apical hacia el espacio del conducto radicular, la presencia de un agente tóxico y la capa de barrillo dentinario podrían crear condiciones desfavorables para la supervivencia, migración, adhesión y proliferación celular, lo que cuestiona el uso del NaOCl (51).

Para la preparación convencional del conducto radicular se usan soluciones adicionales como agentes quelantes (EDTA) que tienen la capacidad de eliminar la capa de barrillo dentinario dejando una superficie dentinal limpia con túbulos dentinales abiertos, propiedad que no tiene el hipoclorito de sodio (52) .

La descalcificación de la dentina que produce el EDTA conduce a la exposición de las fibrillas de colágeno de la matriz orgánica, favoreciendo la unión celular a través de receptores de tipo integrina. Adicionalmente, el tratamiento con EDTA expone factores de crecimiento atrapados en la matriz de dentina, incluyendo factor de crecimiento transformante β (TGF-β), proteína

morfogenética ósea-2 (BMP-2) y factores angiogénicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2). Se ha demostrado que estos factores estimulan la secreción de la matriz de dentina, la diferenciación odontoblástica y la formación de dentina terciaria (12,51).

Los protocolos de irrigación que incluyen EDTA al 17% parecen promover la supervivencia y adherencia de las SCAP a las paredes del conducto radicular. Se ha observado que el uso de protocolos de irrigación que contenían CHX al 2% fueron perjudiciales para las SCAP en modelos de estudio debido a que no observaron células viables. Por otro lado, la irrigación de NaOCl al 6% y EDTA ha mostrado una moderada disminución en la viabilidad celular en comparación con la irrigación con solo EDTA. El análisis de estos protocolos concluyó que algunos irrigantes pueden potencialmente afectar la supervivencia de las células stem ubicadas adyacente a las paredes de los conductos radiculares, posiblemente por mecanismos directos e indirectos (50).

1.2.1.1 Hipoclorito de Sodio

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es la solución irrigante más popular en endodoncia. El NaOCl se ioniza en agua en Na+ y el ión hipoclorito, OCl-, estableciendo un equilibrio con el ácido hipocloroso (HOCl). A pH ácido y neutro, el cloro existe principalmente como HOCl, mientras que, a pH mayores de 9, predomina el OCl. El ácido hipocloroso es el responsable de la actividad antibacterial, debido a que interrumpe varias funciones vitales de la célula microbiana, resultando en muerte celular. El NaOCl se utiliza comúnmente en concentraciones entre 0,5 % y 6 %. Es un potente agente antimicrobiano, debido a que elimina la mayoría de las bacterias al entrar en contacto directo con ellas. Adicionalmente disuelve de manera efectiva los restos de tejido pulpar y el colágeno, que son los principales componentes orgánicos de la dentina. Aunque el hipoclorito por sí solo no elimina la capa de barrillo dentinal, sí afecta su parte orgánica, haciendo posible su eliminación completa mediante la posterior irrigación con EDTA o ácido cítrico (CA) (52) .

Existe una variación considerable en la literatura sobre el efecto antibacteriano del NaOCl. En algunos artículos se ha sugerido que el hipoclorito requiere solo unos segundos para eliminar los microorganismos, incluso a bajas concentraciones, aunque otros informes han publicado tiempos considerablemente más largos para la eliminación de las mismas especies. La presencia de materia orgánica durante los experimentos tiene un gran efecto sobre la actividad antibacteriana

del NaOCl. Algunos estudios *in vivo* han demostrado que la presencia de materia orgánica (exudado inflamatorio, restos de tejido, biopelicula) debilitan el efecto del NaOCl. Por lo tanto, es indispensable la continua irrigación para la eficacia del hipoclorito.

Los puntos débiles del NaOCl incluyen el sabor desagradable, toxicidad y su incapacidad para eliminar la capa de barrillo dentinal por sí solo. La eficacia antimicrobiana limitada de NaOCl *in vivo* es causada probablemente por problemas en la penetración en las partes más periféricas del sistema de conducto radicular, tales como istmos, túbulos dentinales y conductos laterales.

Recientemente en estudios *in vitro* se ha demostrado que la exposición a largo plazo de la dentina a una alta concentración de hipoclorito de sodio puede tener un efecto perjudicial sobre su módulo de elasticidad y fuerza flexural, por lo anterior se ha planteado que la irrigación con hipoclorito en algunas situaciones puede aumentar el riesgo de fractura radicular vertical. Se ha observado que el uso de hipoclorito como irrigación final después del EDTA o CA produce una erosión severa de las paredes dentinales del conducto radicular (52).

1.2.1.2 EDTA 17%

La limpieza completa del sistema de conductos radiculares requiere el uso de irrigantes que disuelvan el material orgánico e inorgánico. El hipoclorito es efectivo eliminando la materia orgánica, pero se deben usar sustancias complementarias para la eliminación de la capa de barrillo dentinal. El EDTA disuelve eficazmente el material inorgánico, incluyendo hidroxiapatita, pero tiene poco o ningún efecto sobre el tejido orgánico y por sí solo no tiene efecto antibacteriano.

EL EDTA es más comúnmente utilizado como una solución al 17% neutralizada (EDTA disódico, pH 7), pero algunos informes han indicado que las soluciones con concentraciones más bajas (por ejemplo, 10%, 5%, e incluso 1%) remueven la capa de barrillo igual de bien después de la irrigación NaOCl. El EDTA se utiliza de 2 a 3 minutos al final de la instrumentación y después de la irrigación de NaOCl. La eliminación de la capa de barrillo por EDTA mejora el efecto antibacteriano de los agentes desinfectantes usados localmente en capas más profundas de dentina (52,53) (41, 42).

Los procedimientos de endodoncia regenerativa buscan reemplazar funcionalmente de forma predecible estructuras enfermas, dañadas o faltantes, incluyendo la dentina y estructuras radiculares, así como las células del complejo dentinopulpar, con tejidos vivos viables preferiblemente del mismo origen para lograr restaurar las funciones fisiológicas normales. Para llevar a cabo la terapia endodóntica regenerativa, es necesario estimular la adhesión de las DPSC o de otros tipos de células stem dentales a la dentina radicular después del tratamiento. La presencia de una capa residual (barro dentinario o smear layer) en las paredes del conducto radicular puede inhibir la adherencia de DPSCs implantadas, causando el fracaso del tratamiento de endodoncia regenerativa. La capa residual es una capa de aproximadamente 1 a 5 µm de diámetro, compuesta por residuos dentinales desnaturalizados producidos por la instrumentación del conducto radicular, procesos odontoblásticos, contaminantes inorgánicos no específicos y microorganismos (19) .

1.2.1.3 Acido Hipocloroso (HOCl)

Otro de los irrigantes que ha sido evaluado es el HOCl, el cual hace parte de un grupo de moléculas conocidas como aganócidos, es decir, sustancias antimicrobianas no antibióticas, biológicamente sintetizadas por Neutrófilos y macrófagos durante un proceso inmunológico conocido como estallido respiratorio, que ocurre como resultado del proceso de fagocitosis. El HOCl es un ión no disociado del cloro, dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos hipohalogenados más fuertes, es también uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados y es el responsable directo de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro. Químicamente el HOCl puede ser obtenido por diferentes métodos. Infortunadamente, la mayoría de los procedimientos obtienen soluciones de baja estabilidad, moderada actividad microbicida, con bajo porcentaje de ácido hipocloroso libre y mal toleradas por los tejidos en usos prolongados (16).

Los efectos del HOCl en los procesos de proliferación y regeneración de tejidos son diversos, pero igualmente controvertidos y pueden clasificarse en tres tipos: 1) Un efecto estimulante en la proliferación celular, durante traumatismos o daño a tejidos, mediado por el estímulo en la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1, FGF-2), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Igualmente, el HOCl presenta una

importante actividad oxidativa sobre el péptido del extremo N-terminal del TGF-β lo que facilita el acceso del HOCl al sitio activo de la molécula, resultando en la activación del factor, promoviendo proliferación y fibrosis. 2) Un efecto oxidativo que inhibe mediadores de inflamación; el HOCl puede inhibir las vías de señalización vinculadas con la expresión y traslocación de factores de transcripción (sensibles a oxidación no específica) como: Factor nuclear kB y proteína activadora AP-1 los cuales están asociados con la producción de citoquinas y proteínas mediadoras de inflamación (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-6, TNF-alfa, oxido nítrico y prostaglandina E2), quienes en exceso promueven procesos inflamatorios exacerbados y por consiguiente daño tisular (54) .

Se ha observado que el HOCl a concentraciones de 20 a 50uM, pueden inhibir el daño tisular ocasionado por metaloproteinasas (MMPs) e IL-8, posiblemente por su alta reactividad y capacidad de oxidación irreversible para grupos Tiol. Por otro lado, estudios desarrollados por Harper et al, en 2001, muestran que el HOCl tiene una importante actividad oxidativa sobre el glutatión, glutaredoxin y tioredoxin. Tioredoxin, modula la expresión de NF-kB a varios niveles. En el núcleo ayuda al NF kB a unirse al DNA y en el citosol puede activar cascadas de señalización asociadas a quinasas, dirigidas a la traslocación nuclear de NF kB (54,55).

En contraste al tioredoxin, el glutaredoxin incrementa la expresión y activación de NFkB y la proteína AP-1, por lo tanto, la oxidación de estas dos moléculas mediadas por HOCl, induce efectos antiinflamatorios por inhibición en la activación y traslocación de NFkB. 3) El HOCl tiene la capacidad de oxidar el aminoácido taurina (que se encuentra en concentraciones de 22 - 26 Mm en leucocitos humanos) e inducir la formación de clorotaurina la cual posee actividad antimicrobiana de amplio espectro y larga duración y es la principal responsable del efecto pos antibiótico del HOCl y tiene un importante efecto protector sobre los tejidos, ya que puede inactivar colagenasas de tipo VII, metaloproteinasas y proteinasas. Al igual que el HOCl puede interferir (en su forma de N-clorotaurina) con la traslocación de mediadores de inflamación, contribuyendo de esta forma con los procesos de protección tisular (54).

El Aquatine (Sterilox Dental's Aquatine Endodontic Cleanser, Aquatine EC, Sterilox, Puricore, Malvern, PA, USA) es una solución cuyo componente activo es el ácido hipocloroso (HOCl) y fue aprobado en agosto de 2006 en los EE.UU. por la FDA (Food and Drug Administration) para ser usado como irrigante en endodoncia. Ring et al en el 2008, realizaron un estudio para determinar el efecto del irrigante de uso endodóntico en la adherencia celular a las paredes dentinales del conducto radicular en endodoncia regenerativa. Después de evaluar 10 soluciones para irrigación

de conductos radiculares encontraron que la cantidad de DPSCs unidas a la superficie del conducto radicular después de la limpieza y conformación variaba de acuerdo a la solución irrigante y quelante utilizada, observando que, en promedio, las cifras más altas de DPSCs unidas al conducto radicular eran identificadas cuando se utilizaba la solución irrigante AquatineEC y EDTA, y el promedio más bajo fue cuando se usó NaOCl y MTAD (19,56) .

Otros estudios han evaluado la efectividad antimicrobiana y de remoción de barrillo dentinario del Aquatine encontrando un comportamiento similar al del hipoclorito de sodio al 6% en la remoción de barrillo dentinario cuando son acompañados con una irrigación con EDTA, pero indicando que el AquatineEC es superior al hipoclorito de sodio en términos de biocompatibilidad, convirtiéndose en una alternativa segura para la irrigación y desinfección de los conductos radiculares (56) .

En Colombia en 1992, se obtuvo la molécula de HOCl con una estabilidad superior a un año, permitiendo el desarrollo e investigación profunda del compuesto, hasta lograr la primera formulación farmacéutica en el mundo a base de HOCl, certificada con el registro INVIMA número 2004M-0003037. Esta formulación está indicada como solución antiséptica para el tratamiento y cuidado de algunas heridas en patologías de miembros inferiores. Estudios previos han evaluado la actividad bactericida del HOCl encontrándose que es efectivo al 99.9% a concentraciones iguales o mayores a 900 ppm, luego de 10 minutos de acción para todas las cepas estudiadas (57).

Otro estudio evaluó el efecto antibacterial del HOCl, encontrando que a una concentración de 500 ppm durante 1 minuto es efectivo contra S. sanguis, S. mutans, E. faecalis, E. corrodens, C. rectus, F. nucleatum, E. cloacae, K. oxytoca y K. pneumoniae. Los resultados reportados, muestran un efecto antimicrobiano potente y de amplio espectro para microorganismos asociados con caries dental, endocarditis infecciosa, sobreinfectantes y microorganismos del complejo naranja, que favorecen el crecimiento de microorganismos periodontopáticos del complejo rojo como P. gingivalis, T. denticola, T. forshytia y E. nodatum, asociados a la enfermedad periodontal, lo que hace del ácido hipocloroso, un antimicrobiano no antibiótico de alto interés en odontología (16).

La capacidad de remoción del barrillo dentinario durante la irrigación del conducto radicular con ácido hipocloroso desarrollado en Colombia también ha sido evaluada y demostró que por sí

solo posee efectos aceptables para la remoción del mismo a una concentración de 5000 ppm (58).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el fin de llevar a cabo una terapia endodóntica regenerativa, es necesario estimular la adhesión de las células stem de pulpa dental (DPSCs) a las paredes dentinarias del conducto radicular, sin embargo, la información con respecto a cómo afectan a estas células las diferentes soluciones de irrigación del conducto radicular es escasa, al igual que el potencial efecto citotóxico de estas sustancias en la supervivencia de las células stem de la papila apical (SCAP).

El hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones desde 0,5% hasta 6% ha sido la solución más usada para la irrigación del conducto radicular en terapia pulpar regenerativa al igual que en la preparación convencional del conducto radicular, donde es el agente más utilizado por su potente actividad antimicrobiana y proteolítica, logrando disolver el tejido orgánico (59,60). Las concentraciones superiores incrementan este efecto antimicrobiano y proteolítico, así como la toxicidad debido a que el NaOCl provoca una respuesta inflamatoria y daño grave al entrar en contacto con el tejido vital. Por otra parte, el NaOCl es incapaz de eliminar la capa de barrillo en la superficie de la dentina después de la preparación del conducto radicular, por lo que se han usado soluciones adicionales como agentes quelantes (EDTA) que tienen la capacidad de eliminar la capa de barrillo dentinario, dejando una superficie dentinal limpia con túbulos dentinales abiertos una vez se ha realizado la instrumentación del conducto radicular. La descalcificación de la dentina que produce el EDTA conduce a la exposición de las fibrillas de colágeno de la matriz orgánica, favoreciendo la unión celular a través de receptores de tipo integrina. Adicionalmente, el tratamiento con EDTA expone factores de crecimiento atrapados en la matriz de dentina, incluyendo factor de crecimiento transformante β (TGF-β), proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) y factores angiogénicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2). Se ha demostrado que estos factores estimulan la síntesis y secreción de la matriz de dentina, la diferenciación odontoblástica y la formación de dentina terciaria (51).

A pesar de que el NaOCl es recomendado por la Asociación Americana de Endodoncia para la irrigación del conducto radicular, éste no está aprobado por la FDA debido a su alta toxicidad, es cáustico, existe el riesgo de enfisema en caso de extrusión y las reacciones alérgicas graves que puede sufrir el paciente. El uso generalizado del NaOCl como una solución irrigante en endodoncia puede explicarse por su bajo precio, excelente disolución del tejido pulpar y sus propiedades antimicrobianas. Teniendo en cuenta que el NaOCl es el irrigante para conductos

radiculares "estándar de oro" en nuestro medio, las sustancias irrigantes experimentales deben ser comparadas con él para evaluar su efectividad (56).

Uno de los irrigantes que ha sido evaluado es el Ácido Hipocloroso (HOCl), el cual hace parte de un grupo de moléculas conocidas como Aganócidos, es decir, sustancias antimicrobianas no antibióticas, biológicamente sintetizadas por Neutrófilos y macrófagos durante un proceso inmunológico conocido como estallido respiratorio, que ocurre como resultado del proceso de fagocitosis. El HOCl es un ión no disociado del cloro, dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos hipohalogenados más fuertes, es también uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados y es el responsable directo de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro. Químicamente el HOCl puede ser obtenido por diferentes métodos. Infortunadamente, la mayoría de los procedimientos obtienen soluciones de baja estabilidad, moderada actividad microbicida, con bajo porcentaje de ácido hipocloroso libre y mal toleradas por los tejidos en usos prolongados (16).

El Aquatine EC (Sterilox Dental's Aquatine Endodontic Cleanser, Aquatine EC, Sterilox, Puricore, Malvern, PA, USA) es una solución cuyo componente activo es el ácido hipocloroso (HOCl) y fue aprobado en agosto de 2006 en Estados Unidos por la FDA (Food and Drug Administration) para ser usado como irrigante en endodoncia. Ring et al, 2008,, realizaron un estudio para determinar el efecto del irrigante de uso endodóntico en la adherencia celular a las paredes dentinales del conducto radicular en endodoncia regenerativa, después de evaluar 10 soluciones para irrigación de conductos radiculares encontraron que la cantidad de DPSCs unidas a la superficie del conducto radicular después de la limpieza y conformación, variaba de acuerdo a la solución irrigante y quelante utilizada, encontrando que en promedio, las cifras más altas de DPSCs unidas al conducto radicular se observaron cuando se utilizaba la solución irrigante AquatineEC y EDTA, y el promedio más bajo fue cuando se usó NaOCl y MTAD (18) .

Otros estudios han evaluado la efectividad antimicrobiana y de remoción de barrillo dentinario del Aquatine EC observando un comportamiento similar al del hipoclorito de sodio al 6% en la remoción de barrillo dentinario cuando son acompañados con una irrigación con EDTA, pero indicando que el Aquatine EC es superior al hipoclorito de sodio en términos de biocompatibilidad, convirtiéndose en una alternativa segura para la irrigación y desinfección de los conductos radiculares (56) .

En Colombia en 1992, se obtuvo la molécula de HOCl con una estabilidad superior a un año, permitiendo el desarrollo e investigación profunda del compuesto, hasta lograr la primera formulación farmacéutica en el mundo a base de HOCl, certificada con el registro INVIMA número 2004M-0003037. Esta formulación está indicada como solución antiséptica para el tratamiento y cuidado de algunas heridas en patologías de miembros inferiores.

Así mismo, se ha evaluado la actividad bactericida del HOCl encontrándose que éste es efectivo en un 99.9% a concentraciones iguales o mayores a 900 ppm, luego de 10 minutos de acción para todas las cepas estudiadas. Otros estudios muestran que el HOCl es un antimicrobiano de amplio espectro en concentraciones que van desde 0.1 a 2.8 ug/ml en un periodo de exposición de 2 min (Excepto Streptococcus pyogenes que requiere aproximadamente de 10 minutos de acción) (16). La capacidad de remoción del barrillo dentinario durante la irrigación del conducto radicular con ácido hipocloroso también ha sido evaluada y demostró que por sí solo posee efectos aceptables para la remoción del mismo (58).

Debido a que el éxito de cualquier procedimiento regenerativo es dependiente o está condicionado por la migración de las células stem residentes en la papila apical hacia el espacio del conducto radicular, la presencia de un agente tóxico y la capa de barrillo dentinario podrían crear condiciones desfavorables para la supervivencia, migración, adherencia y proliferación celular, lo que cuestiona el uso del NaOCl el cual, a pesar de ser el irrigante de elección en terapia pulpar, no cumple con las propiedades físico químicas que debe tener una solución irrigante de uso en terapias regenerativas pulpares.

3. JUSTIFICACIÓN

Han sido publicados diversos reportes de casos de procedimientos de endodoncia regenerativa, con diferencias significativas en los protocolos de desinfección del conducto radicular. Estos han variado desde la utilización de Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5.25 % seguido por solución salina y clorhexidina al 0.12 % o NaOCl al 2.5% o 5.25% solo o NaOCl al 6 % seguido de clorhexidina al 2 % (2,61-63). Aunque se ha demostrado la eficacia como irrigantes del conducto radicular por sus propiedades ya sea bactericidas, bacteriostáticas y/o de disolución de tejidos (64), también han demostrado ser citotóxicos para los fibroblastos, células stem del ligamento periodontal, células HeLa, células stem de dientes deciduos en exfoliación (SHEDs) y SCAP (65).

El NaOCl en diferentes concentraciones ha sido el irrigante endodóntico más utilizado en la gran mayoría de los casos reportados de regeneración/revascularización (61,66) (63 % usaron NaOCl al 3%, 36% usaron NaOCl al 5-6%, y el 1% utilizó NaOCl al 1%) (2). Se ha observado que estos procedimientos regenerativos carecen de protocolos de tratamiento estandarizados, existiendo gran variedad de técnicas reportadas, así como de medicamentos intraconducto e irrigantes utilizados (67). La decisión clínica para utilizar estos productos químicos en una concentración determinada se ha basado en la necesidad de conseguir la máxima desinfección, la cual es fundamental para los procedimientos regenerativos. Teniendo en cuenta que la presencia de un agente tóxico en la zona periapical o en el conducto radicular podrían afectar la migración de las SCAP y/o DPSCs hacia el mismo, al igual que su supervivencia y diferenciación a un fenotipo odontoblástico, es cuestionado el uso del hipoclorito de sodio en estos procedimientos. Por lo tanto, es indispensable lograr un equilibrio entre la desinfección y la creación de condiciones ideales para las células que van a intervenir en el proceso regenerativo (2,50).

En la actualidad se han realizado pocos estudios (*in vitro* y en animales) que evalúen el efecto de las sustancias utilizadas para la irrigación del conducto radicular sobre las células stem en procedimientos de regeneración pulpar (19,50,51,68,69). Algunos de ellos han demostrado que el acondicionamiento de la dentina con NaOCl al 5% o 6% impide la diferenciación de las SHED y las DPSCs a un fenotipo odontoblástico *in vitro* y en modelos *in vivo* (51)

La endodoncia regenerativa, tiene como uno de sus objetivos prevenir y tratar la periodontitis apical, pero también reconoce los principios de la bioingeniería para inducir el continuo desarrollo de los dientes y la fisiología normal. Aunque los procedimientos de endodoncia regenerativa han

tenido mucho éxito en el control de la infección y en promover el desarrollo radicular y la nocicepción (2), los análisis histológicos recientes de los dientes tratados previamente demuestran la falta de control sobre el destino de las células stem (70-72). Los depósitos mineralizados a lo largo de las paredes de la dentina se asemejan a cemento u osteodentina. Adicionalmente, se han observado islas de tejido mineralizado semejantes a hueso embebido en el tejido conectivo laxo. Estos resultados son consistentes con los estudios histológicos obtenidos de endodoncia regenerativa en modelos animales (73,74) los cuáles no cumplen con los principios de ingeniería de tejidos. Por lo tanto, el éxito clínico no parece coincidir con el éxito histológico (regeneración completa que se asemeje un "tejido pulpar en buen estado"). En este momento, la importancia de estos resultados histológicos en la práctica clínica de endodoncia regenerativa no es clara (12), sin embargo, estos hallazgos sugieren que el tejido regenerado no es igual al complejo dentino-pulpar.

Teniendo en cuenta que el equilibrio entre la desinfección y la creación de un microambiente intraconducto favorable para la proliferación de células stem es de vital importancia para el éxito de las terapias endodónticas regenerativas, la elección de irrigantes y medicamentos intraconducto deben realizarse con base en su eficacia antimicrobiana y con el menor daño para las células stem y factores de crecimiento presentes en ese microambiente.

Basados en el efecto citotóxico potencial de las sustancias irrigantes usadas hasta el momento en endodoncia regenerativa, de su efecto negativo sobre la viabilidad, el fenotipo y proliferación de células stem provenientes de la papila apical y teniendo en cuenta la evidencia actual de las ventajas del uso del ácido hipocloroso sobre las DPSCs (19)así como su efecto antibacterial y sobre proliferación celular (13,16), se plantea la necesidad de realizar éste estudio *in vitro* para comparar el efecto sobre las SCAP de dos soluciones que han sido utilizadas para la irrigación del conducto radicular: hipoclorito de sodio y ácido hipocloroso. Los resultados de esta investigación proporcionarán nuevo conocimiento que servirá como base para desarrollar futuros estudios que permitan determinar si el HOCl sería el irrigante ideal en endodoncia regenerativa, con el fin de avanzar hacia el propósito de implementar el uso apropiado de HOCl en la clínica.

4. SITUACIÓN ACTUAL

La necrosis pulpar en dientes inmaduros como consecuencia de trauma, caries entre otros, conlleva a la interrupción del desarrollo dental, resultando en formación radicular incompleta, ápices abiertos, longitud radicular corta y paredes dentinales delgadas y frágiles (20). Anteriormente el tratamiento para éste tipo de dientes estaba basado en apexificación con hidróxido de calcio y más recientemente con MTA, sin embargo, el clínico se veía enfrentado a numerosos desafíos en el tratamiento de los dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica, debido a que la limpieza y conformación del conducto radicular era un reto ya que el tratamiento se dificultaba a causa de las paredes dentinales delgadas y a la falta de desarrollo del ápice que complicaba la obturación. Adicionalmente, estos dientes eran más susceptibles a la fractura durante o después del tratamiento. La apexificación era tradicionalmente realizada con hidróxido de calcio, sin embargo, este era un tratamiento de múltiples citas requiriendo un largo plazo para llevar a cabo el proceso de apicoformación que permitiera crear una barrera apical que evitara la extrusión del material de obturación. Otro inconveniente de esta técnica era la reducción de la resistencia a la fractura de la raíz. Por lo anterior, el enfoque de tratamiento con hidróxido de calcio para estos casos no era el ideal para muchos pacientes.

Posteriormente se propuso un método alternativo para llevar a cabo la apicoformación, el cual consiste en el uso de Mineral trióxido agregado (MTA) y cuya ventaja es que permitía realizar el procedimiento de apexificación en una o dos citas, creando una barrera apical artificial que permitía la compactación del material de obturación y posterior restauración coronal. Varias series de casos han indicado que el tratamiento de apexificación con MTA tiene una alta tasa de éxito. A pesar de estas ventajas, estos tratamientos no proporcionaban un aumento en el diámetro y longitud de las paredes radiculares, por lo tanto, las raíces permanecían cortas, delgadas y frágiles, haciéndolas más propensas a la fractura, lo que sugería la necesidad de otro enfoque de tratamiento para dientes inmaduros con pulpa necrótica (75).

Un tratamiento alternativo propuesto desde hace pocos años es promover la formación y crecimiento radicular continuo, razón por la cual en las últimas 2 décadas los procedimientos de regeneración pulpar se han convertido en alternativas viables para el tratamiento de dientes inmaduros con necrosis pulpar debido a que ayudan a restaurar la función fisiológica del diente y permiten su desarrollo radicular (1).

Un estudio clínico en doce pacientes demostró la presencia de células stem durante el proceso de inducción del sangrado desde la zona periapical hacia el conducto radicular, y además demostró que los niveles de sus marcadores moleculares estaban cientos de veces más elevados que los niveles observados en la sangre sistémica obtenida de los mismos pacientes, lo anterior fue confirmado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real e inmunohistoquímica, éste hallazgo no había sido demostrado clínicamente en estudios previos. Los resultados presentados no solo demostraron la presencia de células stem en el conducto radicular, adicionalmente comprobaron que estas células se originan de los tejidos adyacentes al ápice radicular y que no provienen de la circulación sistémica. Este estudio evaluó la presencia de células stem usando un solo protocolo de tratamiento en todos los pacientes, sin embargo, ningún estudio previo ha utilizado este tipo de metodología para comparar el efecto de dos protocolos de irrigación diferentes sobre las células stem durante un procedimiento de regeneración pulpar (7) .

Para poder llevar a cabo una endodoncia regenerativa, es indispensable que se realice previamente una adecuada desinfección del conducto radicular. En los casos de dientes con pulpa necrótica y ápice inmaduro, el conducto radicular es por lo general muy amplio, lo que permite un adecuado ingreso y distribución de los irrigantes antimicrobianos en todo el espacio del mismo. De hecho, la preocupación es generalmente cómo prevenir la extrusión de los irrigantes hacia los tejidos periapicales teniendo en cuenta que son potencialmente tóxicos, debido a que la zona periapical puede contener las células stem y los vasos sanguíneos necesarios para que se presente la regeneración de pulpar. Por lo anterior, se ha propuesto realizar una irrigación pasiva con ayuda del Endo-Vac como estrategia para evitar la extrusión del hipoclorito de sodio (NaOCl) hacia la zona periapical, el cual ha sido el irrigante de elección hasta el momento (60). Ensayos clínicos han demostrado que la irrigación con hipoclorito de sodio reduce la incidencia de bacterias cultivables en un 40-60 %, sin embargo, pocos estudios han evaluado el efecto de los irrigantes utilizados durante el protocolo de regeneración pulpar sobre las células stem.

Ring et al. 2008, realizaron un estudio ex vivo sobre dientes con un solo conducto para analizar el efecto de 10 protocolos de irrigación sobre células stem de pulpa dental (DPSCs) y encontraron que el número de células adheridas a la superficie del conducto radicular después de la limpieza y conformación variaba de acuerdo al tipo de solución de irrigación y presencia de quelante. Demostraron que ciertas concentraciones de hipoclorito de sodio son tóxicas e interfieren con la

adhesión de las células stem de la papila apical (SCAP) a la superficie de la dentina, lo que podría interferir con la diferenciación odontoblástica mediada por factores de crecimiento liberados en la dentina. El hallazgo de una mayor cantidad de células aplanadas (DPSCs) al usar AquatineEC /EDTA y Morinda citrifolia juice (MCJ; Tahitian Noni International, Provo, UT)/EDTA lo relacionaron con una mayor biocompatibilidad de estos irrigantes, sugiriendo que son las soluciones óptimas para ser utilizadas en terapias endodónticas regenerativas, debido a que ayudaron a mantener la supervivencia y la fijación de DPSCs a la dentina, a diferencia de la irrigación con NaOCl al 6% y clorhexidina 2% que mostraron ser los irrigantes más tóxicos de todos los estudiados sobre las SCAP, observándose formas celulares más redondeadas (19).

En otro estudio se utilizaron cilindros de dentina, los cuales fueron acondicionados con NaOCl 6% o NaOCl al 6% seguido por irrigación con EDTA al 17%. A continuación, las DPSCs se cultivaron en un hidrogel de péptido realizado a la medida de los cilindros de dentina imitando el conducto radicular, los cuales fueron posteriormente implantados por vía subcutánea en ratones inmunosuprimidos. Los implantes fueron retirados 6 semanas después y fueron procesados para ser evaluados por inmunohistoquímica. Se observaron lagunas de reabsorción, las cuáles fueron fácilmente evidentes en los cilindros de dentina tratados con NaOCl 6 % solamente. Por el contrario, en los que fueron tratados con EDTA al 17 %, las células exhibieron un contacto íntimo con las paredes dentinales, incluyendo la extensión de proyecciones hacia los túbulos dentinarios y la expresión de un fenotipo similar al odontoblasto (51). En resumen, el hipoclorito de sodio al 6% tiene un profundo efecto negativo sobre la supervivencia y la diferenciación celular, mientras que el EDTA al 17% revierte parcialmente los efectos perjudiciales del NaOCl y promueve la supervivencia y diferenciación de las SCAP (2).

Un estudio reciente evaluó el efecto de diferentes concentraciones de NaOCl sobre la supervivencia y diferenciación de las SCAP (68). Se realizaron preparaciones de conductos radiculares estandarizados en dientes humanos extraídos. Los dientes preparados fueron irrigados con NaOCl a concentraciones de 6 %, 3 %, y 1.5 %. Aproximadamente la mitad de las muestras recibieron una segunda irrigación con EDTA al 17%, todas las muestras recibieron una irrigación final con solución salina para eliminar cualquier residuo químico en el conducto. Las SCAP se llevaron a todos los conductos en un hidrogel de ácido hialurónico y fueron cultivadas durante 7 días. El número de células viables se evaluó utilizando un ensayo de luminiscencia, mientras que los niveles de sialofosfoproteína dentinal fueron evaluados por medio de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa en tiempo real (qRT- PCR). Se

encontró que la exposición de la dentina al NaOCl disminuye tanto la supervivencia de las SCAP como la diferenciación en una forma dependiente de la concentración. Sin embargo, se observó que la concentración de NaOCl al 1.5 % tuvo efectos mínimos sobre la supervivencia y diferenciación. Este estudio coincide con los hallazgos de otros estudios donde se ha observado que el acondicionamiento de la dentina con NaOCl al 6% tiene un efecto negativo, mientras que el EDTA al 17% tiene un efecto positivo sobre la supervivencia y la diferenciación de células stem cultivadas en contacto con la dentina acondicionada (50,68,76). Adicionalmente, el uso de EDTA como último paso en el protocolo de irrigación revirtió parcialmente los efectos perjudiciales del NaOCl.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido hipocloroso (HOCl) sobre la viabilidad y estabilidad fenotípica pluripotencial de las células stem de papila apical (SCAP).

5.2 Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar células stem de papila apical (SCAP).
- Establecer la concentración letal 50 del HOCl sobre células stem obtenidas de papila apical comparado con el NaOCl.
- Determinar el efecto del ácido hipocloroso sobre el ciclo celular de las SCAP
- Analizar la actividad transcripcional de genes de autorenovación y pluripotencia de las SCAP en presencia del ácido hipocloroso.

6. 6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro.*

6.2 Población y muestra

La población fueron células stem obtenidas de la papila apical de dientes inmaduros sanos. Para la estandarización del cultivo celular de las SCAP se utilizaron muestras de papila apical de 2 pacientes de 15 años, género femenino y el análisis se realizó sobre las SCAP de un solo paciente.

La obtención del tamaño de la muestra fue no probabilística por conveniencia. La unidad muestral fue cada pozo de una caja de cultivo de poliestireno que tenía entre 5.000 y 25.000 SCAP dependiendo el experimento realizado.

6.2.1 Criterios de inclusión

1. Tercer molar indicado para exodoncia.
2. Evidencia radiográfica de formación radicular incompleta, con ápices abiertos (Diámetro mayor a 1.5 mm)
3. Pacientes hombres o mujeres con edad entre 15 y 21 años.
4. Disposición de participar en el estudio.
5. Capacidad del paciente (o padre/tutor cuando el paciente fuera menor de 18 años) para entender y dar su consentimiento y/o asentimiento informado.

6.2.2 Criterios de exclusión

1. Compromiso sistémico del paciente
2. Presencia de caries o inflamación pulpar/necrosis en los dientes que requerían ser utilizados para el estudio.
3. Complicaciones quirúrgicas que comprometieran la integridad del tejido pulpar o de la papila apical o por incumplimiento del protocolo de bioseguridad (77).

6.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

6.3.1 Obtención de la muestra

Una vez realizada la valoración clínica y radiográfica de los pacientes para elegir los dientes que iban a ser extraídos, los pacientes seleccionados firmaron el asentimiento informado y su acudiente el consentimiento informado previamente aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque y redactado acorde con lo contemplado en la RESOLUCION Nº 008430 DE 1993 (Ver Anexo 2). Los pacientes fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico estandarizado, se realizaron las exodoncias y se obtuvieron las muestras teniendo en cuenta los criterios de selección previamente descritos.

Para llevar a cabo el proceso de estandarización del cultivo celular, se obtuvieron 6 muestras (Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, en donde se trabajó en la cabina de flujo laminar bajo el protocolo previamente establecido y estandarizado por el grupo UIBO, línea de investigación de células troncales craneofaciales e ingeniería de tejidos, para llevar a cabo la obtención y caracterización de las SCAP.

Figura 1) de papilas apicales de dos pacientes de género femenino de 15 años, a quienes se les realizaron exodoncias quirúrgicas de terceros molares que cumplían con los criterios de inclusión del estudio. Las exodoncias fueron realizadas por un cirujano maxilofacial en un consultorio particular. Una vez extraídos los dientes, se lavaron con solución salina estéril fría dos veces e inmediatamente después fueron sumergidos en la misma solución donde se removieron las papilas apicales con una hoja de bisturí estéril. Posteriormente las papilas apicales se depositaron en tubos falcon de 15 ml estériles, los cuales contenían la solución de transporte (Dulbecco's Modified Eagle's Media -DMEM GIBCO- bajo en glucosa suplementado con Penicilina 100U/ml / estreptomicina 100 µg /ml y anfotericina 2,5 µg/ml de Lonza). Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, en donde se trabajó en la cabina de flujo laminar bajo el protocolo previamente establecido y estandarizado por el grupo UIBO, línea de investigación de células troncales craneofaciales e ingeniería de tejidos, para llevar a cabo la obtención y caracterización de las SCAP.

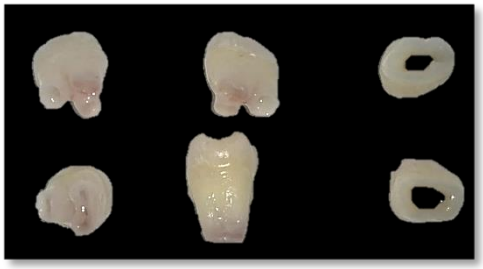


Figura 1. Dientes de donde se obtuvieron las papilas apicales para la estandarización del cultivo.

6.3.2 Aislamiento y expansión de las SCAP

En cabina de flujo laminar, las papilas apicales fueron trasladadas a una caja de Petri estéril y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 3 mm. Los explantes fueron sumergidos en una solución enzimática que contenía 1ml de colagenasa (3 mg/ml concentración final) y 1 ml de dispasa II (4 mg/ml concentración final) marca SIGMA. Posteriormente se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se verificó la digestión completa del tejido que se complementó con disociación mecánica utilizando micropipetas.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento o "pellet" en 1ml de medio de cultivo completo bajo en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle's Media - DMEM, GIBCO, Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone^{TM}), 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B. Posteriormente las células obtenidas fueron sembradas en dos cajas de cultivo de 25 cm^2 con 5ml de medio cultivo completo (Cultivo primario). Las células se mantuvieron en la incubadora con 5% de CO2, 95% de humedad relativa a 37°C hasta que se adhirieron a la caja de cultivo (a las 24 horas) lo cual fue verificado con microscopio invertido.

Se cambió el medio de cultivo cada tercer día y se mantuvieron las células en la caja de poliestireno hasta que alcanzaron el 90% de confluencia, momento en el cual se realizó el pasaje 2 desprendiéndolas con una solución de tripsina 0,025% preparada en tampón fosfato salino (PBS). Se llevó a cabo la criopreservación de las SCAP de 1 de las cajas T25 obtenidas de los 2 pacientes.

Las células aisladas fueron expandidas en cultivo por tripsinización y pasajes seriados. La morfología fue evaluada desde la primera semana de cultivo por microscopía invertida. Cuando las células estuvieron en el pase 3 de cultivo se realizó la caracterización por citometría de flujo para verificar la expresión de los marcadores de células stem. Posteriormente, después de haber estandarizado el método de obtención de las células, se obtuvieron cultivos primarios de SCAP de un paciente de 18 años con las cuales se llevaron a cabo los experimentos para evaluar el efecto del HOCl.

6.3.3 Caracterización de las SCAP

Para confirmar que las células obtenidas del cultivo primario correspondían a células Stem mesenquimales de la papila apical, estas se caracterizaron por la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo, se evaluó su capacidad de formar unidades formadoras de colonias (UFC) y su potencial de proliferación.

6.3.3.1 Caracterización de las células obtenidas del cultivo primario por citometría de flujo para confirmar fenotipo de célula stem mesenquimal (MSC)

Para confirmar que las células obtenidas del cultivo primario correspondían a células stem mesenquimales de la papila apical (SCAP), cuando el cultivo alcanzó el 90% de confluencia en el pasaje 3 las células se caracterizaron por la expresión de marcadores de superficie por medio de citometría de flujo. Para esto, las células adherentes expandidas se lavaron con PBS y se digirieron enzimáticamente con 0,025% de tripsina/0,02% de EDTA por 10 min a 37°C en la incubadora. La suspensión celular se lavó dos veces con tampón fosfato salino y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente utilizando el microscopio invertido las células fueron contadas y se confirmó la viabilidad celular en cámara de Neubauer con el colorante de exclusión azul tripán en dilución 1/1.

Con el fin de evaluar los marcadores de superficie por citometría de flujo se recolectaron 2 x 10^5 células en cuatro en tubos eppendorf de 1.5 ml las cuales fueron resuspendidas en 200 µL de PBS, y se incubaron en los anticuerpos (marca Miltenyi) de la siguiente forma: **1)** Contenía células sin marcar, **2)** Correspondiente al control de isotipos IgG1 e IgG2 para determinar el ruido de fondo producido por las uniones inespecíficas de los anticuerpos , **3)**

Contenía los anticuerpos CD105 marcado con PE conjugado, CD34 marcado con FITC , CD45 marcado con proteína clorofila peridinina (PERCP) y CD90 marcado con aloficocianina (APC) **4)** Células con los anticuerpos CD146 marcado con FITC y CD73 marcado con (PE) conjugado. Los anticuerpos fueron incubados durante 30 minutos antes de ser leídos en el citómetro de flujo. Como control positivo se emplearon células stem de pulpa dental donadas por el Grupo de Investigación Básica Oral - UIBO de la Universidad El Bosque, a las cuales también se les realizó citometría de flujo bajo este mismo protocolo.

El análisis de citometría de flujo se realizó empleando el equipo BD Accuri™ C6 después de adquirirse 10.000 eventos de cada uno de los tipos celulares evaluados (SCAP y DPSC), en donde el porcentaje de células positivas se calculó con respecto a las células sin marcar y las céulas con control de isotipo.

6.3.3.2 Evaluación de las unidades formadoras de colonias similar a fibroblastos (UFC-F) por las SCAP

Las SCAP obtenidas del cuarto pase, se sembraron por triplicado en cajas de cultivo de 6 pozos a una densidad de 25.000 células por pozo en medio de cultivo completo. Posteriormente, se incubaron a 37°C en 5% CO2 y humedad >90% por 12 días. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS y luego se fijaron por 20 min en 1% de paraformaldehido (PFA) preparado en PBS pH 7.2-7.4. Posteriormente las células se colorearon con azul de Evans durante 5 minutos, luego se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Los agregados de más de 50 células observadas al microscopio invertido se consideraron UFC.

6.3.4 Tiempo de doblaje poblacional

Para este ensayo se emplearon 15 x 10^4 SCAP en pasaje 5, cuyo número inicial de células sembradas por pozo fue de 5 x10^4 en caja de cultivo de 12 pozos y se utilizó la resazurina que es un indicador de óxido reducción. La absorbancia fue leída en el lector TECAN Infinite® 200 Pro-Series en 4 tiempos diferentes correspondientes al tiempo cero, 24 horas, 48 horas y 72 horas, por cada tiempo se hicieron tres mediciones diferentes. Los resultados obtenidos de la diferencia entre las medidas de absorbancia de los pozos con las células y los pozos control

(solo colorante) en cada tiempo, se ingresaron al software en línea Doubling Time (Roth V. 2006 Doubling Time Computing, disponible en : http://www.doubling-time.com/compute.php) para establecer de esta forma el tiempo de doblaje poblacional.

6.3.5 Ensayo de citotoxicidad por HOCl en las SCAP

6.3.5.1 Determinación de linealidad celular por el método de resazurina

Para establecer el número de células óptimo a utilizar en los experimentos de citotoxicidad, se realizó un ensayo de linealidad celular usando el método de resazurina. Lo anterior permitió determinar si los efectos en el cultivo de SCAP estaban asociados al tratamiento con HOCl o si se trataba de inhibición en el crecimiento celular por contacto de las células en cultivo. El método de reducción de la resazurina es un indicador de óxido-reducción fluorescente que permite la detección y monitoreo del número de células viables en ensayos de proliferación y citotoxicidad. Las células viables con un metabolismo activo reducen la resazurina (de color azul oscuro) a resofurina (de color rosa fluorescente) en un proceso irreversible, y en una segunda etapa la resofurina se reduce de manera reversible a dihidroresorufina (incoloro no fluorescente) (78).

El experimento se realizó en cajas de cultivo celular de 96 pozos fondo plano donde se sembraron: 2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 células/pozo, por triplicado en un volumen total de 100µL por pozo a 37°C y 5% de CO2. En todos los experimentos se utilizaron las SCAP caracterizadas en el objetivo anterior. Tres tiempos de incubación fueron probados 48, 72 y 96 horas. Luego de cada tiempo de incubación se adicionó la resazurina (100µL a 4.4µM) y se incubó por cuatro horas. Se midió la absorbancia en el lector de placas de ELISA marca TECAN Infinite® 200 Pro Series a 535nm y filtro diferencial de 595nm. Las absorbancias obtenidas fueron transformadas a porcentajes de supervivencia y graficados en función de la densidad celular mediante regresión lineal con el software estadístico GraphPad-Prism5®.

6.3.5.2 Citotoxicidad de HOCl sobre las SCAP

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con las SCAP previamente caracterizadas. Se determinó la Concentración Letal 50 (CL50) medida que indica la concentración de HOCl a la cual el 50% de las SCAP han muerto, es decir la reducción de la mitad de la población celular. El

número de células sembradas se estableció teniendo en cuenta el ensayo de linealidad (10000 células/pozo), los experimentos fueron realizados en placas de 96 pozos fondo plano por triplicado y las células fueron tratadas con HOCl a las 24 horas de cultivo a 37°C y 5% de CO_2. Se emplearon tres repeticiones en 3 tiempos diferentes. El HOCl fue suministrado por Aquilabs S.A (Bogotá) y un total de 11 concentraciones fueron probadas. Se realizó un experimento inicial con las concentraciones: 650ppm (1235µM), 500ppm (950µM), 250ppm (475µM), 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50 ppm (95µM) y 25ppm (48µM) a pH 5.6. Posteriormente se realizó un segundo experimento con menores concentraciones de HOCl que el anterior: 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50ppm (95µM), 25ppm (48µM), 12.5ppm (24µM), 7ppm (13µM) y 3 ppm (6µM), pH 5.6.

La viabilidad celular fue medida mediante el método de incorporación de resazurina. Tres controles de cultivo fueron utilizados: i) Células tratadas con NaOCl al 0.5% ii) Células tratadas con NaOCl al 1% y iii) Células sin ningún tratamiento. Todos los cultivos fueron incubados por 48 horas con el tratamiento, posteriormente se añadió la resazurina (100µL a una concentración de 0,44µM) y se realizó la lectura del experimento en el lector de placas de ELISA marca TECAN Infinite® 200 Pro Series a 570nm y filtro diferencial de 590nm. Al igual que en el ensayo de linealidad, las absorbancias obtenidas se transformaron a porcentajes de supervivencia y fueron graficados en función del logaritmo de la concentración de tratamiento mediante un ajuste de regresión no linear con el software estadístico GraphPad-Prism5®.

6.3.6 Ensayo de proliferación de las SCAP tratadas con HOCl

Se evaluó el efecto del HOCl sobre el ciclo celular de las SCAP. Nueve condiciones de tratamiento con HOCl fueron probadas: tres concentraciones 25, 50 y 75 ppm en tres tiempos 1, 15 y 30 minutos. Se utilizó el estuche comercial Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging kit Cat. C10337 Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, CA, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo permite la medición de un análogo de la timidina, el EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) el cual se incorpora en el DNA durante la síntesis activa y es detectado por medio del fluoróforo Alexa Fluor®. El porcentaje de células en cada fase se midió con 7AAD (7-Aminoactinomycin D), un compuesto químico fluorescente que se une al DNA de doble cadena. Ambas tinciones fueron detectadas con el citómetro BD Accuri™ C6 Plus (Becton, Dickinson and Company).

Los experimentos se realizaron en placas de cultivo de 12 pozos, se sembraron 25.000 células por pozo y fueron tratadas con HOCl a pH 5.6 en cada una de las nueve condiciones de tratamiento por triplicado. Las SCAP fueron cultivadas por 24 horas previas al tratamiento con HOCl. Luego de cada tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril por 30 segundos y se incubaron por 48 horas con DMEM suplementado a 37°C y 5% de CO_2. Posteriormente se adicionó el EdU (10µM) y se realizó una incubación por dos horas en las mismas condiciones de temperatura y CO_2. La tinción con Alexa Fluor y 7AAD fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo y los datos se analizaron utilizando el "FCS Express™ V5 Plus Software" (De Novo Software™).

6.3.7 Evaluación del efecto del ácido hipocloroso sobre los núcleos de las SCAP

Con el fin de establecer si el HOCl producía alteraciones en la morfología nuclear y la condensación de la cromatina de las SCAP, se utilizó la tinción DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, diclorhidrato) de Invitrogen™, numero de catálogo D1306. Este es un marcador azul fluorescente de ácido nucleico, tiñe preferentemente ADN de doble cadena (dsDNA) y se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina-Timina (AT). La unión de DAPI a dsDNA produce un aumento de fluorescencia de ~20 veces, aparentemente asociada al desplazamiento de las moléculas de agua tanto de DAPI como del surco menor. Cuando DAPI se une al ADN bicatenario su máximo de emisión de fluorescencia es a una longitud de onda ~460 nm (azul). Por lo tanto, en la microscopía de fluorescencia DAPI es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian. Por otra parte DAPI también puede unirse en un modo diferente al RNA a través de la intercalación selectiva de dinucleótido de adenina-uracilo, y aunque su pico de emisión es bastante amplio (~ 500 nm), no es tan fluorescente. DAPI es una contratinción nuclear usada en técnicas de fluorescencia multicolor, su fluorescencia azul genera un contraste con sondas fluorescentes verdes, amarillas o rojas de otras estructuras. DAPI tiñe los núcleos específicamente, con poco o nada de marcaje citoplasmático (79).

Para llevar a cabo la tinción DAPI, las SCAP fueron expuestas al tratamiento con HOCl a las concentraciones de 25, 50 y 75 ppm pH 5.6, en los tiempos de 1 y 15 minutos fueron evaluadas. Los experimentos se realizaron en placa de cultivo de 24 pozos por triplicado para cada condición de tratamiento y como control se utilizaron células que no fueron expuestas al HOCl.

Para realizar la tinción, las células se sembraron en laminillas de vidrio estériles, posteriormente se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se adicionaron 300 µL de DAPI a 300 nM preparado en PBS hasta cubrir completamente las células. La solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se lavó la muestra con PBS. Posteriormente, se retiró el exceso de buffer y las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia Imager A2, Zeiss.

Se establecieron como células sanas aquellas que mostraban una tinción difusa del núcleo. Los tipos de morfología nuclear observados en las células lesionadas o muertas se dividieron en tres clases: (1) *Condensación de cromatina:* marginación de la cromatina sin condensación nuclear; (2) *Fragmentación nuclear:* marginación de cromatina con condensación nuclear; y (3) *Condensación nuclear:* disminución del tamaño de los núcleos sin marginación de la cromatina. Marginación hace referencia a la agrupación de la cromatina en el borde o periferia de la membrana nuclear, que dá como resultado una pérdida de tinción en otras partes del núcleo. La condensación nuclear se refiere a una disminución en el tamaño del núcleo en comparación con los núcleos de control (80).

6.3.8 Detección molecular de genes mediante RT-PCR array

6.3.8.1 qPCR en tiempo real para la detección de la expresión de genes asociados a mineralización a diferentes condiciones de HOCl

Se detectó la expresión de nueve genes sobre las SCAP en nueve condiciones *in vitro* a tres tiempos de exposición (1, 15 y 30 minutos) y tres concentraciones de HOCl (25, 50 y 75ppm) por triplicado. Ocho de los genes evaluados han sido asociados a diferenciación osteo/odontoblástica, estos fueron RUNX2 (Factor de transcripción 2 relacionado con Runt), OSX (Osterix), ALP (Fosfatasa alcalina), OP (Osteopontina), OC (Osteocalcina), COL I (Colágeno tipo 1), DSPP (Sialofosfoproteína dentinal) y DMP-1 (Fosfoproteína de matriz dentinal 1). Por otra parte, también se evaluó la expresión de p53 considerado debido a la función que desempeña en la regulación del ciclo celular y apoptosis (81). Para esto las SCAP (pase 5) se trataron con el HOCl con las concentraciones y tiempos establecidos y posteriormente se realizó la extracción

de ARN mediante el estuche comercial “Quick-RNA™ MicroPrep” Cat. R1054 de Zymo Research Corp (CA, EE.UU), el cual fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento. Para el paso de retrotranscripción se utilizó 1µg de RNA total con el estuche comercial “SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit” Cat. 11732-020 de Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, CA, EE.UU) y un set de primers o cebadores específicos para cada gen (Tabla 1). El qPCR One-Step consiste en realizar los pasos de ARN a ADN copia o cDNA (retrotranscripción o RT) y posterior amplificación del producto de PCR en el mismo pozo, al añadir todos los reactivos para la RT y la PCR en un solo paso. Todos los experimentos se realizaron en el termociclador de tiempo real “CFX96™ Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad Laboratories, Inc.). El producto de PCR se detectó usando SYBR® Green con el kit “KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix Universal”, fluoróforo que aumenta su emisión de fluorescencia al unirse al surco menor del DNA de doble cadena. Se utilizaron tres controles de calidad en cada ensayo: i) un control negativo de reactivos (NTC o Non Template Control) que consiste en utilizar agua libre de DNAsa y RNAsa en lugar de muestra; ii) un control de verificación del RNA extraído para cada muestra que consistió en la detección del RNA de la enzima GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) utilizado como gen control o gen housekeeping; iii) un control positivo del laboratorio.

La cuantificación relativa de estos genes se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2^−(Delta Delta CT)), este método se basa en el cálculo del ΔΔCT asumiendo que en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA (2-fold). Por lo tanto, el ΔΔCT es igual a la diferencia entre el ΔCT de la muestra y el ΔCT del control o gen housekeeping. A su vez, el ΔCT es calculado de la diferencia entre el CT del gen blanco y el CT de referencia (82).

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a diferenciación osteogénica

Número de acceso GenBank	Nombre del Gen	Iniciador Directo	Iniciador Reverso
NM_001015051.3	RUNX2	CATCTAATGACACCACCAGGC	GCCTACAAAGGTGGGTTTGA
NM_199173.4	OSTEOCALCINA (OC)	CCTCACACTCCTCGCCCTAT	TCCCAGCCATTGATACAGGT
NM_001040058.1	OSTEOPONTINA	TGAAACGAGTCAGCTGGATGACCA	TGGCTGTGAAATTCATGGCTGTGG
NM_001173467.1	OSTERIX (OSX)	TGGGAAAAGGGAGGGTAATC	CGGGACTCAACAACTCTGG
NM_000478.4	ALP	TCAGAAGCTCAACACCAACG	GTCAGGGACCTGGGCATT
NM_000088.3	COL I	TGACCTCAAGATGTGCCACT	ACCAGACATGCCTCTTGTCC
NM_014208	DSPP	CAACCATAGAGAAAGCAAACGCG	TTTCTGTTGCCACTGCTGGGAC
NG_008988	DMP-1	GAGCAGTGAGTCATCAGAAGGC	GAGAAGCCACCAGCTAGCCTAT

6.3.8.2 Perfil de expresión génica de las SCAP expuestas a HOCl

Se evaluó el efecto de la exposición a HOCl en la expresión de 84 genes de autorenovación y pluripotencia sobre las SCAP con el estuche comercial “Human Mesenchymal Stem Cell PCR Array” Cat. PAHS-082 (RT² Profiler™ PCR Array, QIAGEN® Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. El MSC PCR Array detecta 84 genes descritos en la Tabla 2 y utiliza doce controles de calidad por ensayo: cinco genes constitutivos o housekeeping, un control de ADN genómico, tres controles de la transcripción reversa y tres controles positivos del PCR (Ver Anexo 3).

Tabla 2. Genes marcadores de Stemness en el PCR Array de QIAGEN®

Grupo funcional		Genes
Marcadores de Stemness		FGF2 (BFGF), INS, LIF, POU5F1 (Oct4), SOX2, TERT, WNT3A, ZFP42
Marcadores específicos de Células Stem Mesenquimales (MSCs)		ALCAM, ANPEP, BMP2, CASP3, CD44, ENG (EVI-1), ERBB2 (HER-2, NEU), FUT4, FZD9, ITGA6, ITGAV, KDR (VEGFR3), MCAM, NGFR, NT5E, PDGFRB, PROM1, THY1, VCAM1
Otros genes asociados con MSCs		ANXA5, BDNF, BGLAP, BMP7, COL1A1, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTNNB1, EGF, FUT1, GTF3A, HGF, ICAM1, IFNG, IGF1, IL10, IL1B, IL6, ITGB1, KITLG (SCF), MMP2, NES, NUDT6, PIGS, PTPRC, SLC17A5, TGFB3, TNF, VEGFA, VIM, VWF
Marcadores de diferenciación de MSC	Osteogénesis	BMP2, BMP6, FGF10, HDAC1, HNF1A, KDR (VEGFR3), PTK2 (FAK), RUNX2, SMURF1, SMURF2, TBX5.
	Adipogénesis	PPARG, RHOA, RUNX2
	Condrogénesis	ABCB1 (MDR1, PGY1), BMP2, BMP4, BMP6, GDF5 (CDMP-1), GDF6, GDF7, HAT1, ITGAX, KAT2B (PCAF), SOX9, TGFB1
	Miogénesis	ACTA2 (α-SMA), JAG1, NOTCH1
	Desarrollo de tendón	BMP2, GDF15 (PLAB), SMAD4 (MADH4), TGFB1

Se evaluaron dos condiciones de exposición al HOCl: 75ppm al minuto y 75ppm a los 15 minutos. Un cultivo de SCAP no tratadas fue utilizado como control para el cálculo de concentración relativa de cada gen. La extracción de RNA se realizó con el estuche comercial “RNeasy Mini Kit” Cat. 74104 de QIAGEN® (Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante y las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. El ARN fue cuantificado con el NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific™, EE. UU) a una longitud de onda de 260/280 y 260/230 nm.

El estuche comercial “Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) PCR Array” consiste en dos fases que se preparan independiente y consecutivamente: 1) síntesis del cDNA y 2) qPCR para la

detección de los 84 genes. En la primera fase se utiliza el "RT^2 First Strand kit" incluido en el MSC PCR Array para transformar el ARN en cDNA, se utilizó 1 µg de ARN para cada muestra. Se obtuvieron 110µL de cDNA, el cual fue almacenado a -20°C hasta el procesamiento del qPCR. La segunda fase consiste en la amplificación de los genes específicos de autorenovación y pluripotencia de las SCAP, en la cual se amplifica un gen por pozo es decir hay un par de primers específicos por gen por pozo. El ensayo utiliza la detección mediante SBYR® Green y el análisis de datos se realizó con el software gratuito "RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis", disponible online en http://saweb2.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php. El análisis de los datos se basa en el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2^-(Delta Delta CT)) y se considera significativo el aumento o disminución de 2-fold en la expresión génica (fold-regulation mayor a 2 y menor a -2). La eficiencia de las reacciones se calculó utilizando el programa LinRegPCR. Todos los experimentos se realizaron en el termociclador de tiempo real "CFX96™ Real-Time PCR Detection System" (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

6.3.9 Análisis de datos con STRING: Construcción de la red génica de asociaciones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el PCR array, los datos fueron depurados en Excel para seleccionar aquellos genes sobreexpresados (Fold regulation ≥2) y los expresados a la baja (Fold regulation ≤2). En ese orden, fueron sometidos al programa STRING versión 10.5 (http://string-db.org/) con el fin de establecer las redes génicas de asociación, procesos biológicos GO y vías de señalización KEGG que podrían estar involucradas en el mantenimiento de la viabilidad y pluripotencia de las SCAP y/o proliferación celular, después de haber sometido a las células a tratamientos con HOCl a 75 ppm durante 1 y 15 minutos.

6.3.10 Tinción Von Kossa

La tinción Von Kossa es un método de reducción de plata que demuestra fosfatos y carbonatos, pero estos generalmente están presentes junto con el calcio, por lo tanto, solo se puede demostrar el calcio que está unido a un anión (como PO4 o CO3). Con la tinción de hematoxilina (H&E), los depósitos de calcio se observan como lagunas de color azul-púrpura oscuro, generalmente con bordes filosos.

Con el fin de detectar si existía la presencia de nódulos de mineralización en las SCAP que habían sido expuestas al HOCl, se evaluaron tres concentraciones de la sustancia: 25, 50 y 75 ppm con pH 5.6, en dos tiempos, 1 y 15 minutos. El experimento se realizó en placa de cultivo de 24 pozos, se utilizaron 3 réplicas por cada condición de tratamiento y tres de control que eran SCAP que no fueron expuestas al HOCl. Para esto, las células se sembraron en laminillas de vidrio estériles las cuales fueron tratadas con poli-L-Lisina. Pasado este tiempo, se retiró la poli-L-Lisina y los pozos fueron lavados con agua destiladay se dejaron secar en la cabina de flujo aproximadamente 1 hora. Posteriormente se sembraron por pozo 5.000 SCAP en pase 8 en 50 µl de DMEM suplementado, se esperó 30 minutos a que se adhirieran, se agregaron 500 µl más de DMEM suplementado y se dejó en la incubadora a 5% de CO2, 95% de humedad relativa a 37°C. A las 48 horas se retiró el medio de los pozos, se lavaron con PBS y se agregaron las diluciones de HOCl a los tiempos previamente descritos. Una vez pasado cada tiempo de tratamiento, las diluciones se retiraron, se agregó DMEM suplementado y se dejaron las células en recuperación durante 48 horas. Pasado este tiempo, se lavaron las células tres veces con PBS, se fijaron con formaldehido al 10% durante 30 minutos y se lavaron nuevamente con PBS tres veces. Se agregó nitrato de plata al 5% a los pozos, se almacenó en un espacio oscuro durante 15 minutos y posteriormente se expusieron las células a luz ultravioleta durante 1 hora para que el calcio se redujera con la luz y fuera reemplazado con depósitos de plata, con el fin de poderlos visualizar bajo el microscopio (83). Finalmente se lavaron los pozos 3 veces con agua destilada y se retiró cada lámina de los pozos para llevarla a un portaobjetos y observarlo en el microscopio de luz.

6.4 Hipótesis de estudio

- El efecto citotóxico del HOCl es menor que el efecto citotóxico del NaOCl sobre las SCAP
- El ácido hipocloroso modula la expresión de genes del estado de auto-renovación y pluripotencia de las SCAP

6.5 Plan de tabulación y análisis

Para identificar si la concentración de HOCl y el tiempo de exposición tuvieron un efecto sobre la cantidad de SCAP en cada fase del ciclo celular se utilizó el modelo mixto lineal de medidas

repetidas. Este modelo también fue utilizado para evaluar si existía diferencia en la expresión de los genes evaluados con RT-PCR a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

La expresión de los genes de las SCAP se evaluó utilizando la herramienta en línea de Quiagen para el análisis automático de los datos del sistema del PCR array. El programa se basa en el cálculo del número de veces que se expresan los genes utilizando la fórmula ΔΔCt. La eficiencia de las reacciones se calculó utilizando el programa LingReg PCR.

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

7.1 Sustento legal

De acuerdo a las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud resolución Nº008430 de 1993 del Ministerio de Salud, la investigación que se realice en seres humanos será desarrollada conforme a los criterios CAPITULO 1 ARTICULO 6 y 7. Este trabajo se clasificó como Investigación sin riesgo de acuerdo al artículo 11 y contó con el aval del Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque (Anexo 1).

7.2 Consentimiento y asentimiento informado

Esta investigación contó con el consentimiento y asentimiento informado por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la resolución en los artículos 14 y 15 (Anexo 2).

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización de células stem mesenquimales de papila apical

8.1.1 Evaluación morfológica

El proceso de estandarización del cultivo celular se logró llevar a cabo con las células obtenidas a partir de seis muestras de papilas apicales de dos pacientes de género femenino de 15 años. A las 24 horas se observó que se adhirieron a la caja de cultivo, lo anterior fue verificado con microscopio invertido. En el pasaje 2 se tomaron microfotografías con microscopio de Luz (Figura 2).

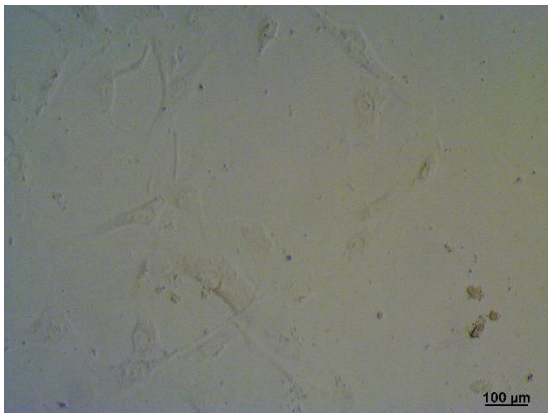


Figura 2. Microfotografía de las SCAP

Se realizó expansión del cultivo con las células obtenidas de un paciente y posteriormente fueron utilizadas para llevar a cabo los análisis propuestos en el estudio. Una vez iniciado el cultivo celular, este fue observado diariamente bajo microscopía invertida con el fin de evaluar la morfología celular. Se observaron las características del cultivo de las células stem mesenquimales, evidenciando su morfología fibroblastoide, adherencia al plástico y se observaron unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 3). A partir de la segunda semana se observó un gran número de células formando una monocapa celular confluente cubriendo la superficie de la caja de cultivo T-25 (Figura 4).

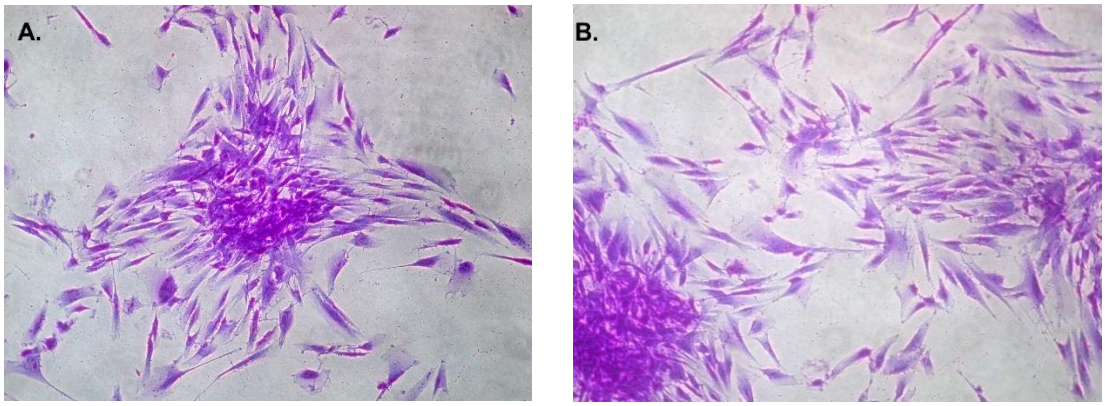


Figura 3. Unidades formadoras de colonias (UFC). Fotografías con microscopio invertido de las SCAP. Se observa morfología fibroblastoide y unidades formadoras de colonia (UFC), características de las células stem mesenquimales

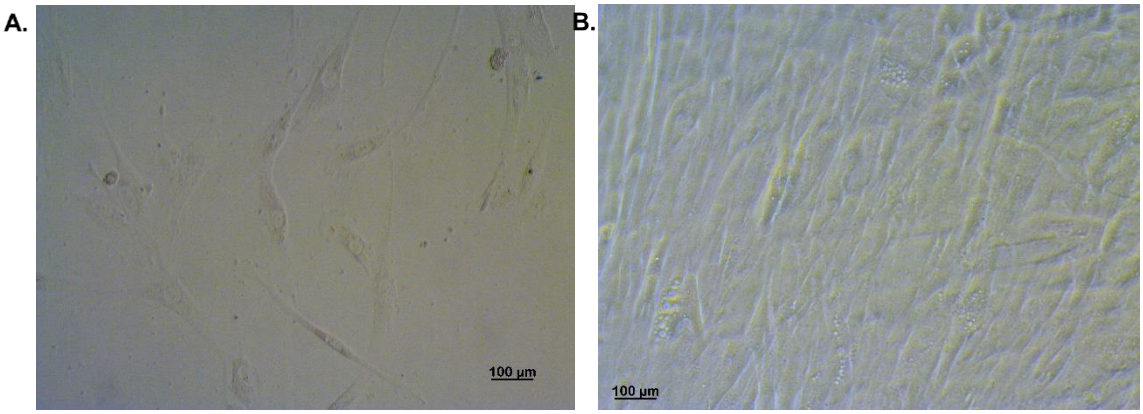


Figura 4. Fotografías de cultivo celular en monocapa. A) SCAP en la primera semana de cultivo, se observan células con morfología fibroblastoide. B) SCAP a la segunda semana de cultivo, se observa formación de la monocapa celular con un 90% de confluencia

8.1.2 Tiempo de doblaje poblacional

Una vez obtenidos los resultados de absorbancia en el espectofotómetro estos fueron normalizados con el blanco los cuales se detallan en la Tabla 3, los datos se ingresaron al software en línea Doubling Time, el cual permitió establecer el tiempo requerido para la duplicación o doblaje poblacional de las células SCAP el cual se calculó a las 40.24 horas (Figura 5).

Tabla 3. Resultados de las lecturas de absorbancia para establecer el tiempo de doblaje poblacional.

	0 horas	*24 horas*	*48 horas*	*72 horas*	*Control colorante*	*Control colorante*	*Promedio Control colorante*
A	7445	8585	12357	18900	1399	1868	
B	7222	8327	11755	19609	1381	1902	
C	7291	8460	12180	20441	1394	1906	
Promedio	**7319**	**8457**	**12097**	**19650**	**1391**	**1892**	**1642**
Promedio - Control	**5678**	**6816**	**10456**	**18008**			

Doubling Time = 40.24=ln(2)/0.0172
Growth Rate = 0.0172
Growth Rate = number of doublings that occur per unit of time
Equation : amount=4978.2912*$e^{0.0172*time}$
At t=0, calculated cell concentration = 4978.2912

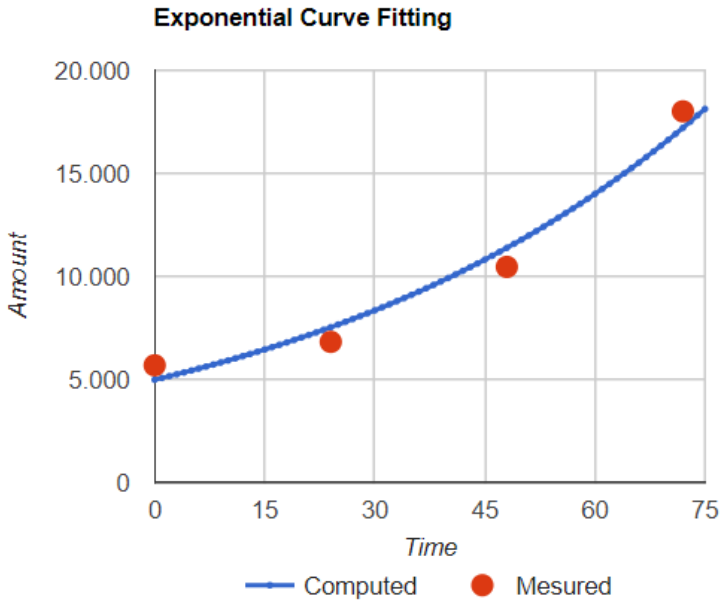


Figura 5. Tiempo de doblaje poblacional

8.1.3 Inmunofenotipificación de las SCAP

Se encontró que los tipos celulares evaluados expresaron los antígenos CD105+, CD90+ y CD73+, lo anterior corresponde a uno de los criterios que estableció la Sociedad Internacional de Terapia Celular en el 2006 para definir las células stem mesenquimales (28). El porcentaje de expresión del marcador CD105 de las SCAP fue del 88% y de las DPSC del 100%, del CD90 fue 98% y 94% respectivamente, y se observó una expresión del 100% del marcador CD73 en ambos tipos celulares. Por el contrario, se observó un bajo porcentaje de expresión por parte de las SCAP de antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45, con un 5.7% y 0.8% respectivamente. Con respecto al marcador de superficie CD146 se observó una baja expresión en las SCAP (12%) y en las DPSC no se evidenció expresión de este marcador (

Figura **6**). Estos resultados demuestran que las SCAP empleadas en este estudio eran células stem mesenquimales.

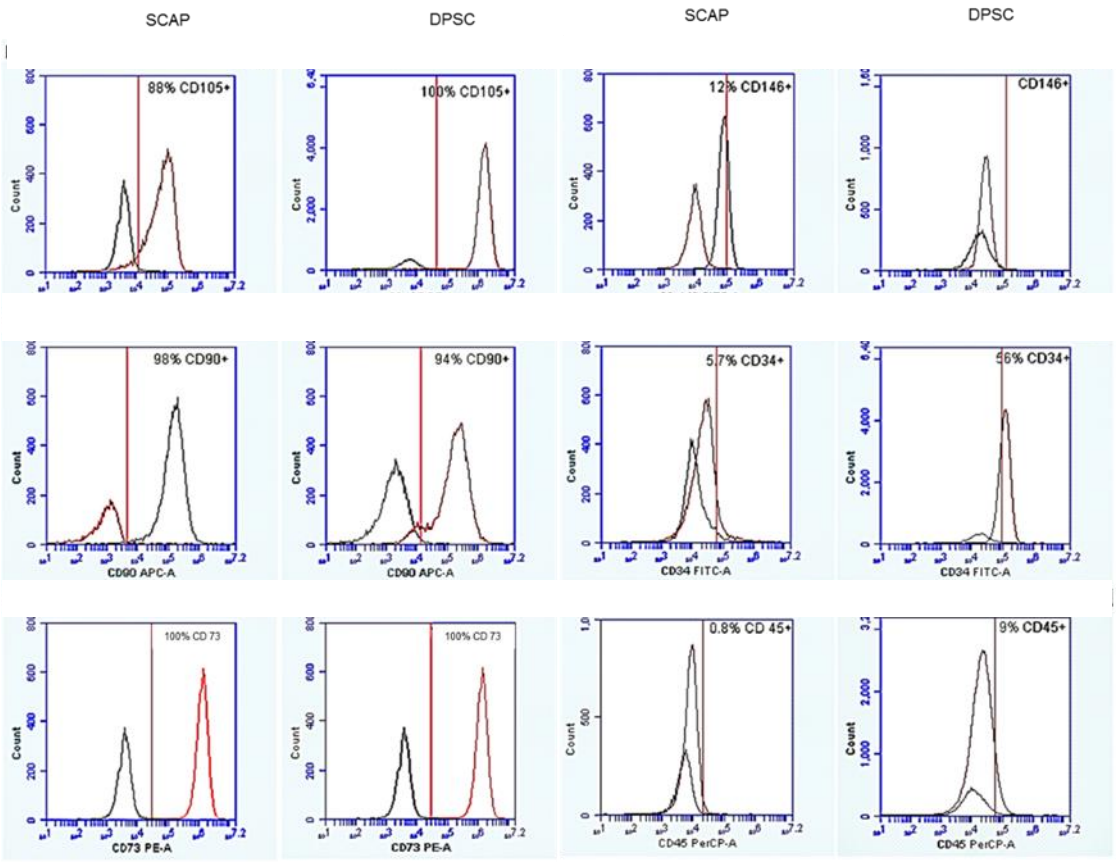


Figura 6. Histogramas de citometría de flujo de las SCAP. Se observan los porcentajes de expresión de las SCAP y de las DPSC.

8.2 Evaluación de la citotoxicidad del tratamiento con HOCl en las SCAP

8.2.1 Linealidad celular en cultivo de SCAP

La linealidad celular fue determinada mediante el método de resazurina en seis concentraciones de células (2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 células/pozo) por 48, 72 y 96 horas; se realizaron siete réplicas por cada condición. El análisis de los datos fue realizado por regresión lineal en el software estadístico GraphPad-Prism5® y se detalla en la Tabla 4 y Figura 7.

Todos los tiempos de incubación mostraron un aumento significativo en población celular ($p<0.0001$, en Tabla 4) lo cual confirma la proliferación celular bajo todas las condiciones evaluadas. El valor R^2 fue mayor a 0.8 en todos los casos con pendiente positiva. Las densidades celulares de 5000, 10000, 15000 y 20000 fueron las que mejor se ajustaron al modelo de linealidad. El metabolismo de la resazurina pareció ser constante en la concentración de 10000 células/pozo a las 48, 72 y 96 horas de incubación, lo cual sugiere un metabolismo eficiente del compuesto a su estado oxidado la resofurina. La confluencia celular de los cultivos fue del 80% a las 72 horas, indicando una adecuada supervivencia celular de las SCAP luego de ese tiempo de incubación y sin ningún estímulo para su activación.

Tabla 4. Resultados obtenidos del modelo de regresión lineal para el método de resazurina

Tiempo de incubación	Pendiente	Y-intercepto X=0.0	X-intercepto Y=0.0	R^2	Valor *p*
24 horas	27625 ± 503,7	-90495 ± 2020	3,276	0,9869	< 0,0001
48 horas	22128 ± 1374	-66742 ± 5510	3,016	0,8664	< 0,0001
72 horas	20430 ± 846,4	-63530 ± 3394	3,11	0,9358	< 0,0001

*Número de valores de X= 6; Número de valores de Y= 7; Número total de eventos= 42.

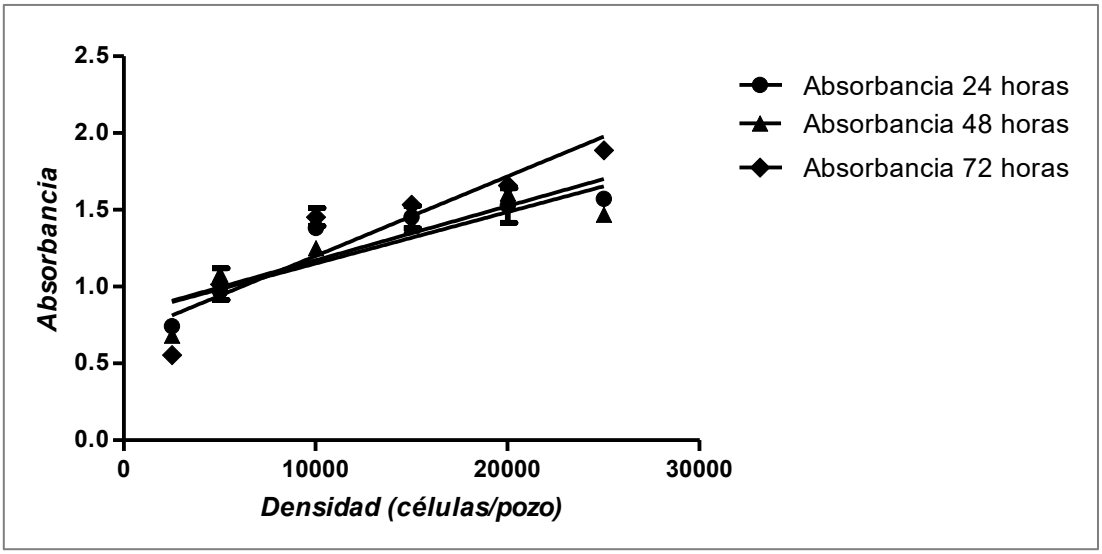


Figura 7. Determinación del rango de linealidad de las SCAP a 24, 48 y 72 horas utilizando el método de resazurina

8.2.2 Concentración letal 50 de las SCAP tratadas con HOCl

La concentración letal 50 (CL50) del HOCl sobre las SCAP fue evaluada en dos ensayos a diferentes concentraciones. La determinación de CL50 se realizó a las 48 horas posteriores al tratamiento con HOCl. En la Figura 8 se presenta la evaluación del porcentaje de viabilidad celular versus el logaritmo de la concentración de HOCl (Figura 8 A y C) y porcentaje de células viables en cada concentración de HOCl (Figura 8 B y D) para cada experimento.

Las primeras y mayores condiciones de concentración (Figura 8 A y B) no permitieron establecer la CL50 cuyo resultado fue 0.0 con un intervalo de confianza del 95% y valor de R^2 de 0.97. Mientras que el segundo experimento con menores concentraciones de HOCl (Figura 8 C y D) permitió establecer la CL50 en 133µM (~70 ppm) con un IC95% 110-137 µM (58-72 ppm), R^2 de 0.98.

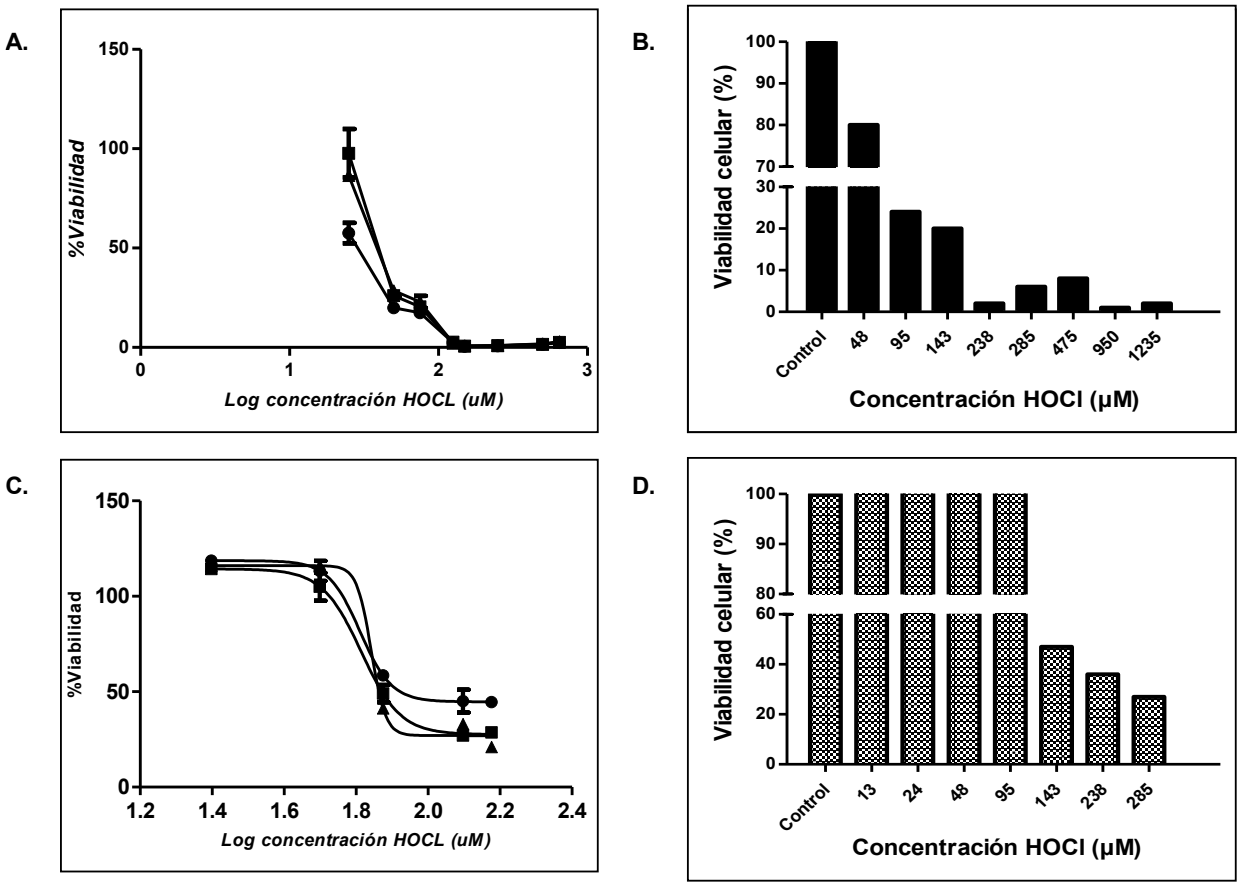


Figura 8. Evaluación de la actividad citotóxica del HOCl a pH 5,6 en las SCAP. A y B: Citotoxicidad del HOCl (CL50) pH 5.6 en ocho concentraciones 650ppm (1235µM), 500ppm (950µM), 250ppm (475µM), 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50 ppm (95µM) y 25ppm (48µM). C y D. CL50 del HOCl pH 5.6 a siete concentraciones 150ppm (285µM), 125ppm (238µM), 75ppm (143µM), 50ppm (95µM), 25ppm (48µM), 12.5ppm (24µM), 7ppm (13µM) y 3 ppm (6µM). Cada línea corresponde a una réplica del experimento.

8.3 Evaluación del tratamiento con HOCl sobre el ciclo celular de las SCAP

Para estimar el efecto del tratamiento con HOCl sobre las SCAP se realizó la determinación del ciclo celular por citometría de flujo. Nueve condiciones de tratamiento con HOCl fueron probadas (25, 50 y 75 ppm por 1, 15 y 30 minutos) por triplicado. Se determinó el número de células en cada estadío, los resultados se muestran el porcentaje por cada fase: G_0/G_1, S y G_2/M en la Tabla 5. La Figura 9 corresponde a un histograma representativo por cada condición de tratamiento.

En general, el tratamiento con HOCl tuvo una tendencia de inducción hacia la fase S del ciclo celular en todas las concentraciones y tiempos de exposición (Tabla 5). Inclusive la menor concentración y tiempo de tratamiento (25ppm por 1 min) aumentó el porcentaje de células en

fase S (Figura 9A; Tabla 5). Los mayores aumentos de población celular en esta fase ocurrieron en el tratamiento por 15 minutos a 25 y 50 ppm, con 48.9 y 46.76% respectivamente, correspondiente a un incremento con respecto al grupo control de 21% y 19% (Figura 9B y E; Tabla 5). El HOCl a 75ppm por 15 min indujo la mayor cantidad de células a la fase G_2/M con un 50.86% de la población celular esa fase (Figura 9 I; Tabla 5), seguida por el tratamiento a 50ppm por 1 min con 46.6% (Figura 9D; Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de SCAP en las fases de ciclo celular G_0/G_1, S y G_2/M tratadas con HOCl a las concentraciones y tiempos evaluados.

Tratamiento con HOCl	1 min			15 min			30 min		
	% G_0/G_1	% S	% G_2/M	% G_0/G_1	% S	% G_2/M	% G_0/G_1	% S	% G_2/M
25ppm [48µm]	58.44	39.87	1.68	35.98	48.90	15.13	25.28	45.99	28.73
50ppm [95µm]	18.97	34.43	46.60	20.91	46.76	32.32	45.23	39.30	15.46
75ppm [143µm]	37.80	43.74	18.46	15.79	33.36	50.86	37.38	41.78	20.85

SCAP Control (sin tratamiento): % G_0/G_1=56.63, % S=27.81, % G_2/M=15.56

Para identificar si la concentración de HOCl y el tiempo de exposición tuvieron un efecto sobre la cantidad de SCAP en las diferentes fases del ciclo celular, se utilizó el modelo mixto lineal utilizando los datos obtenidos de los 3 experimentos realizados. La Tabla 6 resume los resultados del modelo y se observa que en el análisis de la fase G_0/G_1 a una concentración de 50 ppm (p=0.001) y 75 ppm (p=0.007) de HOCl, la diferencia en la cantidad de células fue estadísticamente significativa. Con relación al factor tiempo, se observó una diferencia significativa después de los 30 minutos (p=0.03). También se encontró un efecto de interacción significativa en el nivel de concentración de 50 ppm y en un tiempo de 30 min (p=0.00).

Con respecto a la fase S, solo se observó que la concentración de 50 ppm (p=0.022) tuvo un efecto significativo en cantidad de células en esta fase. Con relación al factor tiempo, no se observó una diferencia significativa, y se identificó un efecto de interacción significativa en el nivel de concentración de 50 ppm y en los tiempos de 15 (p=0.009) y 30 min (p=0.006).

Finalmente, en la fase G_2/M solo se identificó un efecto de interacción significativa en las concentraciones de 50 ppm y 75 ppm en el tiempo de 30 minutos (p=0.024 y 0.037

respectivamente), sugiriendo que el ácido hipocloroso a concentraciones subletales no afecta el contenido de ADN y el ciclo celular de las SCAPS in vitro.

Tabla 6. Resultados análisis ciclo celular, modelo mixto de medidas repetidas

	Fase G_0/G_1		Fase S		Fase G_2/M	
Concentración	**Coef.**	**p**	**Coef.**	**p**	**Coef.**	**p**
50 ppm	-20,61723	0,001	16,578680	0,022	3,29000	0,462
75 ppm	10,73251	0,007	-3,784658	0,6	5,42333	0,225
Tiempo						
15 minutos	-1,40390	0,804	1,342009	0,813	2,68667	0,677
30 minutos	-12,62056	0,003	2,125343	0,681	13,11667	0
Concentración-Tiempo						
50 ppm - 15 minutos	15,71890	0,056	-23,275680	0,009	7,79667	0,359
50 ppm - 30 minutos	36,29390	0	-22,675340	0,006	-12,80667	0,024
75 ppm - 15 minutos			-6,588677	0,458	4,96667	0,6
75 ppm - 30 minutos			-5,350517	0,523	-11,34733	0,037

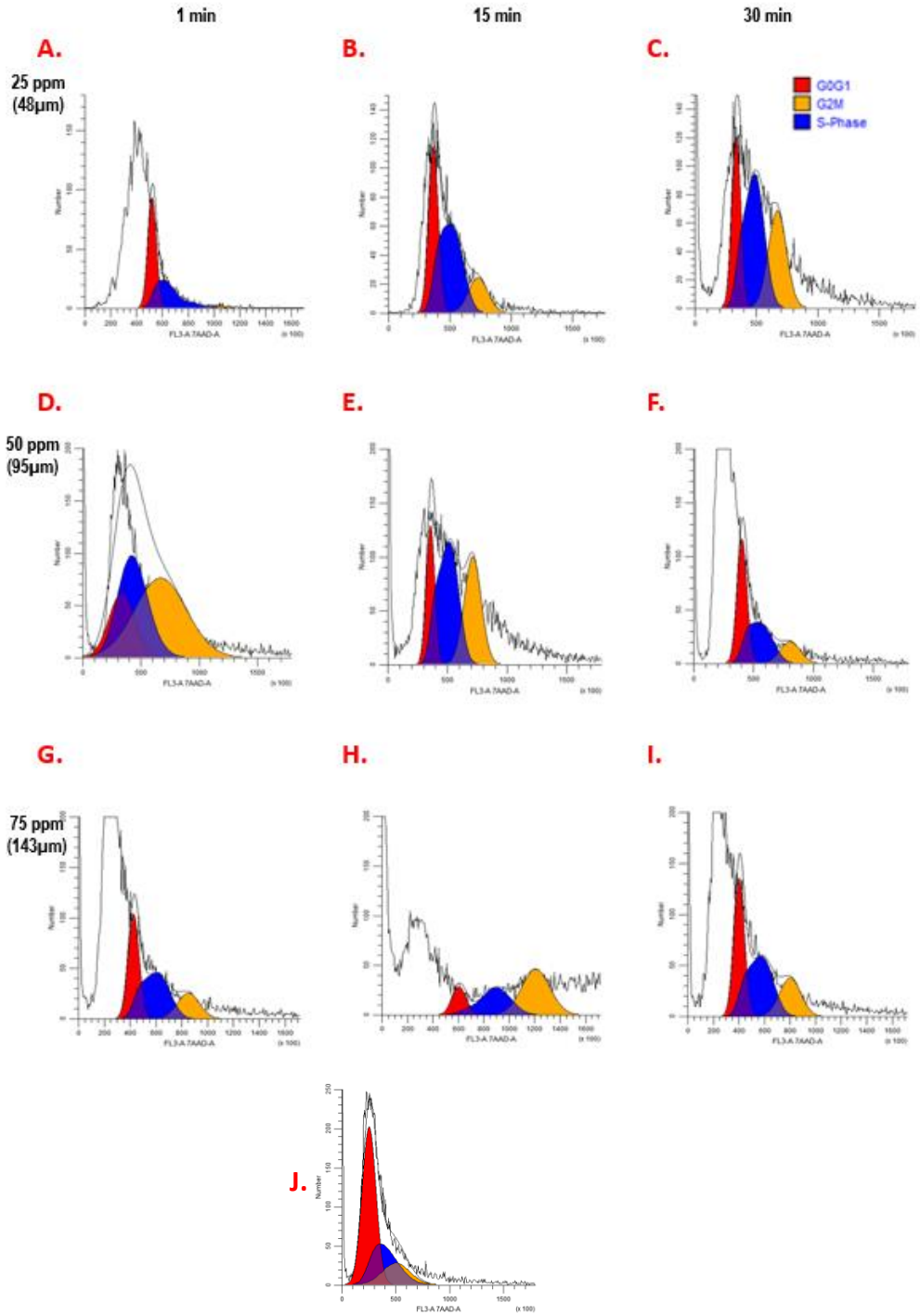


Figura 9. Análisis del efecto del HOCl sobre el contenido de ADN en SCAP evaluado por citometría de flujo. FaseG0/ G1 (Rojo), Fase G2/M (Amarillo) Fase S (Azul). A. SCAP tratadas con HOCl 25 ppm a 1 minuto de exposición. B. HOCl 25 ppm 15 minutos de exposición. C. HOCl 25 ppm 30 minutos de exposición. D. HOCl 50 ppm 1 minuto de exposición. E. HOCl 50 ppm 15 minutos de exposición. F. HOCl 50 ppm 30 minutos de exposición. G. HOCl 75 ppm 1 minuto de exposición. H. HOCl 75 ppm 15 minutos de exposición. I. HOCl 75 ppm 30 minutos de exposición. J. Control: células sin tratamiento.

8.4 Evaluación del efecto del ácido hipocloroso sobre los núcleos de las SCAP

En las células tratadas con HOCl a 25 ppm durante 15 minutos se observaron algunos núcleos con tinción irregular asociada a la presencia de cuerpos pequeños resaltados como resultado de la condensación de cromatina (Figura 10D), y solo unos pocos se observaban condensados y fragmentados (Figura 10F).

En las células tratadas con HOCl a 50 ppm se observó mayor cantidad de fluorescencia azul y condensación nuclear, especialmente en el grupo que fue tratado durante 1 minuto (Figura 10G y J).

Se evidenció una tinción de los núcleos más homogénea en las células tratadas con HOCl a 75 ppm, especialmente en el grupo tratado durante 1 minuto (Figura 10M).

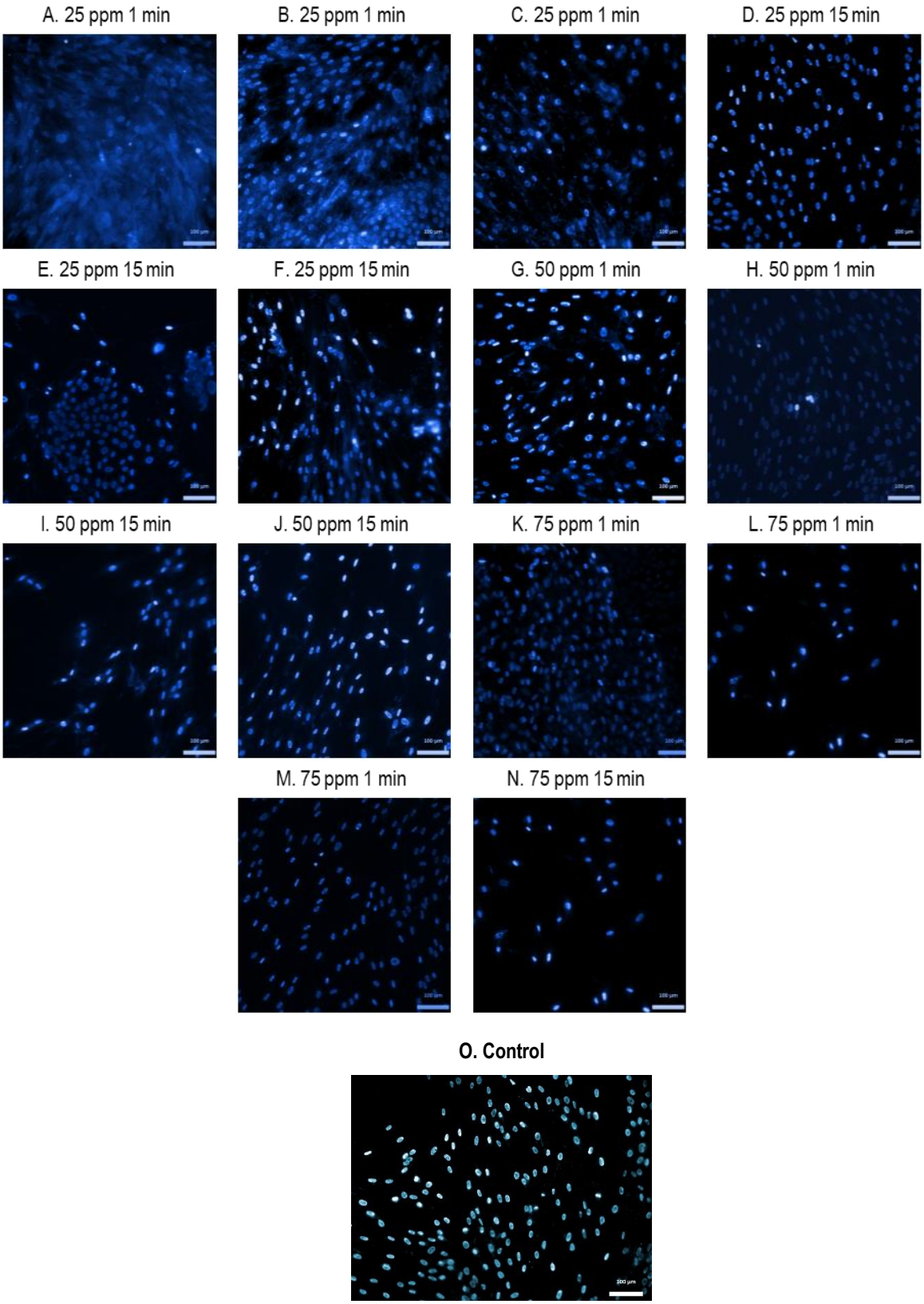


Figura 10. Tinción DAPI - SCAP tratadas con HOCl

8.5 Análisis de la actividad transcripcional de genes de autorenovación y pluripotencia de las SCAP en presencia del HOCl

Se realizó un experimento previo a la determinación del perfil de 84 genes de autorenovación y pluripotencia (ver detalles en sección 6.3.8) para verificar la expresión transcripcional de nueve genes en las SCAP sometidas a nueve condiciones de HOCl: tres concentraciones (25, 50 y 75ppm) a tres tiempos de exposición (1, 15 y 30 min) para validar las condiciones de exposición o tratamiento sobre el cultivo *in-vitro*. La determinación del perfil de expresión de genes de autorenovación y pluripotencia de las SCAP tratadas con HOCl se realizó con el MSC PCR Array en cultivos de estas células expuestas a dos condiciones de HOCl: 75 ppm por 1 y 15 minutos. A continuación, se presentan los resultados.

8.5.1 Evaluación de nueve genes en las SCAP sometidas a diferentes condiciones de HOCl

La verificación de expresión de algunos genes asociados a diferenciación osteogénica y odontogénica en las SCAP fue realizada mediante el ensayo qPCR One-Step. Se evaluaron nueve condiciones de tratamiento con HOCl, por triplicado. Las condiciones de HOCl fueron: 25ppm x 1 min, 15 min y 30min; 50ppm x 1 min, 15 min y 30min y 75ppm x 1 min, 15 min y 30min. En la Tabla 7 se detalla la expresión relativa normalizada para cada gen en cada condición. La expresión basal de cada gen se calculó de acuerdo a la expresión de GAPDH.

En general todas las condiciones de tratamiento con HOCl afectaron la expresión de los genes evaluados. La mínima concentración utilizada 25 ppm, generó la mayor sobreexpresión en los genes: OC, OP, OSX y RUNX2 siendo su expresión relativa mayor en todos los tiempos de exposición en comparación con las concentraciones de 50 y 75ppm. Por el contrario, el tratamiento con 50ppm solo generó cambios en la expresión relativa de ALP a los 15 minutos y de OSX y RUNX2 a los 15 y 30 minutos donde se expresó mayor cantidad relativa cada gen. En la concentración de 75ppm de HOCl se observó un aumento en la expresión de OSX en todos los tiempos de exposición y disminución a los 30 minutos de ALP, OC, OP y RUNX2. Las menores expresiones génicas de p53 se observaron en las células tratadas con HOCl a 25 y 75 ppm a los 15 minutos.

Con relación a la expresión de DSPP y DMP-1 se sobreexpresó en el grupo de tratamiento a 75 ppm en los tres tiempos de exposición, especialmente a 1 y 15 minutos.

Por otro lado, p53 mostró una sobreexpresión en las SCAP tratadas con 25 ppm de HOCl durante 1 minuto y en las sometidas a la concentración de 75 ppm durante 30 minutos. Este gen tuvo una expresión a la baja en las SCAP expuestas durante 15 minutos a las dos concentraciones anteriormente nombradas (Figura 11).

Con el análisis estadístico realizado se observó una diferencia significativa en la expresión de OSX ($p=0.017$) (Tabla 8). Así mismo, se pudo identificar que la concentración de 50 ppm de HOCl a 15 min ($p=0.095$) y especialmente a 30 minutos ($p=0.04$), mostró una mayor expresión de los genes (Tabla 9).

Tabla 7. Expresión de nueve genes de SCAP por qPCR

Gen	[HOCl] en ppm	Tiempo de exposición (min)	Relative Normalized Expression	Regulación génica
ALP	25	1	8220,463	Up-regulated
		15	0,040	Down-regulated
		30	0,000	Down-regulated
	50	1	0,987	No-change
		15	94,639	Up-regulated
		30	0,000	No-change
	75	1	1,219	No-change
		15	0,621	No-change
		30	0,127	Down-regulated
COL1	25	1	0,654	No-change
		15	0,000	No-change
		30	0,000	No-change
	50	1	1,198	No-change
		15	0,000	No-change
		30	0,000	No-change
	75	1	1,329	No-change
		15	1,314	No-change
		30	0,334	No-change
OC	25	1	6,538	Up-regulated
		15	58,011	Up-regulated
		30	0,405	No-change
	50	1	0,000	No-change
		15	0,000	No-change
		30	0,000	No-change
	75	1	1,141	No-change
		15	1,274	No-change
		30	0,224	Down-regulated
OP	25	1	11790,810	Up-regulated
		15	1548,560	Up-regulated
		30	51,971	Up-regulated
	50	1	0,000	No-change
		15	0,000	No-change
		30	0,000	No-change
	75	1	0,397	No-change
		15	0,728	No-change
		30	0,113	Down-regulated
OSX	25	1	2,475	No-change
		15	1668,898	Up-regulated
		30	11086,749	Up-regulated
	50	1	1,347	No-change
		15	3932039,458	Up-regulated
		30	210073,647	Up-regulated
	75	1	10,706	Up-regulated
		15	41,585	Up-regulated
		30	24,978	Up-regulated

*Control de expresión: GAPDH

Continuación 7.

Gen	[HOCl] en ppm	Tiempo de exposición (min)	Relative Normalized Expression	Regulación génica
RUNX2	25	1	268,585	Up-regulated
		15	282,425	Up-regulated
		30	11,686	Up-regulated
	50	1	0,217	Down-regulated
		15	79946,388	Up-regulated
		30	131066,411	Up-regulated
	75	1	0,086	Down-regulated
		15	0,251	Down-regulated
		30	0,161	Down-regulated
DSPP	25	1	0,5689	Down-regulated
		15	0,12648	Down-regulated
		30	1,9865	No-change
	50	1	0,2345	Down-regulated
		15	0,34578	Down-regulated
		30	2,5678904	No-change
	75	1	35,87960584	Up-regulated
		15	156,8954838	Up-regulated
		30	2,89564732	Up-regulated
DMP-1	25	1	1,657395	No-change
		15	2,985782	Up-regulated
		30	2,9846574	Up-regulated
	50	1	0,324567	Down-regulated
		15	0,2345784	Down-regulated
		30	2,5634512	Up-regulated
	75	1	50,67435	Up-regulated
		15	234,657483	Up-regulated
		30	3,543769	Up-regulated
p53	25	1	15,874	Up-regulated
		15	0,003	Down-regulated
		30	1,797	No-change
	50	1	0,000	No-change
		15	0,000	No-change
		30	0,000	No-change
	75	1	2,933	Up-regulated
		15	0,003	Down-regulated
		30	12,311	Up-regulated

*Control de expresión: GAPDH

Tabla 8. Resultados análisis de expresión génica (RT-PCR), modelo mixto lineal de medidas repetidas

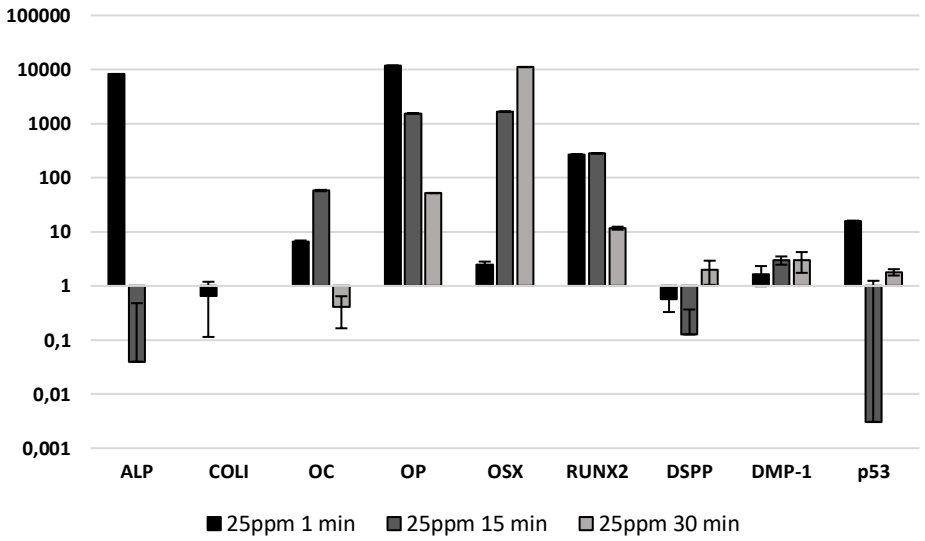
Genes	Coef.	p
ALP	28998,84	0,89
COL1	43949,74	0,85
OC	81084,41	0,71
OP	83305,24	0,71
OSX	461660,1	0,017
p53	81078,63	0,71
RUNX2	23507,47	0,90
DSPP	21,38898	1,00
DMP-1	32,29178	1,00

Tabla 9. Resultados análisis de expresión génica en las diferentes concentraciones y tiempos evaluados, modelo mixto lineal de medidas repetidas

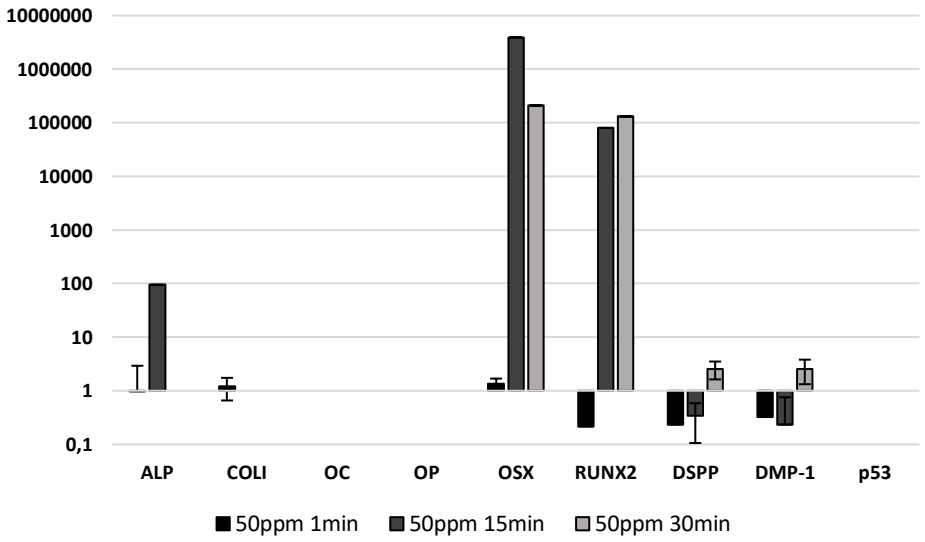
Concentración	Coef.	p
50 ppm	-2030,10	0,117
75 ppm	-2020,33	0,085
Tiempo		
15 minutos	-1635,08	0,995
30 minutos	-791,02	0,956
Concentración-Tiempo		
50 ppm - 15 minutos	670314,70	0,095
50 ppm - 30 minutos	69019,52	0,004
75 ppm - 15 minutos	1668,38	0,996
75 ppm - 30 minutos	785,05	0,968

Figura 11. Expresión de nueve genes por qPCR en SCAP sometidas a tres concentraciones de HOCl durante 1, 15 y 30 minutos. **A.** 25 ppm de HOCl; **B.** 50 ppm de HOCl; **C.** 75 ppm de HOCl

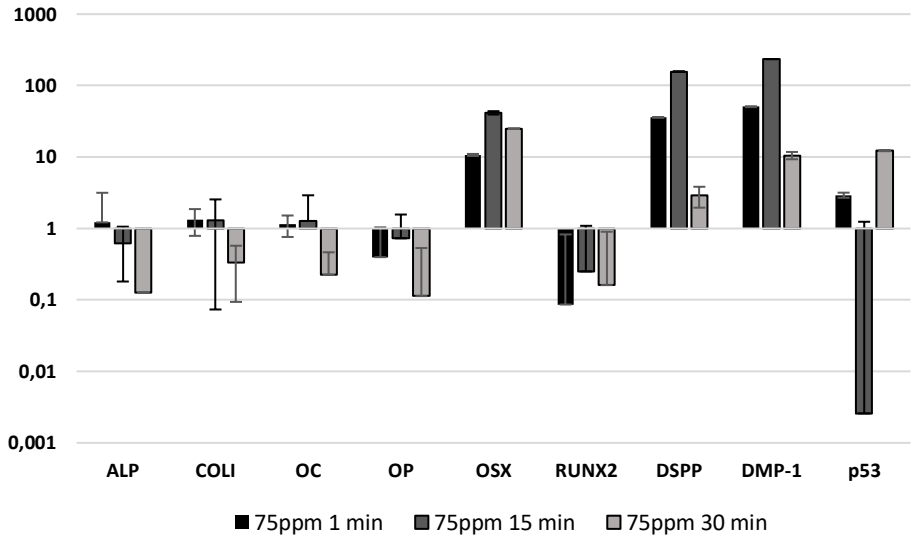
A.



B.



C.



8.5.2 Perfil de expresión génica de las SCAP expuestas a HOCl

De los 84 genes evaluados en el MSC PCR Array en las SCAP tratadas con HOCl a 75ppm por 1 y 75ppm por 15 minutos, 32 y 43 genes respectivamente tuvieron al menos un cambio de 2-fold (fold-regulation mayor a 2 y menor a -2) en su expresión al comparar células tratadas y no tratadas. La condición de 75ppm por 1 minuto generó una sobreexpresión en nueve de 32 genes, mientras que los 23 restantes tuvieron una expresión a la baja en las SCAP tratadas (ver Tabla 10). En la segunda condición de tratamiento, 75 ppm por 15 minutos, hubo sobreexpresión de 26 genes versus 17 genes que tuvieron expresión a la baja (ver Tabla 11).

Los 9 genes que tuvieron expresión a la alta en el grupo de tratamiento de 1 minuto, también mostraron una sobrexpresión en las SCAP tratadas durante 15 minutos. Por otra parte, los 17 genes expresados a la baja en las SCAP sometidas al HOCl durante 15 minutos, también tuvieron una expresión a la baja en el grupo de tratamiento de 1 minuto.

En la condición de HOCl a 75ppm por 15 minutos ocurrieron los mayores aumentos en la expresión de genes de diferenciación, un total de 11 de los 26 genes sobre-expresados representan marcadores de diferenciación de células stem mesenquimales (SMURF2, SMAD4, RHOA, FGF10, KDR, HAT1, SOX9, ABCB1, SMURF1, BMP4 y GDF5). De éstos cuatro (SMURF1, SMURF2, FGF10 y KDR) son moléculas asociadas a osteogénesis. Los genes SMURF2 y FGF10 también estuvieron sobreexpresados en las SCAP tratadas con HOCl por 1 minuto. En ambas condiciones los genes asociados a pluripotencialidad y autorenovación fueron principalmente sobreexpresados, aunque en algunos se observó menor concentración relativa en las SCAP tratadas versus las no tratadas (Tabla 11).

El tratamiento de HOCl a 75ppm por 1 minuto provocó la mayor disminución en la expresión de genes de autorenovación y pluripotencia. Bajo esta condición 23 genes tuvieron una menor concentración relativa que su control sin tratamiento (NGFR, NUDT6, BDNF, GDF7, EGF, COL1A1, WNT3A, TGFB1, NES, TBX5, FZD9, KITLG, HNF1A, FGF2, FUT4, ENG, ICAM1, GDF15, ITGAX, JAG1, PIGS, ERBB2, KAT2B). Siete de los 23 genes son marcadores de diferenciación (TGFB1, TBX5, HNF1A, GDF15, ITGAX, JAG1, KAT2B) y dos de ellos con función en osteogénesis (TBX5, HNF1A) (Tabla 10).

Tabla 10. Cambios en la expresión de genes en las SCAP tratadas con HOCl 75 ppm por 1min

Gene	Fold Change at 1 min	Fold Regulation at 1 min	CT (average)		Función
			SCAP tratadas [75ppm x1min]	SCAP control	
IL6	13,6137	13,61	22,16	24,21	Otros genes de MSC
CTNNB1	6,8906	6,89	26,97	28,03	Otros genes de MSC
SMURF2	2,7874	2,79	27,25	27,01	Osteogénesis
ITGAV	2,7666	2,77	22,44	22,18	MSC
SMAD4	2,7191	2,72	24,68	24,4	Desarrollo de tendón
RHOA	2,6969	2,70	26,04	25,75	Adipogénesis
TERT	2,6840	2,68	24,99	24,69	Stemness
CASP3	2,4320	2,43	25,15	24,71	Otros genes de MSC
FGF10	2,2169	2,22	24,16	23,59	Osteogénesis
NGFR	0,4363	-2,29	23,62	20,7	MSC
NUDT6	0,4187	-2,39	22,39	19,41	Otros genes de MSC
BDNF	0,3601	-2,78	24,03	20,83	Otros genes de MSC
GDF7	0,3550	-2,82	27,52	24,3	Condrogénesis
EGF	0,3513	-2,85	23,1	19,87	Otros genes de MSC
COL1A1	0,3217	-3,11	22,19	18,83	Otros genes de MSC
WNT3A	0,2926	-3,42	25,81	22,31	Stemness
TGFB1	0,2805	-3,57	21,98	18,43	Condrogénesis y desarrollo de tendon
NES	0,2052	-4,87	25,96	21,95	Otros genes de MSC
TBX5	0,1859	-5,38	26,4	22,25	Osteogénesis
FZD9	0,1196	-8,36	35	30,21	MSC
KITLG	0,0051	-196,58	35	25,66	Otros genes de MSC
HNF1A	0,0048	-207,59	35	25,58	Osteogénesis
FGF2	0,0017	-593,01	24,13	13,19	Stemness
FUT4	0,0016	-625,07	35	23,99	MSC
ENG	0,0012	-835,00	35	23,57	MSC
ICAM1	0,0007	-1480,78	35	22,74	Otros genes de MSC
GDF15	0,0007	-1495,04	30,5	18,23	Desarrollo de tendón
ITGAX	0,0006	-1707,79	35	22,54	Condrogénesis
JAG1	0,0004	-2716,83	35	21,87	Miogénesis
PIGS	0,0002	-5103,24	35	20,96	Otros genes de MSC
ERBB2	0,0001	-6952,12	35	20,51	MSC
KAT2B	0,0001	-7221,99	35	20,46	Condrogénesis
GAPDH*	1,0000	1	20,17	18,45	Housekeeping gene

Tabla 11 Cambios en la expresión de genes en las SCAP tratadas con HOCl 75 ppm por 15 min

Gene	Fold Change at 15 min	Fold Regulation at 15 min	Ct (average)		Función
			SCAP tratadas [75ppm x15min]	SCAP control	
IL6	21,5672	21,567	22,16	24,21	Otros genes de MSC
CTNNB1	10,9163	10,916	26,97	28,03	Otros genes de MSC
SMURF2	4,4159	4,416	27,25	27,01	Osteogénesis
ITGAV	4,383	4,383	22,44	22,18	MSC
SMAD4	4,3077	4,308	24,68	24,4	Desarrollo de tendón
RHOA	4,2725	4,273	26,04	25,75	Adipogénesis
TERT	4,252	4,252	24,99	24,69	Stemness
CASP3	3,8529	3,853	25,15	24,71	Otros genes de MSC
FGF10	3,5121	3,512	24,16	23,59	Osteogénesis
KDR	3,0598	3,060	25,46	24,68	Osteogénesis y MSC
HAT1	2,9289	2,929	24,07	23,23	Condrogénesis
CD44	2,8282	2,828	23,59	22,7	MSC
SOX9	2,7998	2,800	25,51	24,6	Condrogénesis
ANPEP	2,6446	2,645	24,25	23,26	MSC
ABCB1	2,6006	2,601	24,62	23,62	Condrogénesis
ITGA6	2,5483	2,548	23,4	22,36	MSC
PTPRC	2,4524	2,452	21,14	20,05	Otros genes de MSC
IFNG	2,4277	2,428	22,29	21,18	Otros genes de MSC
ZFP42	2,3866	2,387	27,16	26,03	Stemness
SMURF1	2,3828	2,383	21,45	20,31	Osteogénesis
CSF2	2,2753	2,275	20,61	19,41	MSC
ALCAM	2,265	2,265	24,26	23,05	MSC
BMP4	2,1854	2,185	25,57	24,31	Condrogénesis
GDF5	2,135	2,135	21,7	20,41	Condrogénesis
PDGFRB	2,0344	2,034	24,64	23,28	MSC
POU5F1	2,032	2,032	24,52	23,15	Stemness
WNT3A	0,4636	-2,157	25,81	22,31	Stemness
TGFB1	0,4444	-2,250	21,98	18,43	Condrogénesis
NES	0,3251	-3,076	25,96	21,95	Otros genes de MSC
TBX5	0,2945	-3,395	26,4	22,25	Osteogénesis
FZD9	0,1895	-5,277	35	30,21	MSC
KITLG	0,0081	-124,084	35	25,66	Otros genes de MSC
HNF1A	0,0076	-131,038	35	25,58	Osteogénesis
FGF2	0,0027	-374,320	24,13	13,19	Stemness
FUT4	0,0025	-394,556	35	23,99	MSC
ENG	0,0019	-527,069	35	23,57	MSC
ICAM1	0,0011	-934,701	35	22,74	Otros genes de MSC
GDF15	0,0011	-943,702	30,5	18,23	Desarrollo de tendón
ITGAX	0,0009	-1077,996	35	22,54	Condrogénesis
JAG1	0,0006	-1714,924	35	21,87	Miogénesis
PIGS	0,0003	-3221,276	35	20,96	Otros genes de MSC
ERBB2	0,0002	-4388,326	35	20,51	MSC
KAT2B	0,0002	-4558,675	35	20,46	Condrogénesis
ACTB*	1	1,000	26,02	23,63	Housekeeping gene

8.6 Análisis de datos con STRING: Construcción de la red génica de asociaciones

En la Tabla 12 se presentan los genes sobreexpresados y los expresados a la baja de las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos. Se realizó un análisis en el programa STRING con el fin de identificar los procesos biológicos GO y vías de señalización KEGG asociados a las expresiones génicas, así como las interacciones de estos genes. Las figuras obtenidas de STRING permiten evidenciar los nodos que representan los genes y las líneas representan asociaciones entre ellos, las cuales son específicas y significativas, es decir que contribuyen conjuntamente a una función compartida. El color de las líneas observadas en las figuras de las redes indica el tipo de evidencia de interacción, y las fuentes de interacción activa seleccionadas fueron minería de datos, experimentos, bases de datos, co-expresión, genes conservados, genes fusionados y co-ocurrencia. Con relación a la puntuación de interacción mínima requerida para la conformación de la red, se seleccionó una confianza media (0.400).

Tabla 12. Genes sobreexpresados y expresados a la baja en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

	SCAP + HOCl 75 ppm - 1 minuto		**SCAP + HOCl 75 ppm - 15 minutos**	
Genes Sobreexpresados	9	IL6, CTNNB1, SMURF2, ITGAV, SMAD4, RHOA, TERT, CASP3, FGF10	26	IL6, CTNNB1, SMURF2, ITGAV, SMAD4, RHOA, TERT, CASP3, FGF10, KDR, HAT1, CD44, SOX9, ANPEP, ABCB1, ITGA6, PTPRC, IFNG, ZFP42, SMURF1, CSF2, ALCAM, BMP4, GDF5, PDGFRB, POU5F1
Genes Expresados a la baja	23	NGFR, NUDT6, BDNF, GDF7, EGF, COL1A1, WNT3A, TGFB1, NES, TBX5, FZD9, KITLG, HNF1A, FGF2, FUT4, ENG, ICAM1, GDF15, ITGAX, JAG1, PIGS, ERBB2, KAT2B	17	WNT3A, TGFB1, NES, TBX5, FZD9, KITLG, HNF1A, FGF2, FUT4, ENG, ICAM1, GDF15, ITGAX, JAG1, PIGS, ERBB2, KAT2B

En la Tabla 13 se pueden observar las estadísticas de interacción de los análisis realizados en STRING con los genes sobreexpresados y aquellos con baja expresión, teniendo en cuenta la configuración predeterminada en el programa. Así mismo, se evidencian la cantidad total de procesos biológicos obtenidos; y aquellos asociados a morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogénesis, extraídos del total de procesos biológicos observados. Por otra parte, en la Tabla 13 se identifican el total de vías de señalización KEGG obtenidas en el análisis, y aquellas relacionadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de las células stem dentales (DSC) en el diente en desarrollo y durante la edad adulta.

Tabla 13. Resultados obtenidos en el programa STRING durante el análisis de los genes sobre expresados y con baja expresión de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

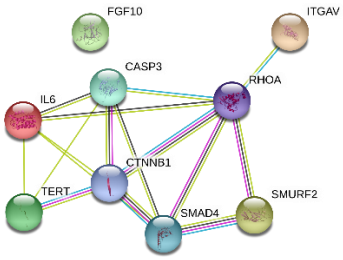
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 min		SCAP + HOCl 75 ppm 15 min	
	Genes Sobre-expresados	**Genes Expresados a la baja**	**Genes Sobre-expresados**	**Genes Expresados a la baja**
Número de nodos	9	23	26	17
Número de bordes	16	63	102	37
Grado promedio de nodo	3.56	5.48	7.85	4.35
Prom. Coeficiente de agrupamiento local	0.73	0.625	0.693	0.561
Número esperado de bordes	6	12	26	7
Valor de p del enriquecimiento en la red de interacciones proteína - proteína	0.000364	< 1.0e-16	<1.0e-16	2.22e-16
Procesos Biológicos - PB (Total)	222	297	594	199
PB - Morfogénesis	5	7	7	7
PB - Proliferación	3	3	9	4
PB - Diferenciación	4	10	9	7
PB - Odontogénesis	1	1	2	0
Vías de señalización KEGG (Total)	24	33	49	9
Vías KEGG relacionadas con DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta	4	4	4	1

Al observar las interacciones de los genes sobreexpresados y aquellos expresados a la baja se encontró que las fuentes de interacción fueron aquellas de evidencia conocida, provenientes de bases de datos curadas y determinadas experimentalmente; y otras como extracción de textos, co-expresión y homología de proteínas, esta última solo en la red de genes expresados a la alta en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos. La gran mayoría de fuentes de interacción fueron las provenientes de extracción de textos. Por el contrario, ninguna de las redes mostró fuentes de interacción provenientes de evidencia de co-ocurrencia genética, fusiones de genes y genes conservados (Figura 12).

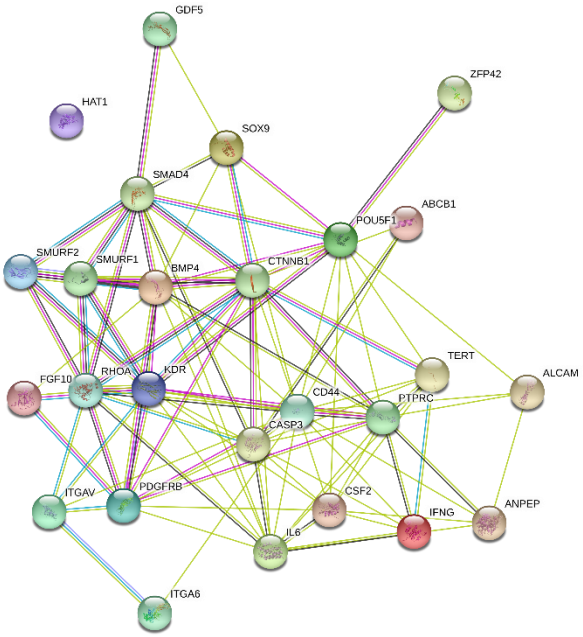
En la Figura 12A se puede observar que no existe evidencia de interacción entre el gen FGF10 y los otros genes sobreexpresados en las SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 1 minuto; a diferencia del grupo de tratamiento durante 15 minutos en donde se observa interacción entre este gen y otros que mostraron expresión a la alta (Figura 12B). En este último grupo, se observa que el gen HAT1 está fuera de la red de interacciones (Figura 12B), lo anterior también se evidencia con el gen GDF15 que mostró una expresión a la baja tanto en el grupo de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, como aquellas expuestas al tratamiento durante 15 minutos (Figura 12C y D).

Figura 12. Red de interacciones de los genes sobreexpresados (**A** y **B**) y expresados a la baja (**C** y **D**) en las SCAP expuestas al HOCl a 75 ppm durante 1 y 15 minutos

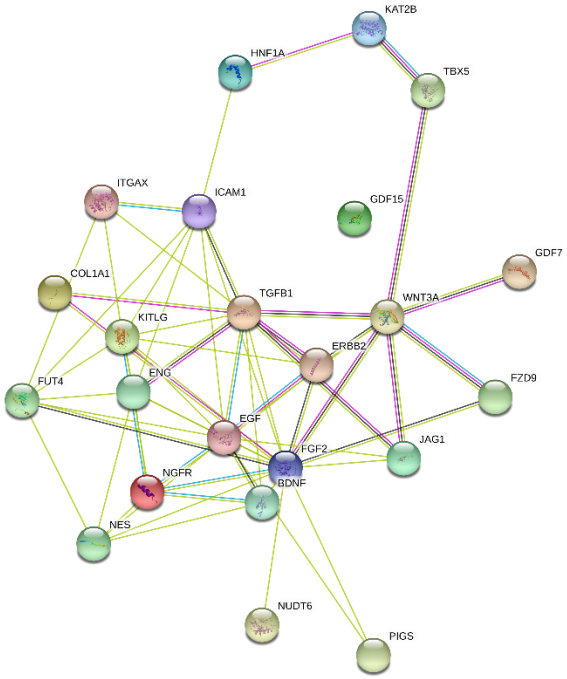
A. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



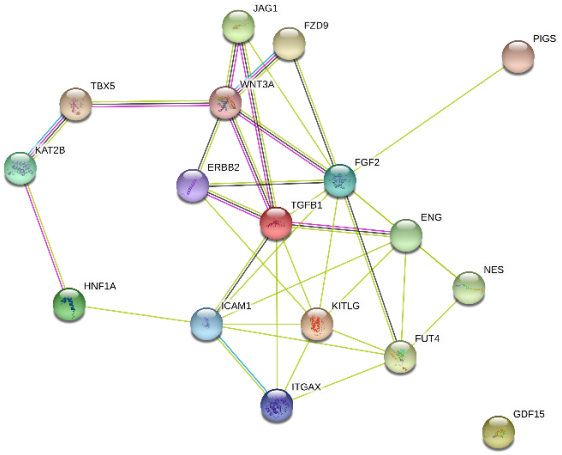
B. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



C. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



D. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



** El color de línea indica el tipo de evidencia de interacción:*

Interacciones conocidas
- De bases de datos curadas
- Determinado experimentalmente

Otros
- Extracción de textos
- Co-expresión
- Homología de proteínas

8.6.1 Procesos biológicos

Al ingresar al programa STRING los 26 genes sobreexpresados se encontraron 594 procesos biológicos asociados a las interacciones de estos genes, y 199 relacionados con los 17 genes expresados a la baja después de someter las SCAP a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos. En contraste con lo anterior, en las SCAP expuestas a la misma concentración de HOCl durante 1 minuto, el análisis de genes sobreexpresados mostró una relación con 222 procesos biológicos y aquellos expresados a la baja, con 297. En los resultados se pudieron identificar diversos procesos biológicos relacionados con morfogénesis, proliferación, diferenciación celular y odontogénesis, los cuales podrían ser de interés en el campo de la endodoncia regenerativa (Tabla 13).

En la Tabla 14 y Tabla 15 se describen cada uno de los genes que tuvieron una expresión a la alta y a la baja, información que se obtuvo de GenCards (http://www.genecards.org/), Genetics Home Reference (https://ghr.nlm.nih.gov/) y Gene database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term). Así mismo, se puede evidenciar la relación de cada uno de los genes con los procesos biológicos anteriormente nombrados. Se encontró que cuatro de los genes sobreexpresados: SMURF2, HAT1, ALCAM y POU5F1, no tuvieron relación con ningún proceso biológico (Tabla 14). Para los genes que mostraron expresión a la baja, cinco no se asociaron a los procesos biológicos seleccionados: NUDT6, FZD9, HNF1A, FUT4, PIGS (Tabla 15).

Tabla 14. Descripción de los genes sobreexpresados en SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 15 minutos, relacionados con procesos biológicos de morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogenesis

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
IL6 *Interleuquina 6* - Codifica una citocina cuya función se relaciona con procesos inflamatorios y maduración de las células B. La proteína codificada es un pirógeno endógeno capaz de inducir fiebre en personas con enfermedades o infecciones autoinmunes. La proteína se produce principalmente en sitios de inflamación aguda y crónica, donde se secreta en el suero e induce una respuesta inflamatoria transcripcional a través del receptor de interleuquina 6, alfa. El funcionamiento de este gen está implicado en una amplia variedad de estados patológicos asociados a la inflamación, incluida la sospecha de diabetes mellitus y artritis reumatoide juvenil sistémica	✔	✔	✔	✔	✔	
CTNNB1 *Beta Catenina 1* - Codifica una proteína llamada beta-catenina (β-Catenina) presente principalmente en las uniones que conectan las células vecinas (uniones adherentes). La β-Catenina desempeña un papel importante en la adhesión y comunicación celular. Esta proteína también está involucrada en la señalización celular como una parte esencial de la vía de señalización Wnt. Esta vía promueve el crecimiento y la división celular (proliferación), y ayuda a determinar las funciones especializadas que tendrá una célula (diferenciación). La vía de señalización Wnt en los tejidos adultos desempeña un papel en el mantenimiento y la renovación de las células stem. La β-catenina puede promover la diferenciación, especialmente hacia los linajes de células mesodérmicas	✔	✔	✔	✔	✔	✔
ITGAV *Subunidad de integrina alfa V* - El producto de este gen pertenece a la familia de la cadena alfa integrina. Las integrinas son proteínas de membrana integrales heterodiméricas compuestas por una subunidad alfa y una subunidad beta que funcionan en la adhesión y señalización de la superficie celular. La preproproteína codificada se procesa proteolíticamente para generar cadenas ligeras y pesadas que comprenden la subunidad alfa V. Esta integrina puede regular la angiogénesis y la progresión del cáncer	✔	✔	✔	✔	✔	

Continuación Tabla 14

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
SMAD4 *SMAD miembro de la familia 4* - Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas de transducción de señales Smad. Las proteínas Smad están implicadas en la regulación de la señal de transducción del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Actúa como un supresor tumoral e inhibe la proliferación de células epiteliales. Puede tener un efecto inhibitorio sobre los tumores al reducir la angiogénesis y aumentar la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos. La proteína codificada es un componente crucial de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea.	✔	✔	✔	✔	✔	
RHOA *Miembro de la familia de homólogos de Ras A* - Este gen codifica un miembro de la familia Rho de pequeñas GTPasas, que ciclan entre estados inactivos vinculados a GDP y activos unidos a GTP y funcionan como interruptores moleculares en cascadas de transducción de señales. Las proteínas Rho promueven la reorganización del citoesqueleto de actina y regulan la forma, adherencia y motilidad celular. La sobreexpresión de este gen está asociada con la proliferación celular.	✔	✔	✔	✔	✔	
TERT *Telomerasa transcriptasa inversa* - El gen TERT proporciona instrucciones para producir un componente de la enzima telomerasa. Esta enzima se encarga del mantenimiento de los telómeros. La telomerasa es muy activa en células que se dividen rápidamente y permite que estas se dividan muchas veces sin dañarse ni sufrir apoptosis.	✔	✔		✔		
CASP3 *Caspasa 3* - La proteína codificada por este gen es una enzima perteneciente a las cistein-proteasas que desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis.	✔	✔	✔	✔	✔	
FGF10 *Factor de crecimiento de fibroblastos 10* - La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de la familia de FGF poseen amplias actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento y la invasión tumoral. Este gen también es considerado un factor primario en el proceso de curación de heridas	✔	✔	✔		✔	✔

Continuación Tabla 14

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
KDR *Receptor del dominio de inserción de quinasa* - Este gen codifica uno de los dos receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este receptor funciona como mediador en la regulación de la angiogénesis, el desarrollo vascular, la permeabilidad vascular y la hematopoyesis embrionaria. Promueve la proliferación, la supervivencia, la migración y la diferenciación de las células endoteliales. Promueve la reorganización del citoesqueleto de actina.		✔	✔	✔	✔	
CD44 *Molecula cd44*- La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión y migración celular. Es un receptor para el ácido hialurónico (HA) y también puede interactuar con otros ligandos, como la osteopontina, los colágenos y las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Esta proteína participa en una amplia variedad de funciones celulares que incluyen la activación de linfocitos, la recirculación y anidamiento (Homing), hematopoyesis y la metástasis tumoral.		✔	✔			
SOX9 *SRY-Box 9* - Proporciona instrucciones para producir una proteína que desempeña un papel crítico durante el desarrollo embrionario. La proteína SOX9 se une a regiones específicas del ADN y regula la actividad de otros genes, particularmente aquellos que controlan el desarrollo esquelético y la determinación del sexo, por lo tanto se denomina factor de transcripción. También actúa durante la diferenciación de los condrocitos.		✔	✔	✔	✔	
ANPEP Alanyl Aminopeptidase, membrana - La aminopeptidasa N se encuentra en la membrana microvillar renal y renal, y también en otras membranas plasmáticas. Los defectos en este gen parecen ser una causa de varios tipos de leucemia o linfoma		✔	✔		✔	
ABCB1 *ATP Binding Cassette Subfamilia B Miembro 1* - La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan varias moléculas a través de las membranas extra e intracelulares. Los genes ABC se dividen en siete subfamilias, esta proteína es un miembro de la subfamilia MDR / TAP, responsable de la disminución de la acumulación de fármacos en las células por lo tanto está involucrada en la resistencia a múltiples fármacos		✔		✔		

Continuación Tabla 14

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
ITGA6 *Subunidad de integrina alfa 6* - El gen que codifica un miembro de la familia de proteínas conocidas como integrinas de cadena alfa. Las integrinas son proteínas de membrana integrales heterodiméricas compuestas por una cadena alfa y una cadena beta que funcionan en la adhesión y señalización de la superficie celular.		✔	✔			✔
PTPRC *Proteina Tirosina Fosfatasa, Receptor Tipo C* - La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Las PTP son moléculas de señalización que regulan una variedad de procesos celulares que incluyen crecimiento celular, diferenciación, mitosis y transformación oncogénica. PTP es un regulador esencial de la señalización del receptor del antígeno de las células T y B.		✔	✔	✔	✔	
IFNG *Interferon Gamma* - Este gen codifica una citocina soluble que es un miembro de la clase de interferón tipo II. La proteína codificada es secretada por las células del sistema inmune tanto innato como adaptativo. La proteína activa es un homodímero que se une al receptor del interferón gamma que desencadena una respuesta celular a las infecciones virales y microbianas.		✔	✔	✔	✔	
ZFP42 Proteína del dedo de zinc ZFP42 – También conocido como Rex1, es un marcador conocido de pluripotencia, y generalmente se encuentra en células stem embrionarias indiferenciadas. Además de ser un marcador de pluripotencia, su regulación también es crítica para mantener un estado pluripotente. A medida que las células comienzan a diferenciarse, Rex1 se regula severa y abruptamente.		✔			✔	
SMURF1 *SMAD específica E3 ubiquitina proteína ligasa 1* – La nomenclatura SMURF1 proviene del inglés: SMAD ubiquitination regulatory factor (factor de ubiquitinación regulatoria de las proteínas SMAD). Este gen codifica una ubiquitina ligasa que es específica para regular el receptor de las proteínas SMAD en la vía de señalización celular de la proteína morfogenética ósea (BMP). Esta proteína desempeña un papel clave en la regulación de la motilidad celular, la señalización y la polaridad celular		✔	✔		✔	

Continuación Tabla 14

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
CSF2 *Factor estimulante de colonias 2* - La proteína codificada por este gen es una citocina que controla la producción, diferenciación y función de granulocitos y macrófagos.		✔		✔	✔	
BMP4 *Proteína morfogenética ósea 4* - Este gen codifica un ligando secretado por la superfamilia de proteínas TGF-beta (factor de crecimiento transformante-beta). Los ligandos de esta familia se unen a varios receptores TGF-beta, los cuales conllevan al reclutamiento y activación de factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica. La familia de los TGF-β tienen la capacidad de inducir fuertemente la formación de hueso nuevo, cartílago y tejido conjuntivo. En el desarrollo morfogénico de los dientes, BMP4 interviene en una primera fase, desde el engrosamiento epitelial hasta el estadio de brote y la primera condensación del mesenquima. Ayuda a regular la expresión de los genes Msx-1 y Msx-2 que determinan el patrón microscópico del órgano dentario a través de la regulación de distintas moléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular.		✔	✔	✔	✔	✔
GDF5 *Factor de diferenciación del crecimiento 5* - Este gen codifica un ligando secretado de la superfamilia de proteínas TGF-β. Los ligandos de esta familia se unen a varios receptores TGF-beta que conducen al reclutamiento y activación de los factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica. Esta proteína regula el desarrollo de numerosos tipos de tejidos y células, que incluyen cartílago, articulaciones, dientes y el crecimiento de axones y dendritas neuronales.		✔	✔	✔		
PDGFRB *Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas* - La proteína codificada por este gen es un receptor de tirosina quinasa de superficie celular para miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Estos factores de crecimiento son mitógenos para las células de origen mesenquimal. Este gen es esencial para el desarrollo normal del sistema cardiovascular y ayuda en la reorganización del citoesqueleto de actina. Las vías de señalización estimuladas por la proteína PDGFRβ controlan muchos procesos importantes en la célula, como el crecimiento y la división (proliferación), el movimiento y la supervivencia. La señalización de la proteína PDGFRβ es importante para el desarrollo de muchos tipos de células en todo el cuerpo.		✔	✔	✔	✔	

Continuación Tabla 14

Gen Nombre / Descripción	Sobre-expresión		Procesos biológicos			
	SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
SMURF2 *Proteína E3 ligasa de ubiquitina tipo 2 SMAD específica* - Entre sus vías relacionadas están el metabolismo de las proteínas y el sistema inmune innato.	✔	✔				
HAT1 *Histona Acetiltransferasa 1* – La proteína codificada por este gen es una histona de tipo B acetiltransferasa (HAT) que está involucrada en la acetilación rápida de histonas citoplasmáticas recién sintetizadas, que a su vez se importan en el núcleo para la deposición de novo en cadenas de ADN nacientes. La acetilación de histonas, particularmente de la histona H4, desempeña un papel importante en el ensamblaje de cromatina dependiente de la replicación.		✔				
ALCAM *Molécula de Adherencia de Células de Leucocitos Activada* - Este gen codifica la molécula de adhesión celular activada de leucocitos (ALCAM), también conocida como CD166 (grupo de diferenciación 166). Esta proteína se une al antígeno CD6 de diferenciación de células T y está implicada en los procesos de adhesión y migración celular.		✔				
POU5F1 *POU clase 5 Homeobox 1* - Este gen codifica un factor de transcripción que contiene un homeodominio POU que desempeña un papel clave en el desarrollo embrionario y la pluripotencia de células stem.		✔				

Tabla 15. Descripción de los genes con expresión a la baja en SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 15 minutos, relacionados con procesos biológicos de morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogénesis

Gen	Descripción	Expresión a la baja		Procesos biológicos			
		SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
NGFR	*Receptor del factor de crecimiento nervioso* - Puede mediar en la supervivencia celular, así como en la muerte celular de células neuronales. Contribuye a la regulación de la absorción de glucosa dependiente de insulina	✔		✔	✔	✔	✔
BDNF	*Factor neurotrófico derivado del cerebro* - Proporciona instrucciones para producir una proteína que se encuentra en el cerebro y la médula espinal llamada factor neurotrófico derivado del cerebro. Esta proteína promueve la supervivencia de las neuronas desempeñando un papel en el crecimiento, la maduración (diferenciación) y el mantenimiento de estas células. La proteína BDNF se encuentra en regiones del cerebro que controlan la comida, la bebida y el peso corporal; la proteína probablemente contribuye al manejo de estas funciones. Este gen puede desempeñar un papel en la regulación de la respuesta al estrés y en la biología de los trastornos del estado de ánimo.	✔		✔	✔	✔	
GDF7	*Factor de diferenciación del crecimiento 7* - Este gen codifica un ligando secretado de la superfamilia de proteínas TGFβ. Los ligandos de esta familia se unen a varios receptores TGFβ que conducen al reclutamiento y activación de los factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica. Esta proteína puede desempeñar un papel en la diferenciación de las células tendinosas y las interneuronas de la médula espinal.	✔		✔		✔	
EGF	*Factor de crecimiento epidérmico* - Este gen codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico. Esta proteína actúa como un potente factor mitógeno que juega un papel importante en el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de numerosos tipos de células.	✔		✔		✔	
COL1A1	*Colágeno tipo I cadena alfa 1* - Este gen codifica las cadenas pro-alfa1 del colágeno tipo I cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa1 y una cadena alfa2. El tipo I es un colágeno formador de fibrillas que se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos y es abundante en huesos, córnea, dermis y tendones. El colágeno tipo I es la forma más abundante de colágeno en el cuerpo humano.	✔		✔		✔	

Continuación Tabla 15

Gen	Descripción	Expresión a la baja		Procesos biológicos			
		SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
WNT3A	*Miembro de la familia Wnt 3A* - La familia de genes WNT codifican proteínas de señalización implicadas en la oncogénesis y en varios procesos de desarrollo, incluida la regulación del destino celular y el patrón durante la embriogénesis.	✔	✔	✔	✔	✔	
TGFB1	*Factor de crecimiento transformante beta 1* – Codifica la proteína TGFβ-1, la cual desencadena señales químicas que regulan diversas actividades intracelulares, incluyendo el crecimiento y división (proliferación) celular, la maduración de células para llevar a cabo funciones específicas (diferenciación), movimiento celular (motilidad) y control de muerte celular (apoptosis). Aunque se encuentra en todo el cuerpo, es particularmente abundante en los tejidos que forman el esqueleto, donde ayuda a regular la formación y crecimiento de hueso y cartílago. TGFβ-1 también participa en la formación de vasos sanguíneos, desarrollo de tejido muscular y grasa corporal, curación de heridas, procesos inflamatorios en el sistema inmune y prevención del crecimiento tumoral.	✔	✔	✔	✔	✔	✔
NES	Nestina - Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas intermedias de filamento y se expresa principalmente en células nerviosas	✔	✔	✔	✔		
TBX5	*T-Box 5 (Caja T 5)* –Los genes T-box codifican los factores de transcripción implicados en la regulación de los procesos de desarrollo. Proporciona instrucciones para hacer una proteína llamada T-box 5 que desempeña un papel importante en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario. Esta proteína regula la actividad de otros genes mediante la unión a regiones específicas del ADN. Durante el desarrollo embrionario, la proteína T-box 5 activa genes implicados en el desarrollo normal de las manos y miembros superiores. También activa genes que juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo del corazón.	✔	✔	✔	✔	✔	
KITLG	*Ligando KIT* - Este gen codifica el ligando del receptor tirosina-quinasa codificado por el locus KIT. Este ligando es un factor pleiotrópico que actúa en el útero durante el desarrollo de las células germinales, así como en las células neuronales y en la hematopoyesis donde se cree que tiene un papel en la migración celular.	✔	✔		✔	✔	

Continuación Tabla 15

Gen	Descripción	Expresión a la baja		Procesos biológicos			
		SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
FGF2	*Factor de crecimiento de fibroblastos 2* - La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Poseen amplias actividades mitogénicas y angiogénicas. Esta proteína ha sido implicada en diversos procesos biológicos, como el desarrollo de miembros y del sistema nervioso, la curación de heridas y el crecimiento tumoral	✔	✔	✔	✔	✔	
ENG	*Endoglina* – Codifica la proteína llamada endoglina, esta se encuentra en la superficie de las células, especialmente en el revestimiento de las arterias en desarrollo. Forma un complejo con factores de crecimiento y otras proteínas involucradas en el desarrollo de vasos sanguíneos. En particular, este complejo está involucrado en la especialización de nuevos vasos sanguíneos en arterias o venas	✔	✔	✔	✔	✔	
ICAM1	*Molécula de Adhesión Intercelular 1* - Este gen codifica una glicoproteína de la superficie celular que típicamente se expresa en células endoteliales y células del sistema inmune	✔	✔	✔			
GDF15	*Factor de diferenciación del crecimiento 15* - Este gen codifica un ligando secretado de la superfamilia de proteínas TGFβ. Se unen a varios receptores TGFβ que conducen al reclutamiento y activación de los factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica. La proteína se expresa en una amplia gama de tipos de células, actúa como una citocina pleiotrópica y participa en el programa de respuesta al estrés de las células después de la lesión celular. El aumento de los niveles de proteína se asocia con estados de enfermedad como hipoxia tisular, inflamación, lesión aguda y estrés oxidativo	✔	✔	✔		✔	
ITGAX	*Subunidad de integrina Alfa X* - Este gen codifica la proteína de la cadena integrina alfa X. Las integrinas son proteínas de membrana integrales heterodiméricas compuestas por una cadena alfa y una cadena beta. El complejo Integrina alfa-X / beta-2 es un receptor para el fibrinógeno. Media la interacción célula-célula durante las respuestas inflamatorias. Es especialmente importante en la adhesión de monocitos y la quimiotaxis	✔	✔	✔			

Continuación Tabla 15

Gen	Descripción	Expresión a la baja		Procesos biológicos			
		SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
JAG1	*Jagged-1* – Codifica la proteína llamada Jagged-1 involucrada en una vía importante por la cual las células pueden señalizarse entre sí. La proteína Jagged-1 se conecta con receptores Notch y desencadenan una serie de reacciones de señalización. La señalización Notch controla cómo se desarrollan ciertos tipos de células en un embrión en crecimiento, especialmente las células destinadas a formar parte del corazón, el hígado, los ojos, las orejas y la columna vertebral. La proteína Jagged-1 continúa desempeñando un papel durante toda la vida en el desarrollo de nuevas células sanguíneas	✔	✔	✔	✔	✔	
ERBB2	*Erb-B2 Receptor Tirosina quinasa 2* - Este gen codifica un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) del receptor tirosina quinasas. La sobreexpresión de este gen se ha encontrado en numerosos cánceres, incluidos los tumores de mama y de ovario	✔	✔	✔	✔	✔	
KAT2B	*Lisina Acetiltransferasa 2B* - La proteína codificada por este gen se asocia con p300 y CBP, las cuales son proteínas nucleares grandes que se unen a muchos factores específicos de secuencia implicados en el crecimiento y / o diferenciación celular, incluyendo c-jun y la oncoproteína adenoviral E1A. Esta proteína juega un papel directo en la regulación transcripcional	✔	✔		✔	✔	
NUDT6	*Nudix Hidrolasa 6* - Este gen se superpone y se encuentra en la cadena opuesta al gen FGF2. Los dos genes se transcriben independientemente, y su expresión muestra una relación inversa, regulando la expresión de FGF2. Se ha demostrado que este gen tiene acciones hormonales reguladoras y antiproliferativas en la hipófisis que son independientes de la expresión de FGF2	✔					
FZD9	*Receptor de clase frizzled 9* - Los miembros de la familia de genes "frizzled" codifican proteínas del dominio 7-transmembrana que son receptores para las proteínas de señalización de Wnt. FZD9 se expresa predominantemente en cerebro, testículos, ojo, músculo esquelético y riñón	✔	✔				

Continuación Tabla 15

Gen	Descripción	Expresión a la baja		Procesos biológicos			
		SCAP + HOCl 75 ppm 1 minuto	SCAP + HOCl 75 ppm 15 minutos	Morfogénesis	Proliferación	Diferenciación	Odontogénesis
HNF1A	*HNF1 Homeobox A* - La proteína codificada por este gen es un factor de transcripción requerido para la expresión de varios genes específicos del hígado. Los defectos en este gen son una causa de diabetes tipo 3, de inicio en la madurez de los jovenes y también pueden causar la aparición de adenomas hepáticos	✔	✔				
FUT4	*Fucosiltransferasa 4* - El producto de este gen transfiere fucosa a polisacáridos de N-acetil-lactosamina para generar estructuras de carbohidratos fucosiladas	✔	✔				
PIGS	*Biosíntesis de anclaje glicol Fosfatidilinositol Clase S (Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class S)* - Este gen codifica una proteína que participa en la biosíntesis de anclaje de GPI. El ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) es un glicolípido que se encuentra en muchas células sanguíneas y sirve para anclar proteínas a la superficie celular.	✔	✔				

8.6.1.1 Procesos biológicos relacionados con Morfogénesis

En la Tabla 16 se pueden observar ocho procesos biológicos relacionados con morfogénesis, de los cuales cinco estuvieron asociados a genes sobreexpresados y con expresión a la baja tanto en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, como en aquellas sometidas al tratamiento por 15 minutos. En contraste con lo anterior, los procesos: “Componente celular morfogénesis (GO.0032989)” y “Morfogénesis del órgano (GO.0009887)” no se identificaron en el análisis de procesos biológicos asociados a los genes sobreexpresados por las SCAP tratadas con 75 ppm de HOCl durante 1 minuto; sin embargo, este último proceso biológico si se encontró relacionado con la expresión génica a la baja de los dos grupos de tratamiento. Por su parte, el proceso “Morfogénesis del mesénquima (GO.0072132) solo se encontró relacionado con los genes expresados a la baja en los grupos de tratamiento a 1 y 15 minutos.

En la Figura 13 se pueden identificar los genes y la red de interacciones relacionados con cada proceso biológico indicado en la Tabla 16. En el análisis de los genes sobreexpresados en las SCAP tratadas por 1 minuto se encontró que CTNNB1 y SMAD 4 fueron los genes más representativos debido a que intervienen en los cinco procesos biológicos asociados a morfogénesis (Figura 13A). Así mismo, los genes anteriormente nombrados se encontraron asociados a seis de los procesos relacionados con morfogénesis en el análisis de las SCAP tratadas por 15 minutos, al igual que BMP4 que solo se sobre-expresó en este grupo (Figura 13B). Por otra parte, en las redes de interacción se puede observar que los genes sobreexpresados PDGRFB, RHOA, KDR e IL6 intervienen en cuatro procesos biológicos que se encontraron relacionados con morfogénesis en el grupo de SCAP tratadas durante 15 minutos (Figura 13B). De estos genes, solo RHOA e IL 6 se sobre-expresaron también en las células tratadas con HOCl durante 1 minuto, y están asociados a tres procesos biológicos relacionados con morfogénesis (Figura 13A).

Con respecto a los genes expresados a la baja, se pudo identificar que WNT3A, TBX5 y TGFB1 fueron los más representativos, interviniendo en 7, 6 y 5 procesos metabólicos relacionados con morfogénesis, respectivamente (Tabla 16, Figura 13C y D).

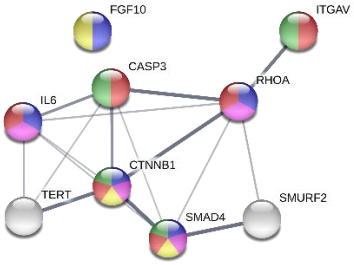
Según el análisis realizado en STRING, la evidencia sugiere un enlace funcional entre los genes anteriormente nombrados.

Tabla 16. Procesos biológicos relacionados con morfogénesis, asociados a los genes sobreexpresados y expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

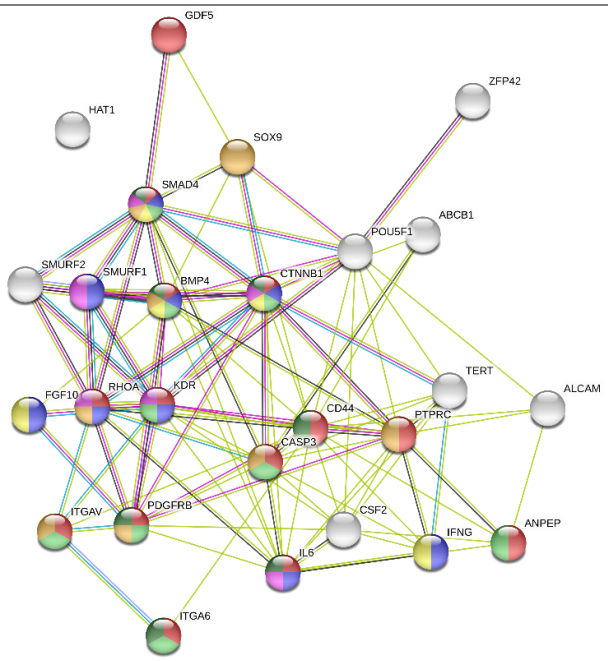
ID DESCRIPCIÓN	GENES INVOLUCRADOS [Cantidad] Nombre *TASA FALSO POSITIVO*			
	1 Min		15 min	
	Sobreexpresados	Expresados a la baja	Sobreexpresados	Expresados a la baja
GO.0009653 Estructura anatómica morfogénesis	[6] CASP3, CTNNB1, IL6, ITGAV, RHOA, SMAD4 *0.00563*	[10] ENG, FGF2, GDF7, ITGAX, JAG1, NES, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.00154*	[14] ANPEP, BMP4, CASP3, CD44, CTNNB1, GDF5, IL6, ITGA6, ITGAV, KDR, PDGFRB, PTPRC, RHOA, SMAD4 *2.25e-06*	[8] ENG, FGF2, ITGAX, JAG1, NES, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.00592*
GO.0022603 Regulación de la morfogénesis de la estructura anatómica	[5] CTNNB1, FGF10, IL6, RHOA, SMAD4 *0.0026*	[10] BDNF, COL1A1, ERBB2, FGF2, GDF15, GDF7, ICAM1, TBX5, TGFB1, WNT3A *2.02e-06*	[9] BMP4, CTNNB1, FGF10, IFNG, IL6, KDR, RHOA, SMAD4, SMURF1 *3.25e-05*	[7] ERBB2, FGF2, GDF15, ICAM1, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.0005*
GO.0048646 Formación de estructura anatómica involucrada en morfogénesis	[4] CASP3, CTNNB1, ITGAV, SMAD4 *0.0233*	[8] COL1A1, EGF, ENG, FGF2, GDF7, JAG1, TBX5, WNT3A *0.000468*	[9] ANPEP, BMP4, CASP3, CTNNB1, ITGA6, ITGAV, KDR, PDGFRB, SMAD4 *8.81e-05*	[5] ENG, FGF2, JAG1, TBX5, WNT3A *0.034*
GO.2000027 Regulación de la morfogénesis de órganos	[3] CTNNB1, FGF10, SMAD4 *0.00493*	[5] BDNF, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *9.18e-05*	[5] BMP4, CTNNB1, FGF10, IFNG, SMAD4 *9.04e-05*	[3] TBX5, TGFB1, WNT3A *0.0159*
GO.0022604 Regulación de la morfogénesis celular	[4] CTNNB1, IL6, RHOA, SMAD4 *0.00449*	[7] BDNF, COL1A1, ICAM1, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *7.38e-05*	[6] CTNNB1, IL6, KDR, RHOA, SMAD4, SMURF1 *0.000798*	[4] ICAM1, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.0234*
GO.0009887 Morfogénesis del órgano	-	[8] ENG, FGF2, GDF7, ITGAX, JAG1, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.000226*	[7] BMP4, CD44, CTNNB1, IL6, ITGA6, PDGFRB, SMAD4 *0.00195*	[7] ENG, FGF2, ITGAX, JAG1, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.000517*
GO.0072132 Morfogénesis del mesénquima	-	[2] ENG, WNT3A *0.0241*	-	[2] ENG, WNT3A *0.0201*
GO.0032989 Componente celular morfogénesis	-	-	[8] BMP4, CASP3, ITGAV, PDGFRB, PTPRC, RHOA, SMAD4, SOX9 *0.000734*	-

Figura 13. Interacciones de los genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos (A y B) y expresados a la baja (C y D), asociados a procesos biológicos relacionados con morfogénesis

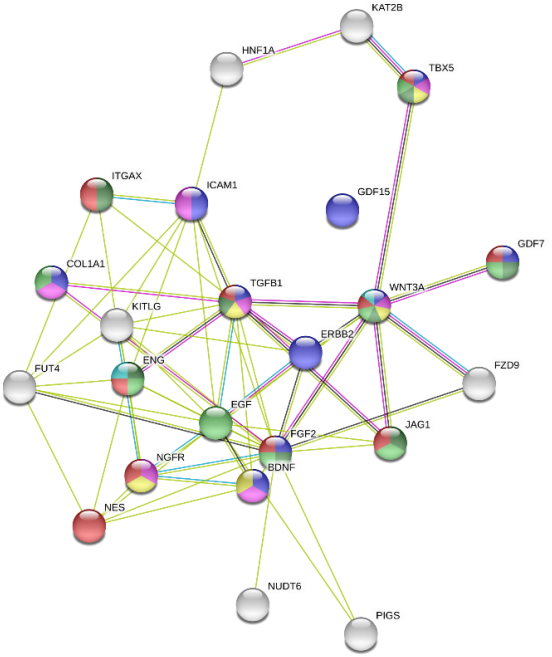
A. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



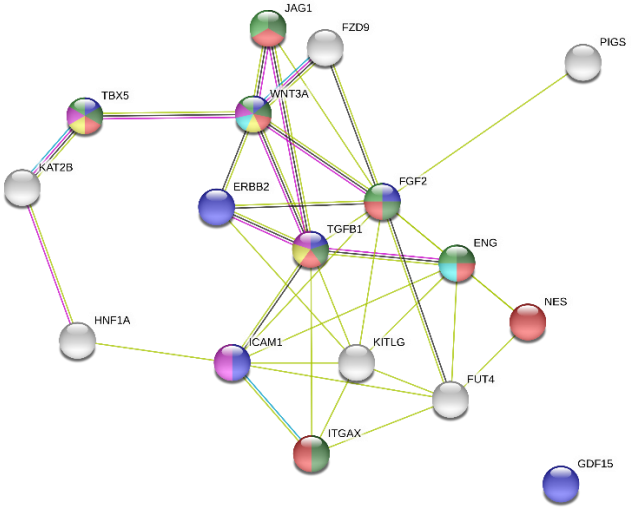
B. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



C. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



D. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



- Estructura anatómica morfogénesis
- Regulación de la morfogénesis de la estructura anatómica
- Formación de estructura anatómica involucrada en morfogénesis
- Regulación de la morfogénesis de órganos
- Regulación de la morfogénesis celular
- Morfogénesis del órgano
- Morfogénesis del mesénquima
- Componente celular morfogénesis

Interacciones conocidas

- De bases de datos curadas
- Determinado experimentalmente

Otros

- Extracción de textos
- Co-expresión
- Homología de proteínas

8.6.1.2 Procesos biológicos relacionados con proliferación

En la Tabla 17 se pueden observar diez procesos biológicos relacionados con proliferación, de los cuales dos estuvieron asociados a genes sobreexpresados y con expresión a la baja tanto en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, como en aquellas sometidas al tratamiento por 15 minutos. En contraste con lo anterior, el "GO.0008283 proliferación celular" no se encontró asociado a los genes sobreexpresados por las SCAP tratadas con 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, pero sí por aquellas tratadas durante 15 minutos. Por su parte, el "GO.0033688 regulación de la proliferación de osteoblastos" se identificó en el análisis de procesos biológicos relacionados con genes expresados a la alta en las SCAP tratadas con HOCl durante 1 y 15 minutos. El "GO.0072089 proliferación de células stem" se encontró relacionado con la expresión génica a la alta y a la baja de las SCAP tratadas durante 15 minutos, pero no con aquellas sometidas al tratamiento durante 1 minuto.

Cinco procesos asociados a proliferación celular se identificaron solamente en el análisis de genes sobreexpresados en las SCAP tratadas con HOCl a 75 ppm durante 15 minutos, estos fueron: "GO.2000648 regulación positiva de la proliferación de células stem; GO.0010464 regulación de la proliferación de células mesenquimales; GO.0072091 regulación de la proliferación de células stem; GO.0002053 regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales y GO.0010463 proliferación de células mesenquimales" (Tabla 17).

En la Figura 14 se pueden identificar los genes y la red de interacciones relacionados con los procesos biológicos indicados en la Tabla 17. En el análisis de los genes sobreexpresados en las SCAP tratadas por 1 minuto se encontró que ITGAV interviene en los tres procesos relacionados con proliferación, que fueron identificados en este grupo (Figura 14 A). Con relación a los genes expresados a la alta en el grupo de 15 minutos, los más representativos fueron BMP4, CTNNB1, PTPRC y SOX9. Los dos primeros estuvieron relacionados con 7 y 6 procesos biológicos relacionados con proliferación celular respectivamente, mientras que los dos últimos con 5 (Figura 14 B).

Con respecto a los genes expresados a la baja, se pudo identificar que NES y WNT3A están relacionados con 4 procesos biológicos asociados a proliferación en el grupo de SCAP tratadas

con 75 ppm de HOCl durante 15 minutos (Figura 14 D), mientras que estos mismos genes se relacionaron con 3 procesos en el grupo de SCAP tratadas durante 1 minuto (Figura 14 C). Por su parte, TGFB1 y KITLG se asociaron con tres procesos biológicos identificados en los grupos de tratamiento durante 1 y 15 minutos, que tenían relación con proliferación (Figura 14 C y D).

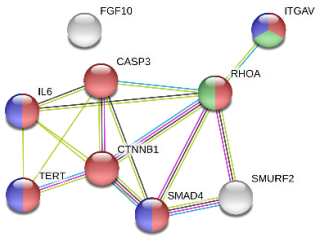
Los procesos biológicos en los que intervinieron mayor cantidad de los genes expresados a la alta y aquellos con expresión a la baja en ambos grupos de tratamiento, fueron “GO.0042127 regulación de la proliferación celular” y “GO.0008284 regulación positiva de la proliferación celular” (Tabla 17, Figura 14).

Tabla 17. Procesos biológicos relacionados con proliferación, asociados a los genes sobreexpresados y expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

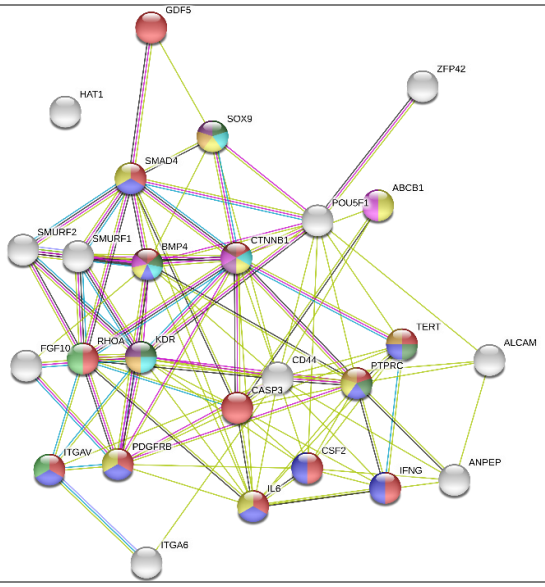
ID DESCRIPCIÓN	GENES INVOLUCRADOS [Cantidad] Nombre *TASA FALSO POSITIVO*			
	1 min		15 min	
	Sobre-expresados	Expresados a la baja	Sobre-expresados	Expresados a la baja
GO.0042127 Regulación de la proliferación celular	[7] CASP3, CTNNB1, IL6, ITGAV, RHOA, SMAD4, TERT *0.00046*	[10] BDNF, ENG, FGF2, JAG1, KAT2B, KITLG, NES, NGFR, TGFB1, WNT3A *0.000114*	[13] BMP4, CASP3, CSF2, CTNNB1, GDF5, IFNG, IL6, ITGAV, PDGFRB, PTPRC, RHOA, SMAD4, TERT *6.39e-07*	[8] ENG, FGF2, JAG1, KAT2B, KITLG, NES, TGFB1, WNT3A *0.00106*
GO.0008284 Regulación positiva de la proliferación celular	[4] IL6, ITGAV, SMAD4, TERT *0.0135*	[8] ERBB2, FGF2, KITLG, NES, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.000127*	[9] BMP4, CSF2, IFNG, IL6, ITGAV, PDGFRB, PTPRC, SMAD4, TERT *1.94e-05*	[7] ERBB2, FGF2, KITLG, NES, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.000356*
GO.0033688 Regulación de la proliferación de osteoblastos	[2] ITGAV, RHOA *0.00546*	-	[2] ITGAV, RHOA *0.00887*	-
GO.0008283 Proliferación celular	-	[5] ERBB2, KITLG, NES, TGFB1, WNT3A *0.0228*	[8] SMAD4, ABCB1, CTNBB1, BMP4, PDGFRB, IL6, PTPRC, SOX 9 6.46e-05-	[5] ERBB2, KITLG, NES, TGFB1, WNT3A *0.0101*
GO.0072089 Proliferación de células stem	-	-	[3] ABCB1, BMP4, CTNNB1 *0.00216*	[2] NES, WNT3A *0.0477*
GO.2000648 Regulación positiva de la proliferación de células stem	-	-	[5] BMP4, KDR, PTPRC, SOX9, TERT *3.38e-06*	-
GO.0010464 Regulación de la proliferación de células mesenquimales	-	-	[4] BMP4, CTNNB1, KDR, SOX9 *1.61e-05*	-
GO.0072091 Regulación de la proliferación de células stem	-	-	[4] KDR, PTPRC, SOX9, TERT *0.000322*	-
GO.0002053 Regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales	-	-	[3] CTNNB1, KDR, SOX9 *0.000553*	-
GO.0010463 Proliferación de células mesenquimales	-	-	[2] BMP4, CTNNB1 *0.00332*	-

Figura 14. Interacciones de los genes sobreexpresados (A y B) y expresados a la baja (C y D) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con proliferación

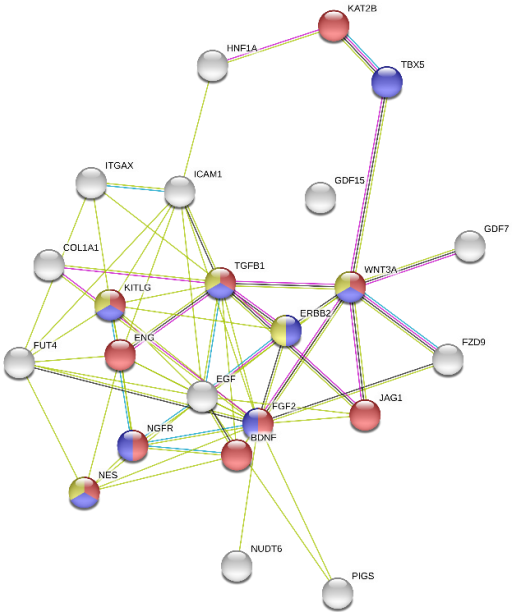
A. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



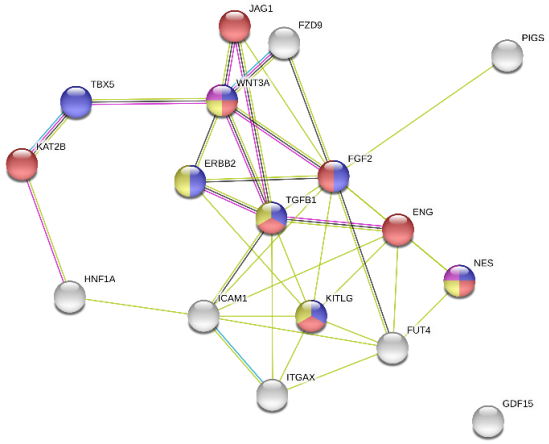
B. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



C. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



D. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



- Regulación de la proliferación celular
- Regulación positiva de la proliferación celular
- Regulación de la proliferación de osteoblastos
- Proliferación celular
- Proliferación de células madre
- Regulación positiva de la proliferación de células madre
- Regulación de la proliferación de células mesenquimales
- Regulación de la proliferación de células madre
- Regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales
- Proliferación de células mesenquimales

Interacciones conocidas

- De bases de datos curadas
- Determinado experimentalmente

Otros

- Extracción de textos
- Co-expresión
- Homología de proteínas

8.6.1.3 Procesos biológicos relacionados con Diferenciación

En la Tabla 18 se identifican 11 procesos relacionados con diferenciación, de los cuales solo el proceso biológico GO.0048762 diferenciación de células mesenquimales, se encontró asociado a la expresión génica a la alta y a la baja de las SCAP tratadas con 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos. Por su parte, se observó relación de cinco procesos biológicos con genes sobreexpresados en el grupo de tratamiento de 15 minutos y aquellos con baja expresión, en las SCAP sometidas al HOCl en los dos tiempos de exposición. Los procesos anteriormente nombrados fueron: GO.0045597 regulación positiva de la diferenciación celular; GO.0045595 Regulación de la diferenciación celular; GO.2000738 regulación positiva de la diferenciación de células stem; GO.0030154 diferenciación celular y GO.0048863 diferenciación de células stem. Por otra parte, los procesos GO.0000904 morfogénesis celular implicada en la diferenciación y GO.0010770 regulación positiva de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación, se relacionaron con genes sobreexpresados en los grupos de tratamiento de 1 y 15 minutos, así como en los genes con expresión a la baja de las SCAP sometidas a 1 minuto de HOCl a 75 ppm.

Con respecto al proceso GO.0045669 regulación positiva de la diferenciación de osteoblastos, se observó que tuvo relación con genes sobreexpresados en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos. El proceso GO.2000736 regulación de la diferenciación de células stem se encontró relacionado con genes que se expresaron a la baja en los grupos de tratamiento de 1 y 15 minutos, mientras que el GO.0010769 regulación de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación solo se identificó relacionado con genes expresados a la baja en el grupo de tratamiento por 1 minuto (Tabla 18).

En la Figura 15 se pueden observar las redes de interacción y los diversos genes expresados a la alta y a la baja, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación. Con respecto a los genes sobreexpresados en el grupo de tratamiento con HOCl durante 1 minuto, se encontró que RHOA, CTNNB1 y SMAD 4 están relacionados con tres procesos biológicos asociados con diferenciación (Figura 15A), mientras que en grupo de 15 minutos el gen CTNNB1 se relacionó con siete procesos, BMP4 y SMAD4 con seis y RHOA con cinco procesos (Figura 15B). Por otro lado, con relación a los genes expresados a la baja, el más representativo fue TGFB1 debido a que se encontró asociado con el mayor número de procesos relacionados con diferenciación, diez en el grupo de 1 minuto y siete en el grupo de 15 minutos (Figura 15C y D). En el grupo de tratamiento de 1 minuto, COL1A1 y WNT3A se observaron asociados a siete procesos, NGFR, KITLG y TBX5 con seis y FGF2 y JAG1 con cinco procesos biológicos relacionados con

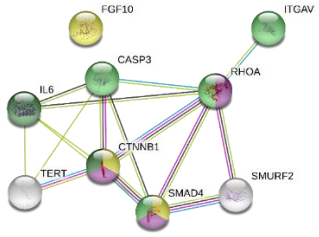
diferenciación (Figura 15C). Por su parte, en el grupo de 15 minutos JAG1, TBX5 y KITLG se relacionaron con 5 procesos (Figura 15 D).

Tabla 18. Interacciones de los genes sobreexpresados (**A** y **B**) y expresados a la baja (**C** y **D**) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación

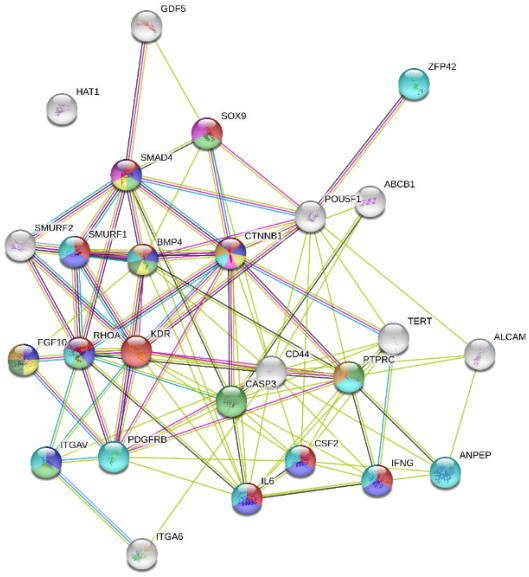
ID DESCRIPCIÓN	GENES INVOLUCRADOS [Cantidad] Nombre *TASA FALSO POSITIVO*			
	1 min		15 min	
	Sobre-expresados	Expresados a la baja	Sobreexpresados	Expresados a la baja
GO.0045597 Regulación positiva de la diferenciación celular	-	[12] BDNF, COL1A1, FGF2, GDF15, GDF7, JAG1, KAT2B, KITLG, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *2.99e-08*	[10] BMP4, CSF2, CTNNB1, IFNG, IL6, KDR, RHOA, SMAD4, SMURF1, SOX9 *2.44e-06*	[8] FGF2, GDF15, JAG1, KAT2B, KITLG, TBX5, TGFB1, WNT3A *7.17e-05*
GO.0045595 Regulación de la diferenciación celular	-	[11] COL1A1, ERBB2, FGF2, GDF15, GDF7, KAT2B, KITLG, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *1.61e-05*	[10] BMP4, CSF2, CTNNB1, FGF10, IFNG, IL6, ITGAV, RHOA, SMAD4, SMURF1 *0.000201*	[8] ERBB2, FGF2, GDF15, KAT2B, KITLG, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.00106*
GO.0000904 Morfogénesis celular implicada en la diferenciación	[4] CASP3, ITGAV, RHOA, SMAD4 *0.00892*	[5] BDNF, GDF7, NGFR, TGFB1, WNT3A *0.021*	[7] BMP4, CASP3, ITGAV, PTPRC, RHOA, SMAD4, SOX9 *0.000479*	-
GO.0048762 Diferenciación de células mesenquimales	[3] CTNNB1, FGF10, SMAD4 *0.00317*	[3] JAG1, KITLG, TGFB1 *0.0123*	[4] BMP4, CTNNB1, FGF10, SMAD4 *0.000592*	[3] JAG1, KITLG, TGFB1 *0.0088*
GO.2000738 Regulación positiva de la diferenciación de células stem	-	[3] COL1A1, TBX5, TGFB1 *0.00184*	[3] CTNNB1, SMAD4, SOX9 *0.00132*	[2] TBX5, TGFB1 *0.0349*
GO.0045669 Regulación positiva de la diferenciación de osteoblastos	[2] CTNNB1, IL6 *0.0157*	-	[3] BMP4, CTNNB1, IL6 *0.00174*	-
GO.0030154 Diferenciación celular	-	[10] COL1A1, ENG, FGF2, GDF15, JAG1, KAT2B, KITLG, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.0195*	[12] ANPEP, BMP4, CSF2, CTNNB1, IFNG, IL6, ITGAV, PDGFRB, PTPRC, RHOA, SMURF1, ZFP42 *0.00232*	[9] ENG, FGF2, GDF15, JAG1, KAT2B, KITLG, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.0111*
GO.0048863 Diferenciación de células madre	-	[4] FGF2, JAG1, KITLG, TGFB1 *0.0122*	[4] BMP4, CTNNB1, FGF10, PTPRC *0.0101*	[4] FGF2, JAG1, KITLG, TGFB1 *0.00672*
GO.0010770 Regulación positiva de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación	[3] CTNNB1, RHOA, SMAD4 *0.00493*	[4] COL1A1, NGFR, TGFB1, WNT3A *0.00184*	[3] CTNNB1, RHOA, SMAD4 *0.0181*	-
GO.2000736 Regulación de la diferenciación de células madre	-	[5] COL1A1, JAG1, TBX5, TGFB1, WNT3A *2.8e-05*	-	[4] JAG1, TBX5, TGFB1, WNT3A *0.000492*
(✔)GO.0010769 Regulación de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación	-	[6] BDNF, COL1A1, NGFR, TBX5, TGFB1, WNT3A *8.6e-05*	-	-

Figura 15. Interacciones de los genes sobreexpresados (A y B) y expresados a la baja (C y D) en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación

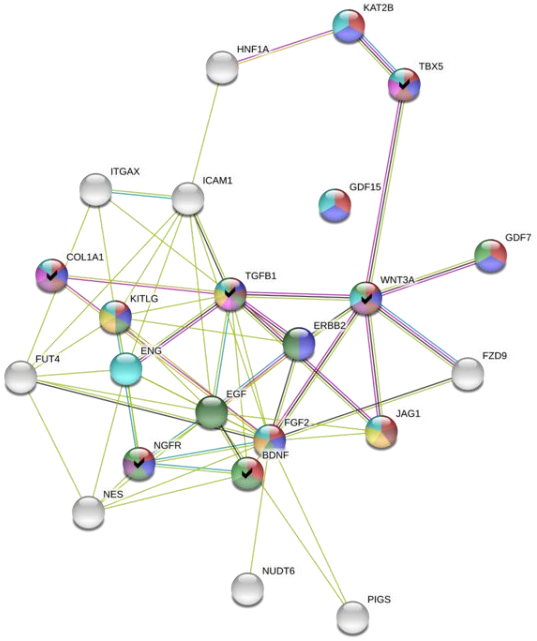
A. Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



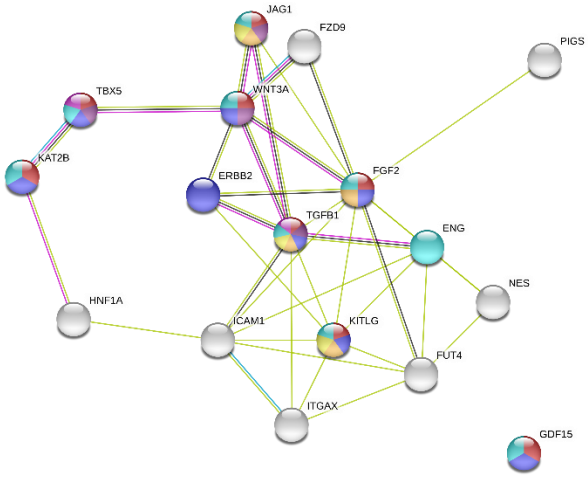
B. **Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos**



C. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto



D. Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos



- Regulación positiva de la diferenciación celular
- Regulación de la diferenciación celular
- Morfogénesis celular implicada en la diferenciación
- Diferenciación de células mesenquimales
- Regulación positiva de la diferenciación de células madre
- Regulación positiva de la diferenciación de osteoblastos
- Diferenciación celular
- Diferenciación de células madre
- Regulación positiva de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación
- Regulación de la diferenciación de células madre
- ✔ Regulación de la morfogénesis celular implicada en la diferenciación

Interacciones conocidas

- De bases de datos curadas
- Determinado experimentalmente

Otros

- Extracción de textos
- Co-expresión
- Homología de proteínas

8.6.1.4 Procesos biológicos relacionados con Odontogénesis

Se encontraron tres procesos biológicos relacionados con odontogénesis, de los cuales el GO.0042475 odontogénesis del diente que contiene dentina, estuvo asociado con genes sobreexpresados en las SCAP tratadas con HOCl durante 1 y 15 minutos (Tabla 19, Figura 16B y Figura 17). Por su parte el proceso GO.0042476 odontogénesis, se relacionó solo con genes expresados a la alta en el grupo de tratamiento de 15 minutos (Figura 17). El GO.0042482 regulación positiva de la odontogénesis, solo se asoció con genes expresados a la baja en el grupo de SCAP tratadas con el HOCl durante 1 minuto (Tabla 19, Figura 16B).

En el análisis de genes expresados a la baja en el grupo de SCAP tratadas con 75 ppm de HOCl durante 15 minutos no se identificó relación con procesos biológicos asociados a odontogénesis (Tabla 19).

Tabla 19. Procesos biológicos relacionados con odontogénesis, asociados a los genes sobreexpresados y con baja expresión en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

ID DESCRIPCIÓN	GENES INVOLUCRADOS [Cantidad] Nombre *TASA FALSO POSITIVO*			
	1 Min		15 min	
	Sobreexpresados	Expresión a la baja	Sobreexpresados	Expresión a la baja
GO.0042475 Odontogénesis del diente que contiene dentina	[2] CTNNB1, FGF10 *0.0257*	-	[4] BMP4, CTNNB1, FGF10, ITGA6 *0.000172*	-
GO.0042476 Odontogénesis	-	-	[3] CTNNB1, FGF10, ITGA6 *0.00726*	-
GO.0042482 Regulación positiva de la odontogénesis	-	[2] NGFR, TGFB1 *0.00381*	-	-

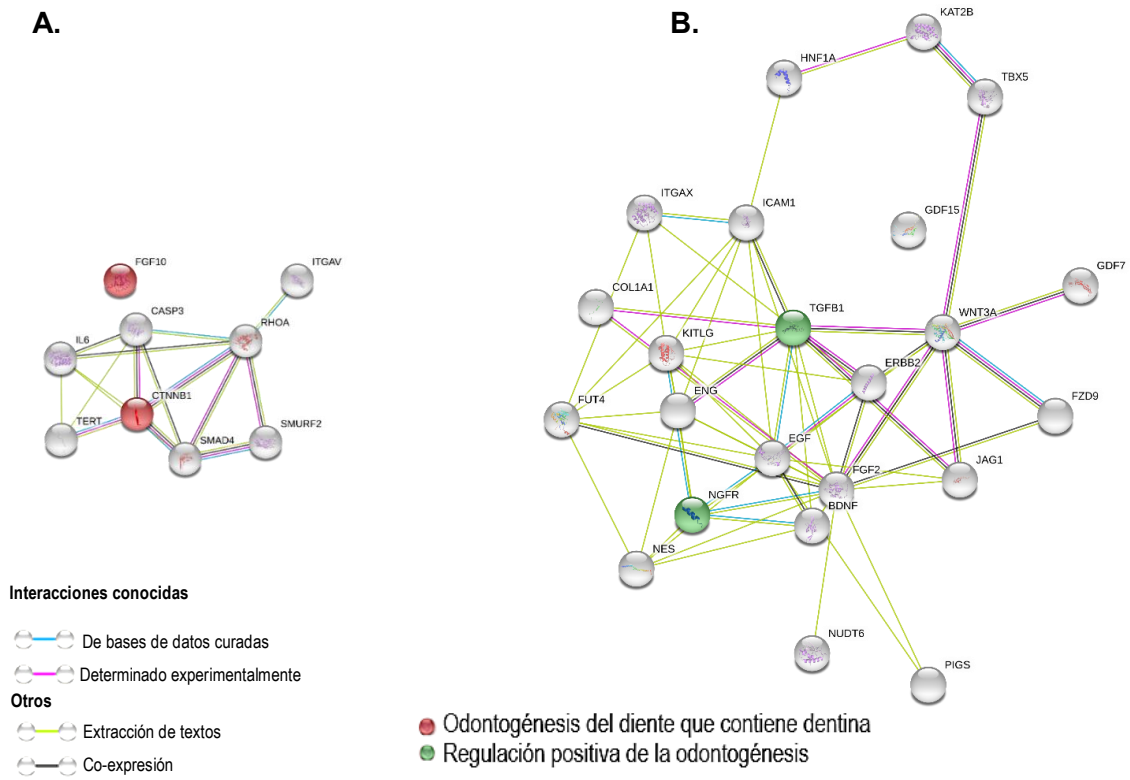


Figura 16. Interacción de genes sobreexpresados y con expresión a la baja, asociados a procesos biológicos relacionados con odontogénesis en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto. **A.** Genes sobreexpresados. **B.** Genes con expresión a la baja

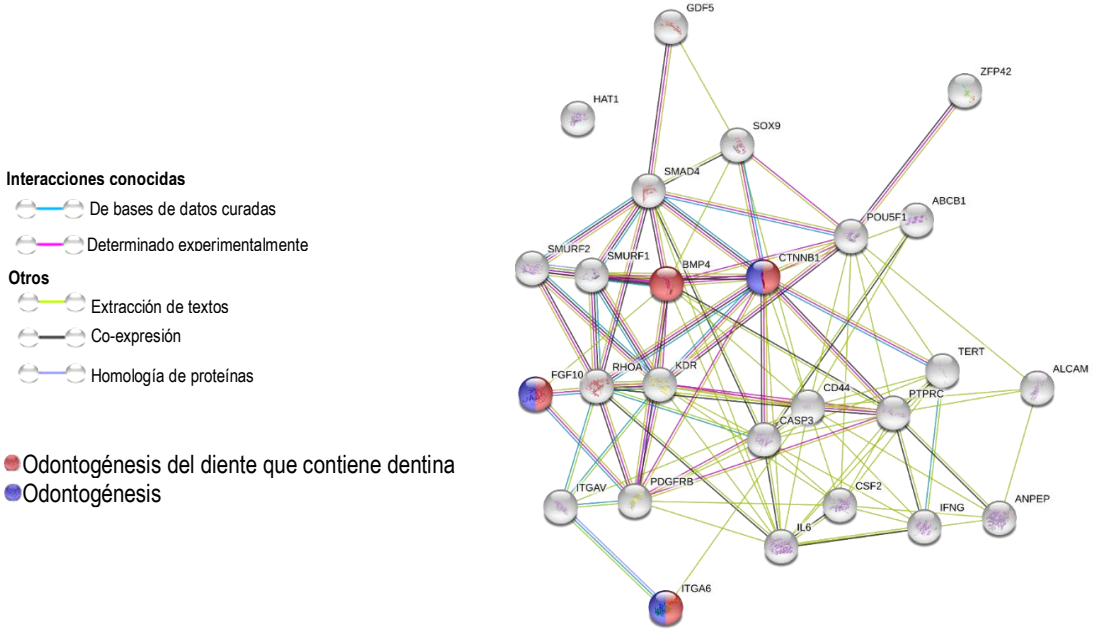


Figura 17. Interacción de genes sobreexpresados, asociados a procesos biológicos relacionados con odontogénesis en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos

8.6.2 Vías de señalización KEGG

En el análisis de las vías de señalización KEGG asociadas con la expresión génica a la alta y a la baja de las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, se evidenciaron cinco vías KEGG relacionadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta. Tres de ellas: Vía de señalización PI3K-Akt, vía de señalización TGF-beta y vía de señalización MAPK tuvieron relación con genes sobreexpresados en los grupos de tratamiento a 1 y 15 minutos y con los genes expresados a la baja en el grupo de SCAP tratadas con HOCl por 1 minuto (Tabla 20, Figura 18A, B y C).

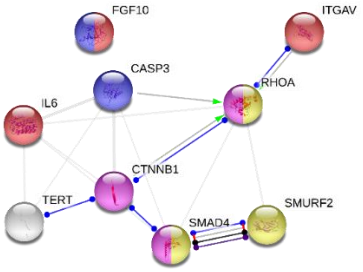
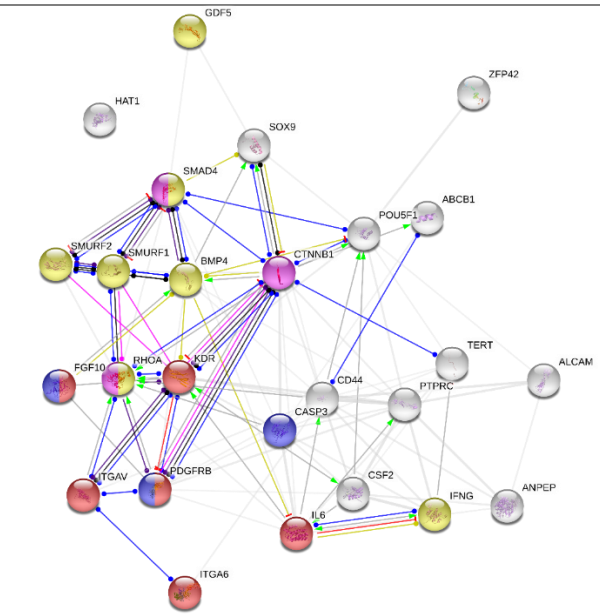
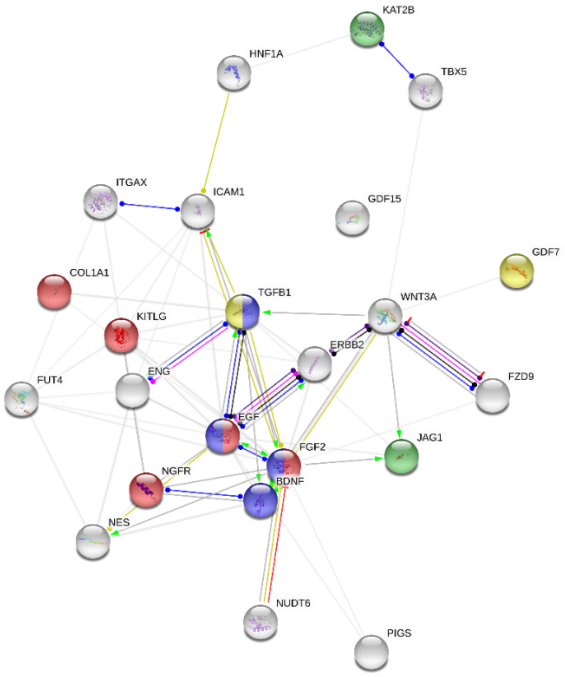
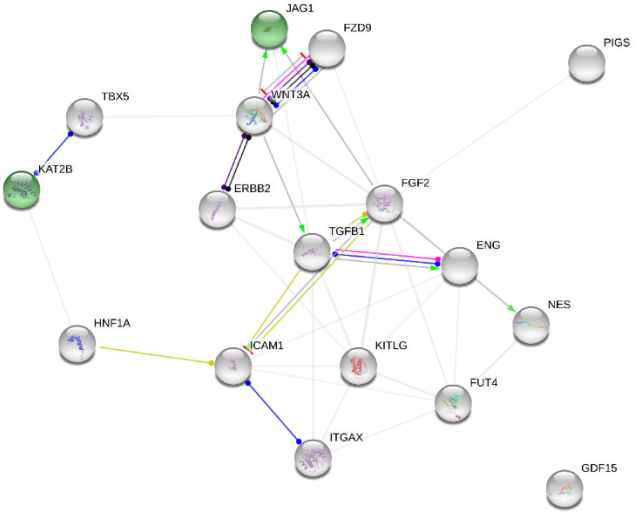
Por otra parte, la vía de señalización Wnt tuvo relación con genes sobreexpresados en los grupos de tratamiento de 1 y 15 minutos; mientras que la vía de señalización Notch se asoció a genes expresados a la baja en los dos grupos (Tabla 20, Figura 18).

En la Figura 18 se pueden identificar los tipos de acciones moleculares y sus diversos efectos en las redes de interacción de los genes sobreexpresados y expresados a la baja en las SCAP sometidas al HOCl durante 1 y 15 minutos.

Tabla 20. Vías de señalización KEGG relacionadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta, asociadas a la expresión génica de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos

#ID DE VÍA DESCRIPCIÓN	GENES INVOLUCRADOS [Cantidad] Nombre *TASA FALSO POSITIVO*			
	1 Min		15 min	
	Sobreexpresados	Expresados a la baja	Sobreexpresados	Expresados a la baja
4151 **Vía de señalización PI3K-Akt**	[3] FGF10, IL6, ITGAV *0.00615*	[5] COL1A1, EGF, FGF2, KITLG, NGFR *0.00176*	[6] FGF10, IL6, ITGA6, ITGAV, KDR, PDGFRB *9.4e-05*	-
4350 **Vía de señalización TGF-beta**	[3] RHOA, SMAD4, SMURF2 *0.000174*	[2] GDF7, TGFB1 *0.0459*	[7] BMP4, GDF5, IFNG, RHOA, SMAD4, SMURF1, SMURF2 *7.22e-10*	-
4010 **Vía de señalización MAPK**	[2] CASP3, FGF10 *0.0444*	[4] BDNF, EGF, FGF2, TGFB1 *0.00475*	[3] CASP3, FGF10, PDGFRB *0.0252*	-
4310 **Vía de señalización Wnt**	[3] CTNNB1, RHOA, SMAD4 *0.000798*	-	[3] CTNNB1, RHOA, SMAD4 *0.00618*	-
4330 **Vía de señalización Notch**	-	[2] JAG1, KAT2B *0.026*	-	2 JAG1, KAT2B *0.0282*

Figura 18. Red de acciones moleculares ligadas a la expresión génica de SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, y relación de los genes sobreexpresados y expresados a la baja con las vías KEGG asociadas con la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta

Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto	**Genes sobreexpresados en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos**
	
Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto	Genes expresados a la baja en SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 15 minutos
	

** La forma de la línea indica el modo de acción predicho:*

Tipos de acciones

- Activación
- Unión
- Fenotipo
- Reacción
- Inhibición
- Catálisis
- Modificación post-traduccional
- Regulación transcripcional

Efectos de la acción

- Positivo
- Negativo
- No especificado

- Vía de señalización PI3K-Akt
- Vía de señalización TGF-beta
- Vía de señalización MAPK
- Vía de señalización Wnt
- Vía de señalización Notch

8.7 Tinción Von Kossa

Se observaron abundantes depósitos de calcio en los tratamientos con HOCl a 25 ppm por 1 y 15 minutos, mientras que en el tratamiento con 50 ppm no se identificaron depósitos claros. En las células expuestas a 75 ppm también se detectaron nódulos mineralizados principalmente al tratamiento de 1 minuto comparado con 15 minutos (Figura 19).

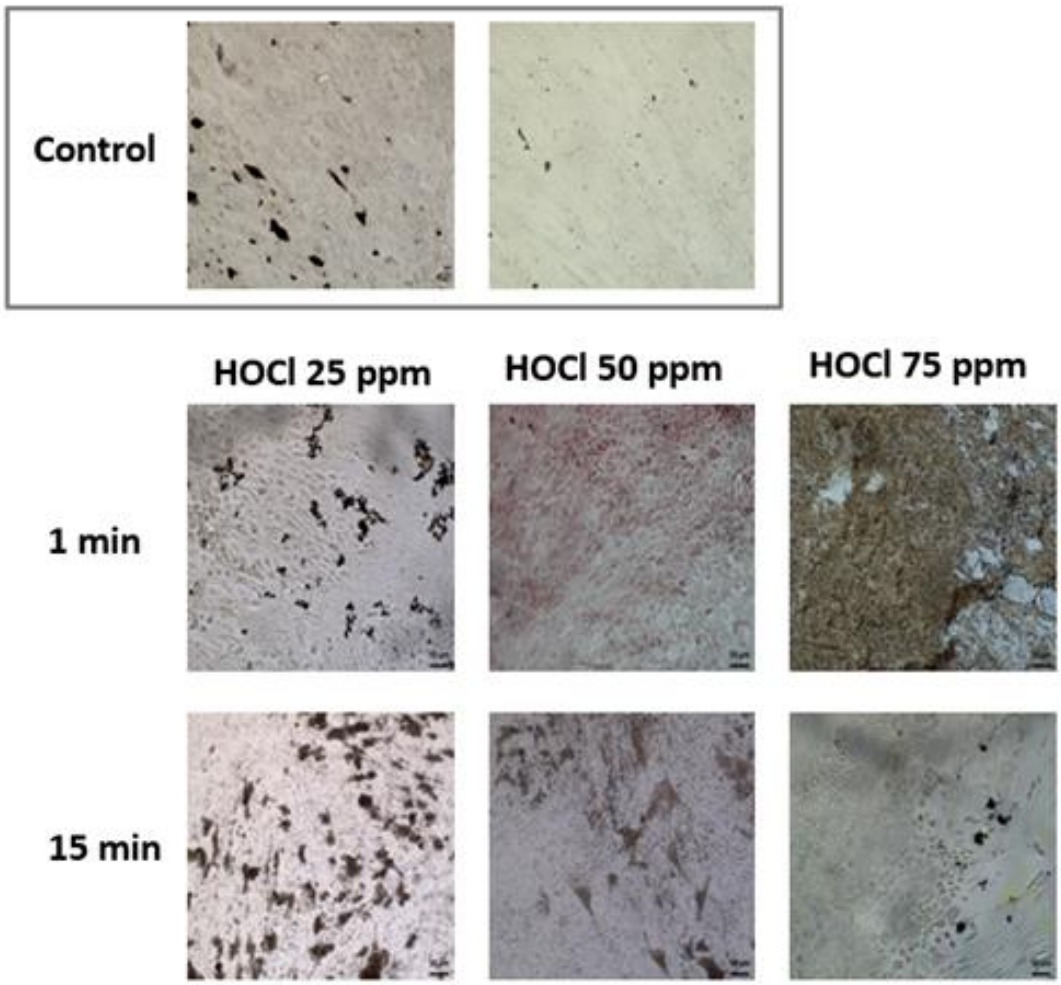


Figura 19. Tinción Von Kossa de SCAP tratadas con HOCl a 25 ppm, 50 ppm y 75 ppm durante 1 y 15 minutos.

9. DISCUSIÓN

El tratamiento endodóntico regenerativo se fundamenta en el concepto de que las células stem multipotentes ubicadas en la zona apical son capaces de inducir la regeneración pulpar en los dientes permanentes inmaduros. Se ha observado que las SCAP tienen una mayor capacidad de diferenciación que otras células stem y en aquellos casos donde se presenta una necrosis pulpar, las SCAP pueden mantener su vitalidad a través de la circulación colateral y favorecer el desarrollo de la raíz (84-86).

Debido a que las células stem representan uno de los pilares para llevar a cabo una endodoncia regenerativa, diversos estudios han evaluado el efecto de los irrigantes del conducto radicular en el destino de algunos tipos de células stem mesenquimales de origen dental (12,19,50,51,53,87). Teniendo en cuenta la evidencia disponible en esta área, la Asociación Americana de Endodoncia estableció un protocolo para llevar a cabo los tratamientos endodónticos regenerativos donde propone para la desinfección del conducto radicular, el uso del hipoclorito de sodio a una baja concentración (1.5%) con el fin de disminuir el efecto citotóxico sobre las células stem de la zona periapical (88,89). Así mismo, sugiere utilizar posteriormente EDTA al 17% para revertir el efecto deletéreo del NaOCl, y permitir la acción bioactiva de la dentina a través de la liberación de factores de crecimiento que servirán para estimular la diferenciación de las células stem a un fenotipo similar odontoblástico (53,90).

A pesar de lo anteriormente descrito, algunos estudios han evaluado el efecto de otras sustancias sobre las DPSC y SCAP con el fin de evitar el efecto citotóxico del hipoclorito de sodio, entre ellas el ácido hipocloroso (19,91). Dos irrigantes que según sus fabricantes contienen HOCl como principio activo, son el Aquatine EC Endodontic Cleanser y el Endocyn. La FDA aprobó en el año 2006 el uso del Aquatine y en el año 2014 del Endocyn, e indicó que este último “Es una solución de irrigación del conducto radicular sustancialmente equivalente en términos de su indicación de uso, características tecnológicas, seguridad y efectividad, al Aquatine EC Cleanser fabricado por PuriCore (K061689) y al Hipoclorito de Sodio al 3% y 6% fabricado por Inter-Med, Inc./Vista-Dental, Inc (K082470). Por lo tanto, la Solución de Irrigación para el conducto radicular Endocyn de Oculus, es sustancialmente equivalente a los irrigantes previamente nombrados” (92).

El HOCl es un componente bactericida inorgánico importante de la inmunidad innata, y es efectivo contra una amplia gama de microorganismos. En el proceso de control de infecciones ocurre el

estallido respiratorio durante el cual los neutrófilos producen peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que posteriormente se convierte en HOCl por la actividad de la enzima mieloperoxidasa de sus gránulos. El HOCl es el principal oxidante producido por los neutrófilos, y es un potente agente microbicida dentro de estas células (93). La actividad bactericida es significativa debido a su capacidad para penetrar en las membranas celulares bacterianas, resultando en la degradación de las proteínas (91,94).

Por otra parte, las soluciones de HOCl han sido utilizadas para la desinfección hospitalaria, esterilización y en el tratamiento de heridas crónicas. En odontología se usa comúnmente para desinfectar las líneas de agua mediante la eliminación de biofilm, ha sido evaluado como como agente antiplaca (15), en la reducción de la inflamación gingival especialmente en pacientes con periodontitis y en la reparación de heridas. Ha demostrado ser biocompatible y tener un efecto antimicrobiano contra un amplio espectro de microorganismos (13). Específicamente en el área de endodoncia, se ha propuesto como irrigante del conducto radicular y han sido evaluados algunos aspectos como su capacidad de disolución de tejido (95), remoción de smear layer (56,96), su efecto sobre la dentina (97,98) y capacidad antimicrobiana (99). En el campo de la endodoncia regenerativa solo existen dos estudios publicados que han evaluado el efecto del HOCl sobre células stem (18,91). No se evidencian publicaciones que involucren estudios en pacientes que permitan la evaluación del efecto del HOCl como irrigante, en el desenlace y/o pronóstico del tratamiento endodóntico.

En Colombia, en el año de 1992, Calderón y col diseñaron un método para la obtención del HOCl hasta lograr la síntesis de una solución antimicrobiana a base de esta sustancia, con una estabilidad superior a 18 meses, en un amplio rango de concentraciones (Desde 50ppm a 7000ppm) y pH (3.8 - 6.2), convirtiéndose en la primera formulación a nivel mundial a base de HOCl con potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas (100). Hasta el momento, el potencial uso de esta sustancia en el área de endodoncia regenerativa no había sido evaluado y en este contexto, este estudio evaluó su efecto *in vitro* sobre células stem. El primer paso para llevar a cabo este proceso fue realizar la obtención y estandarización del cultivo de SCAP a partir de muestras de papilas apicales tomadas de dos pacientes. Posteriormente se aislaron y caracterizaron las SCAP de un tercer donante, las cuales fueron utilizadas en los diversos experimentos realizados en este estudio. Durante el proceso de caracterización celular se pudo confirmar el fenotipo de MSC, observándose su morfología fibroblastoide y su capacidad de formar UFC. Así mismo, con la inmunofenotipificación se pudo evidenciar la alta expresión de los

marcadores de superficie CD105+, CD90+ y CD73+, rasgos característicos de estas células que también han sido identificados en otros estudios (9,101).

El tiempo de doblaje poblacional observado en esta investigación fue de 40.24 horas, similar al encontrado por Wang y col que fue de 40.54 horas en las SCAP del grupo control, las cuales fueron cultivadas en condiciones semejantes a las del presente trabajo; a diferencia de aquellas cultivadas en medios de inducción de mineralización con un contenido adicional de KH_2PO_4 que mostraron tiempos menores, entre 38.22 y 39.47 horas (102). En contraste con lo anterior, Bao y col reportaron un mayor tiempo de doblaje en cultivos de SCAP realizados bajo dos condiciones diferentes: método de crecimiento y método de dispersión enzimática, cuyo tiempo de duplicación fue de 50 y 51 horas respectivamente (101).

La citotoxicidad ha sido definida como la capacidad de un material para impactar en la viabilidad celular, y puede verse reflejada en diversos efectos fisiológicos como la reducción en el crecimiento y proliferación celular, necrosis, apoptosis o combinaciones de estos aspectos. Los ensayos de citotoxicidad por si solos ya no se consideran suficientes para evaluar o predecir todos los aspectos relacionados con la biocompatibilidad de un material (103,104). Por lo tanto, la determinación del efecto citotóxico del HOCl sobre las SCAP en este estudio permitió establecer la CL50 de esta sustancia, parámetro que constituyó un elemento de gran importancia debido a que era necesario determinar la concentración máxima que podría ser utilizada en los cultivos celulares, para poder llevar a cabo posteriormente los experimentos relacionados con el efecto del HOCl sobre el ciclo celular y la expresión de genes de autorenovación y pluripotencia de las SCAP.

Con el fin de medir la capacidad metabólica y obtener el número ideal de SCAP para llevar a cabo los experimentos de viabilidad celular, se realizaron ensayos con resazurina que buscaban evaluar su capacidad para metabolizar este colorante a resofurina. El análisis de datos mostró que las células presentaron un incremento directamente proporcional en la reducción de resazurina al aumentar la densidad celular, con un valor de R^2 de 0,9869; 0,8664 y 0,9358, $p<0,0001$. El metabolismo de la resazurina pareció ser constante en la concentración de 10000 células/pozo a las 48, 72 y 96 horas de incubación, sugiriendo un metabolismo eficiente del compuesto a su estado oxidado, la resofurina; y la confluencia celular de los cultivos fue del 80% a las 72 horas, indicando una adecuada supervivencia celular de las SCAP luego de ese tiempo

de incubación y sin ningún estímulo para su activación. Por lo anterior, esta fue la concentración celular elegida para los experimentos de citotoxicidad.

Teniendo en cuenta que no existía literatura disponible que reportara la CL50 del HOCl sobre las SCAP, para el primer ensayo de citotoxicidad se utilizaron ocho concentraciones evaluadas en un trabajo de investigación previo realizado por el grupo UIBO sobre fibroblastos gingivales humanos, con las cuales habían determinado que la CL50 para esa línea celular era 126 ppm (239µM) a pH 5.6 (105). Los análisis iniciales del presente trabajo, donde fueron utilizadas las mismas condiciones de concentración de HOCl en la investigación previamente descrita (650ppm/1235µM, 500ppm/950µM, 250ppm/475µM, 150ppm/285µM, 125ppm/238µM, 75ppm/143µM, 50 ppm/95µM y 25ppm/48µM) a pH 5.6, no permitieron establecer la CL50, ya que el resultado fue 0.0 con un intervalo de confianza del 95% y valor de R^2 de 0.97. Por lo tanto, se realizó un segundo experimento con menores concentraciones de HOCl (150ppm/285µM, 125ppm/238µM, 75ppm/143µM, 50ppm/95µM, 25ppm/48µM, 12.5ppm/24µM, 7ppm/13µM y 3 ppm/6µM) a pH 5.6, el cual permitió determinar la CL50 en 133µM (~70 ppm) con un IC95% 110-137 µM (58-72 ppm), R^2 de 0.98.

Una publicación reciente comparó el efecto a tres tiempos de exposición (10 minutos, 1 hora y 24 horas) del Endocyn con otros irrigantes que han sido utilizados en endodoncia sobre SCAP, fibroblastos humanos del ligamento periodontal y células de osteosarcoma de rata (UMR-106). El Endocyn es una sustancia cuyo ingrediente activo es el HOCl y en ese estudio el análisis fue realizado utilizando diversas diluciones del mismo (1%, 5%, 10%, 20%, 50%). Los resultados mostraron que el Endocyn fue significativamente menos citotóxico que el hipoclorito de Sodio, la Clorhexidina y el EDTA sobre las tres líneas celulares evaluadas (91). Aunque estos hallazgos son similares a los del presente estudio con relación a la menor citotoxicidad demostrada con respecto al NaOCl, los resultados de Scott y col (2018) difieren con los nuestros en términos de los porcentajes de viabilidad celular observados durante la exposición de las SCAP a diferentes concentraciones de HOCl durante 24 horas. En nuestra investigación se utilizaron concentraciones mucho más bajas que las del estudio previamente mencionado y a pesar de ello, pudimos evidenciar que en las más altas el porcentaje de viabilidad celular era menor. Estos hallazgos pueden estar asociados a que en este trabajo la solución utilizada contenía solo HOCl a las concentraciones evaluadas y a un de pH 5.6; mientras que el Endocyn, aunque su ingrediente activo es el HOCl, también tiene otros componentes que son agua, clorito de sodio, sulfato de sodio y fosfato de sodio monobásico. Los autores no hacen referencia a cuál es la

concentración HOCl exacta del Endocyn ni a su pH, solo indican que es una solución de pH neutro (91), por lo tanto, este aspecto dificulta establecer la razón de la diferencia en los resultados de los dos estudios.

Durante los experimentos realizados con HOCl para establecer la CL50 y sus efectos sobre las SCAP en estudio, utilizamos diluciones de hipoclorito de sodio al 0.5% y 1% como control. Aunque los protocolos clínicos actuales para realizar endodoncia regenerativa sugieren el uso de hipoclorito de sodio al 1.5% (4,89), en este estudio decidimos utilizar concentraciones menores debido a que eran evaluaciones *in vitro,* por lo tanto, la sustancia iba a entrar en contacto directo con las células. Sin embargo, en las dos concentraciones de NaOCl utilizadas, la inhibición en el crecimiento celular fue del 100% (. Un estudio previo que evaluó el efecto del NaOCl sobre células de pulpa humana, mostró cambios significativos en la morfología y número de las células cuando el tiempo de exposición fue de tan solo 5 o 10 minutos, usando concentraciones al 0.16% y 0.33% de NaOCl; y una muerte celular masiva cuando las células se trataron con una dilución al 0,33% de NaOCl durante 15 minutos. A diferencia de lo anterior, en las células expuestas a bajas concentraciones de NaOCl (0,04% y 0,08%) en los mismos tiempos previamente nombrados, no se observaron diferencias significativas en cuanto a su morfología o capacidad proliferativa (67). Así mismo, Mollashahi y col evaluaron la citotoxicidad del NaOCl, EDTA, MTAD, clorhexidina y QMix sobre las SCAP utilizando el ensayo de MTT, sin embargo, la concentración de NaOCl utilizada en ese estudio fue del 5.25% a 1, 5 y 15 minutos de exposición. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p<0.0001$) en el porcentaje de células viables entre los tiempos de exposición de 1 y 15 minutos, correspondientes aproximadamente al 58% y 41% respectivamente (106).

Por su parte Alkahtani y col (2014) evaluaron y compararon la citotoxicidad de diversas concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5, 0.1, 0.025, 0.0125 y 0.005 mg/ml) en MSC de médula ósea inmortalizadas. Los autores encontraron que la viabilidad celular disminuyó con el mayor porcentaje de NaOCl y el tiempo de exposición también reveló una relación inversa con la viabilidad celular. La destrucción de las células, con alteraciones estructurales y lisis fue evidente bajo microscopio de fluorescencia cuando estas fueron expuestas a 0.5 mg/ml de NaOCl. Los investigadores indicaron que la toxicidad mostró una correlación directa con la concentración y la duración de la exposición (107). Esta misma correlación se evidencia en los resultados de Scott y col sobre las SCAP, quienes encontraron que el NaOCl afecta la viabilidad celular cuando la concentración y tiempo de exposición a la sustancia era mayor (91). Los hallazgos de los estudios

previamente descritos podrían sugerir que los resultados del presente trabajo asociados a la muerte celular observada en las SCAP expuestas al NaOCl, pudo ser causada por las diluciones utilizadas y/o por el tiempo de exposición debido a que fue de 24 horas.

Es importante tener en cuenta que los resultados de la evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de las sustancias podrían no ser extrapolables a los efectos observados *in vivo*, debido a que es un análisis completamente celular y las células cultivadas comparadas con los tejidos periapicales son muy susceptibles a los efectos tóxicos de las sustancias evaluadas (108). En condiciones *in vivo*, los irrigantes se pueden diluir con los fluidos corporales, generando una disminución en su concentración. De igual forma, la acción de los fagocitos, sistemas vasculares y linfáticos facilitan su eliminación (106). Por otro lado, el efecto buffer de la dentina podría actuar como inhibidor sobre los irrigantes (50). Por lo tanto, en concentraciones iguales, la citotoxicidad de las sustancias tiende a disminuir con el tiempo en el entorno clínico en comparación con las condiciones *in vitro* (106,109).

Teniendo en cuenta que la CL50 de HOCl sobre las SCAP establecida en este estudio fue 133µM (~70 ppm), se decidió utilizar concentraciones de 75, 50 y 25 ppm a 1, 15 y 30 minutos para evaluar su efecto sobre el ciclo celular. Los intervalos de tiempo se seleccionaron con el fin de reflejar los posibles tiempos de contacto clínico durante los procedimientos de endodoncia regenerativa. Los resultados mostraron que en las tres concentraciones evaluadas se presentó una disminución en la cantidad de células en fase G_0/G_1 en todos los tiempos, a excepción de la concentración de 25 ppm durante 1 minuto. El HOCl a 75ppm por 15 min indujo la mayor cantidad de células a la fase G_2/M con un 50.86% de la población celular esa fase, correspondiente a un aumento del 35% con respecto a la cantidad de células del grupo control. Estos resultados sugieren que el tratamiento con HOCl no altera el ciclo celular y el contenido de ADN de las SCAP y podría generar una activación metabólica de las células y posiblemente inducirlas hacia la fase de mitosis.

El desarrollo de la raíz dental es un proceso durante el cual se cree que las SCAP desempeñan un papel importante (38). Se ha destacado el potencial de esta población celular en la ingeniería de tejidos dentales debido a sus características de autorrenovación y potencial de diferenciación hacia múltiples linajes (9,110). Estudios previos han demostrado que las SCAP tienen capacidad de diferenciación osteo/odontoblástica en condiciones apropiadas *in vitro*, y de formar tejido similar al hueso/dentina *in vivo* (102,111,112). Por lo tanto, en el RT-PCR realizado en este estudio se evaluaron genes asociados a osteogénesis y a diferenciación odontoblástica. Se pudo

evidenciar que con los tratamientos de HOCl de 75 ppm a 1 y 15 minutos se presentó sobreexpresión de OSX, DSPP y DMP-1, y una tendencia a la expresión a la baja de RUNX2 en los tres tiempos de exposición.

La formación de los dientes está regulada por interacciones recíprocas entre el epitelio y el mesénquima, así como por numerosos factores de crecimiento y de transcripción. En el caso de RUNX2, se ha reportado que durante el desarrollo dental se expresa en el mesénquima dental hasta el final de la etapa de casquete, y posteriormente se regula negativamente en la papila dental durante la diferenciación odontoblástica (113). Diversos factores han sido implicados en la diferenciación y maduración de los odontoblastos, entre ellos se ha encontrado que RUNX2 y RUNX3 cooperan regulando la expresión de OSX durante la diferenciación de estas células (114).

OSX desempeña un papel esencial en la formación de huesos y dientes (115). En etapas tempranas del desarrollo de la corona dental, OSX es altamente expresado en el mesénquima al igual que RUNX2. Sin embargo, desde el estadío de campana hasta el desarrollo dental postnatal, solo se expresa OSX durante el desarrollo radicular, mientras que la expresión de RUNX2 disminuye significativamente. Con base en los patrones de expresión temporoespacial de RUNX2 y OSX, ha sido propuesto que estos dos genes desempeñan una función en la morfogénesis dental y en la diferenciación de odontoblastos, respectivamente (46,113,116).

Por otra parte, se ha demostrado que OSX es capaz de promover la expresión y secreción de DSPP (116). Los odontoblastos sintetizan y secretan proteínas colágenas y no colágenas para formar matriz extracelular de dentina. Entre ellas se encuentra la DSPP, proteína fosforilada que representa uno de los principales componentes de la matriz extracelular de dentina, es altamente expresada por los odontoblastos y esencial para la dentinogénesis (117). La transcripción de DSPP es específica para el linaje de odontoblastos durante la etapa secretora del desarrollo dental. El gen DSPP codifica las dos principales proteínas no colágenas de la matriz de la dentina: la sialoproteína de la dentina (DSP) y la fosfoproteína de la dentina (DPP), las cuales son esenciales para la biomineralización de la misma (48). Teniendo en cuenta lo anterior, OSX se considera un regulador clave no solo para la aposición de la matriz de dentina, sino también para la diferenciación odontoblástica y la mineralización.

DMP-1 es una proteína de matriz extracelular no colágena, identificada a partir de la matriz mineralizada de dentina y hueso (118). Esta proteína se requiere para el crecimiento y desarrollo normal del hueso, cartílago y la dentina. Tiene una función reguladora durante la formación de la

matriz mineralizada de la dentina y se ha demostrado que DMP-1 funciona como una molécula de señalización que induce la diferenciación de las DPSC hacia un fenotipo odontoblástico (119).

DMP-1 se expresa en células de pulpa como en odontoblastos. Se ha observado que al suprimir el gen DMP-1 se generan defectos en la odontogénesis y la mineralización que involucran principalmente una falla parcial de la maduración de la predentina, cámaras pulpares agrandadas, aumento en el diámetro de la zona de predentina con una pared de dentina reducida, hipomineralización, una reducción de tres veces en la tasa de aposición dentinaria y anormalidades en los túbulos dentinales. Lo anterior sugiere que DMP1 es un regulador clave de la diferenciación odontoblástica, la formación del sistema tubular de la dentina y la mineralización; y que se requiere expresión de DMP1 tanto en odontoblastos tempranos como tardíos para que se produzca el desarrollo normal de la odontogénesis (120,121).

Teniendo en cuenta que el control coordinado de la autorrenovación y diferenciación de las células stem es fundamental para mantener la homeostasis de los tejidos y los órganos, se evaluó también la expresión de p53, cuya función está asociada con el control de la proliferación, autorrenovación y diferenciación de MSC (81). Se ha reportado que la ausencia completa de p53 promueve una mayor tasa de proliferación de MSCs derivadas de médula ósea. Además de controlar la proliferación y la transformación, p53 también influye en la diferenciación de las MSC. Las MSCs que carecen de p53 generalmente se diferencian en adipocitos u osteocitos más rápidamente que las MSC de tipo salvaje (Wild-type). Esta mayor diferenciación ocurre de forma simultánea con la sobreexpresión de factores de diferenciación osteoblástica como OSX y RUNX2. Por el contrario, se ha observado que las células progenitoras de osteoblastos con actividad elevada de p53 muestran una proliferación reducida y una diferenciación reducida, lo que indica que p53 puede regular negativamente el proceso de diferenciación. Se cree que la diferenciación acelerada en combinación con un aumento en el factor estimulador de colonias de macrófagos genera el aumento en la masa ósea que se observa en ausencia de p53 (81,122,123). Los resultados de este estudio mostraron una expresión a la baja de p53 en las concentraciones de 25 ppm y 75 ppm de HOCl a 15 minutos de exposición, y especialmente en la concentración de 75 ppm a 1 y 15 minutos se observó una sobreexpresión de genes relacionados con diferenciación odontoblástica.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de ciclo celular, RT-PCR y los hallazgos observados en la expresión de los genes de mineralización DSP, DMP y OSX y la

tinción Von Kossa, se decidió utilizar la concentración de 75 ppm de HOCl a 1 y 15 minutos sobre las SCAP, para llevar a cabo el PCR Array. Los resultados mostraron una sobreexpresión de 9 genes en las células tratadas con 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, a diferencia de las sometidas al tratamiento durante 15 minutos donde se observó una expresión a la alta de 26 genes, incluidos los nueve que se sobreexpresaron en el grupo de 1 minuto. Por otra parte, se encontró una expresión a la baja de 17 genes en el grupo de SCAP tratadas durante 15 minutos y de 23 genes en las células sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 minuto, incluidos los 17 del grupo de 15 minutos.

La ontología génica (GO) define el universo de conceptos relacionados con las funciones de los genes (Términos GO), y cómo estas funciones están relacionadas entre sí. La GO describe la función con respecto a tres aspectos: 1. Función molecular (actividades de nivel molecular realizadas por los productos de los genes); 2. Componente celular (localización que hace referencia a las estructuras celulares en las que un producto génico realiza una función); y 3. Proceso biológico (son los procesos más grandes, o 'programas biológicos' realizados por múltiples actividades moleculares) (124). Un proceso biológico es una serie reconocida de eventos o funciones moleculares, con un principio y un final definidos (125). Teniendo en cuenta que un aspecto importante en el campo de la endodoncia regenerativa es promover la proliferación y diferenciación de las SCAP (126), se utilizaron los resultados obtenidos en el PCR Array para llevar a cabo un análisis en STRING con el fin de identificar las interacciones entre los genes, y determinar si estaban relacionados con procesos biológicos asociados a morfogénesis, proliferación, diferenciación y odontogénesis.

Por otra parte, con el análisis realizado en STRING se encontraron algunas vías de señalización involucradas en la regulación de la formación, homeostasis y diferenciación de DSC en el diente en desarrollo y durante la edad adulta. Una vía de señalización está mediada por una serie de proteínas celulares que transfieren una señal biológica desde un receptor en la membrana celular, al ADN en el núcleo celular. La ruta comienza con una molécula de señalización que se une al receptor de membrana y finaliza cuando el ADN nuclear genera las proteínas y produce algunos cambios celulares como por ejemplo la diferenciación celular (127). Mediante el análisis bioinformático fueron identificadas varias vías de señalización relacionadas con genes sobreexpresados en las SCAP sometidas a 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos, entre ellas la TGF-β, WNT y MAPK, cuya importancia en la regulación las funciones de las SCAP ha sido reportada previamente en la literatura (128).

El mantenimiento, la proliferación, la migración y la diferenciación de las DSC están regulados por una variedad de vías de señalización. Estas vías pueden afectarse entre sí sinérgicamente para mantener la supervivencia celular, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación y otros procesos celulares de las DSC. Se ha observado que numerosos genes regulan la diferenciación odonto / osteogénica e interactúan o interfieren a través de las vías de señalización de Notch, Wnt, TGF-β / BMP y cadherina. Otras vías de señalización KEGG identificadas en el análisis de STRING que estuvieron relacionadas con genes sobreexpresados en los dos grupos de tratamiento fueron la vía PI3K/AKT que es clave en la regulación de procesos celulares como la supervivencia celular, el crecimiento, la migración, la apoptosis, la transcripción y traducción; y la vía de MAPK que ha sido relacionada con la regulación de la actividad ALP de las DPSC y puede interactuar con la vía Smad (129).

Con STRING se pudo evidenciar que los genes sobreexpresados CTNNB1, BMP4, FGF10 e ITGA6 tuvieron relación con dos procesos biológicos que podrían ser de interés en el campo de la endodoncia regenerativa, estos fueron “GO.0042475 odontogénesis del diente que contiene dentina” y “GO.0042476 odontogénesis”. CTNNB1 y BMP4 fueron los genes más representativos entre aquellos que presentaron una expresión a la alta, debido a que también tuvieron relación con procesos biológicos asociados a morfogénesis, proliferación y diferenciación. El gen CTNNB1 codifica la proteína β-Catenina, que es el componente central de la vía de señalización Wnt canónica (130). Esta vía de señalización KEGG fue identificada en el análisis de genes sobreexpresados por las SCAP tratadas con 75 ppm de HOCl durante 1 y 15 minutos.

La familia Wnt consiste en al menos 19 ligandos codificados tanto en el genoma humano como de ratón. Las Wnts son proteínas secretadas que se encuentran entre los factores más potentes que regulan la autorrenovación de las células stem, y tienen un gran potencial para promover la regeneración tisular. La señalización Wnt regula la proliferación celular, migración, diferenciación y apoptosis (131). La vía canónica Wnt es un componente clave en la inducción de las interacciones epitelio-mesenquimales, y participa activamente en la morfogénesis del tejido dental y periodontal (129). Aunque algunos estudios han encontrado que la sobreexpresión de β-catenina suprime la capacidad de mineralización de los osteoblastos maduros (132) y la diferenciación a un fenotipo similar a los odontoblastos de las DPSC (133), otros autores indican que la vía canónica de Wnt / β-catenina puede facilitar la proliferación de las SCAP y han sugerido que es posible que esta vía de señalización pueda potenciar su capacidad dentinogénica

relacionándolo con sus características biológicas, ya que esta población celular tiene propiedades de células stem / progenitoras tempranas (134).

Zhang y col también reportaron que la β-catenina desempeña un papel importante en la diferenciación osteo/odontogénica de las SCAP. Los autores encontraron que Wnt3A inducía eficazmente la actividad de ALP en SCAP de ratón inmortalizadas (iSCAP), y el silenciamiento de β-catenina en estas células generaba una disminución en la expresión de osteocalcina / osteopontina inducida por BMP9 / WNT3A, así como la mineralización de la matriz *in vitro* y la formación de hueso ectópico *in vivo* (135).

Por otra parte, la familia de genes BMP pertenece a la superfamilia de TGF-β. Hasta el momento, se han identificado más de 20 miembros en la familia de BMP. BMP2 y BMP4 se agrupan como la subfamilia dpp debido a su similitud con el gen dpp ancestral (decapentaplégico) de Drosophila. La señalización de BMP es importante para el desarrollo dental debido a que regula la morfogénesis temprana de los dientes y la posterior diferenciación de los odontoblastos. La expresión de BMP4 se incrementa en preodontoblastos y disminuye después de su diferenciación, mientras que la expresión de BMP2 está regulada positivamente durante la diferenciación terminal de odontoblastos. Estos datos sugieren que la expresión de BMP induce la diferenciación odontoblástica (136).

Durante el desarrollo dental, las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig (HERS) participan en la formación de la raíz después del desarrollo de la corona. En las papilas dentales han sido identificadas células BMP4 positivas y se ha sugerido que BMP4 regula el desarrollo radicular controlando la longitud de la HERS y el mantenimiento de la proliferación de sus células (131,137). De igual forma, durante la formación radicular se ha observado expresión de BMP4 en los preodontoblastos adyacentes a HERS (138).

En el PCR array también se evidenció una sobreexpresión de FGF10 e ITGA6 en las SCAP tratadas con HOCl, los cuales mostraron en STRING una relación con procesos biológicos de odontogénesis. La familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) participa en múltiples procesos biológicos que incluyen proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Los FGF juegan un papel crucial en el diente en desarrollo y FGF10 ha sido asociado con la vía Wnt durante la odontogenesis. Un estudio previo realizado en ratones demostró que la señalización de FGF10 en el mesénquima regulaba indirectamente la división celular y el destino de las células

stem epiteliales mediante la modulación de la vía Notch. Por otra parte, se ha encontrado que FGF10 interviene en la morfogénesis y se ha observado que la supresión de este gen en ratones conlleva a la formación de órganos dentales hipoplásicos (139,140).

Por otra parte, ITGA6 es el gen que codifica un miembro de la familia de proteínas conocidas como integrinas de cadena alfa. La adhesión está mediada en gran medida por integrinas, las cuales modulan la organización del citoesqueleto y son mediadoras en múltiples vías de señalización involucradas en la proliferación, adhesión, migración y diferenciación, a través de la transmisión de señales al interior y exterior. Ha sido propuesto que ITGA6 interviene en la osteogénesis mediada por integrinas en células stem mesenquimales, y parecen ser los factores predominantes implicados en la diferenciación de DPSC hacia osteoblastos. Se ha sugerido que teniendo en cuenta que la odontogénesis en células de pulpa dental humana está estrechamente relacionada con procesos mediados por integrinas, y se podría suponer que ITGA6 podría desempeñar un papel en la regulación de la diferenciación de DPSC humanas (141) .

Otro de los genes que se sobreexpresó en las SCAP tratadas con HOCl durante 1 y 15 minutos fue SMAD 4, el cual según el análisis de STRING tiene relación con varios procesos biológicos tanto de morfogénesis como proliferación y diferenciación. El gen SMAD4 proporciona instrucciones para hacer que una proteína participe en la transmisión de señales químicas desde la superficie de la célula al núcleo. En el núcleo, el complejo proteico SMAD se une a áreas específicas del ADN donde controla la actividad de genes particulares y regula el crecimiento y la división celular (proliferación) (142).

La superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) se compone de TGF- βs, BMP, activinas y proteínas relacionadas. La señalización de TGF- β desempeña un papel importante en la regulación de una variedad de funciones celulares, incluida la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y la síntesis de matriz. La señalización de TGF- β / BMP es necesaria para la diferenciación de odontoblastos y la formación de dentina. La proteína SMAD4 es parte de la vía de señalización TGF-β, y es el mediador común para las vías de TGF-β / BMP canónicas, que son esenciales para la diferenciación de odontoblastos y en la formación de dentina (143).

Se ha observado que la falta de SMAD produce defectos morfológicos y funcionales en el odontoblasto durante la dentinogénesis (114,144). Un estudio previo realizado en ratones mostró

que la supresión de SMAD4 genera alteración en la polarización de los odontoblastos, disminución en la expresión de DSPP y en la tasa de aposición de dentina. También produce un desarrollo radicular anormal debido a la alteración en la diferenciación de los odontoblastos radiculares. Esta interrupción afecta las vías de señalización BMP mesenquimales y como consecuencia altera el destino de la HERS y de los restos epiteliales de malassez favoreciendo la formación de tumores odontogénicos queratoquísticos. Lo anterior sugiere que se requiere la acción de SMAD4 a nivel intracelular, debido a que interviene en la retroalimentación positiva de la ruta de señalización TGF-β / BMP durante la diferenciación terminal de los odontoblastos (145).

El gen RHOA también mostró una sobreexpresión en las SCAP tratadas con HOCl durante 1 y 15 minutos, y el análisis en STRING evidenció que se relaciona con procesos biológicos asociados a morfogénesis, proliferación y diferenciación. Este gen codifica una proteína de unión a GTP de peso molecular pequeño que pertenece a la familia Rho (Ras-homólogo), involucrada en los cambios del citoesqueleto. Las Rho GTPasas regulan muchas actividades celulares tales como motilidad, transporte de vesículas, progresión a través del ciclo celular, diferenciación, transcripción génica y apoptosis (146). También desempeñan un papel central en la regulación de la forma y polaridad celular a través de sus efectos sobre la polimerización de actina, la contractilidad de actomiosina y la dinámica de microtúbulos (147).

Hallazgos previos han evidenciado que la expresión de RHOA aumenta en la fase de citodiferenciación durante el desarrollo del germen dental, y que su inhibición durante el desarrollo del germen dental causa daños en la estructura de empalizadas de los odontoblastos y ameloblastos. Por lo tanto, se ha sugerido que estas GTPasas podrían estar involucradas en el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares en ameloblastos y odontoblastos. Por otra parte, las proteínas Rho son importantes para la regulación de la expresión de DSPP (148).

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de los procedimientos de endodoncia regenerativa es lograr un aumento en el diámetro y/o longitud radicular a partir de la aposición de dentina, es de gran importancia favorecer la viabilidad y posterior diferenciación a un fenotipo similar odontoblástico de las SCAP. Este estudio permitió dilucidar los efectos positivos del HOCl sobre estas células, especialmente a una concentración de 75 ppm con un tiempo de exposición de 15 minutos, debido a que conllevó a una sobreexpresión de diversos genes asociados a diferenciación odontoblástica y dentinogénesis. La tinción realizada con Von Kossa a las células tratadas evidenció la aposición de depósitos de calcio sobre las SCAP como indicador de

diferenciación hacia un perfil mineralizante. Así mismo, se observó una expresión a la alta de genes asociados con procesos biológicos relacionados con proliferación celular. Estos resultados constituyen una línea de base para futuros estudios que permitan establecer si el HOCl podría ser utilizado como irrigante en el campo de endodoncia regenerativa.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los hallazgos de este trabajo de investigación sugieren que el HOCl no afecta la viabilidad ni estabilidad fenotípica pluripotencial de las SCAP. Se detectó que las SCAP mantenían su metabolismo activo luego del tratamiento con HOCl.

- Las tres concentraciones de HOCl evaluadas, 75ppm (143µM), 50ppm (95µM), 25ppm (48µM); mostraron un incremento en la cantidad de SCAP en fase S del ciclo celular. Lo anterior podría sugerir que el HOCl promueve la proliferación celular.

- La concentración de HOCl a 75ppm(143µM) fue la que indujo la mayor sobreexpresión de genes asociados a diferenciación odontoblástica y dentinogénesis, al igual que aquellos relacionados con el mantenimiento de autorenovación y pluripotencia en las SCAP.

- Con el fin de establecer si el HOCl podría ser un irrigante ideal para el uso en endodoncia regenerativa, se sugiere realizar más estudios que permitan evaluar su capacidad para eliminar biofilms y/o microorganismos relacionados con infección intrarradicular, su capacidad de disolución del tejido, el efecto sobre la dentina y sus interacciones con los irrigantes endodónticos actuales.

11. LIMITACIONES

Este estudio *in vitro* tiene las siguientes limitaciones: Se realizó en células cultivadas de un solo paciente y los resultados representan la respuesta de células aisladas que entraron en contacto directo con las sustancias evaluadas, sin tener en cuenta el mecanismo de defensa del huésped para la detoxificación. Además, en un entorno clínico, las soluciones siempre se administran a los conductos radiculares, los cuales están rodeados por dentina que podría neutralizar el efecto de las sustancias o, por el contrario, verse afectada por las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Law AS. Considerations for regeneration procedures. J Endod 2013;39(3):S56.

(2) Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. Endodontic Topics 2013;28(1):2-23.

(3) Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. Dent Clin North Am 2017;61(1):111-125.

(4) Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, et al. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. Int Endod J 2016;49(8):717-723.

(5) Chrepa V, Henry MA, Daniel BJ, Diogenes A. Delivery of apical mesenchymal stem cells into root canals of mature teeth. J Dent Res 2015;94(12):1653-1659.

(6) Hargreaves, Diogenes, Teixeira. Treatment Options: Biological Basis of Regenerative Endodontic Procedures. Journal of Endodontics 2013 3;39(3):S43.

(7) Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. J Endod 2011;37(2):133-138.

(8) Huang G, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res 2009;88(9):792-806.

(9) Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PloS one 2006;1(1):e79.

(10) Huang G, Garcia-Godoy F. Missing concepts in de novo pulp regeneration. J Dent Res 2014;93(8):717-724.

(11) Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. J Endod 2017;43(4):561-567.

(12) Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational Science in Disinfection for Regenerative Endodontics. J Endod 2014;40(4):S57.

(13) Lafaurie GI, Calderón JL, Zaror C, Millan LV, Castillo DM. Acido Hipocloroso: una Nueva Alternativa como Agente Antimicrobiano y para la Proliferación Celular para Uso en Odontología. International journal of odontostomatology 2015;9(3):475-481.

(14) Serhan Sakarya M, Necati Gunay M, Meltem Karakulak M, Barcin Ozturk M, Bulent Ertugrul M. Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. Wounds 2014;26:342-350.

(15) Lafaurie GI, Zaror C, Díaz-Báez D, Castillo DM, De Ávila J, Trujillo TG, et al. Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial. Int J Dent Hyg 2018 Apr 02,.

(16) del Rosario Aya M, Lafaurie GII, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millán LV, et al. Eficacia Desinfectante Del Acido Hipocloroso Sobre Cepas Con Poder Patogénico De Cavidad Oral. Revista Colombiana de Investigación en Odontología 2009;1(1).

(17) Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderón JL, et al. Viability and Effects on Bacterial Proteins by Oral Rinses with Hypochlorous Acid as Active Ingredient. Braz Dent J 2015;26(5):519-524.

(18) Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. J Endod 2008;34(12):1474-1479.

(19) Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. J Endod 2008;34(12):1474-1479.

(20) Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. J Endod 2010;36(5):781-789.

(21) Abuarqoub D, Awidi A, Abuharfeil N. Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. Arch Oral Biol 2015;60(10):1545-1553.

(22) Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics–biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. Aust Dent J 2010;55(4):446-452.

(23) Bansode PV, Pathak SD, Wavdhane MB, Khedgikar SB, Chavan PV. Regenerative Endodontics; Pulp Reincarnation. Journal of Dental and Medical Sciences 2016;Volume 15(Issue 12):32-36.

(24) American Dental Association. CDT 2011-2012: Current Dental Terminology: the ADA Practical Guide to Dental Procedure Codes. : American Dental Association; 2010.

(25) Eleazer P, Glickman G, McClanahan S, Webb T, Jusrman B. Glossary of endodontic terms. Editorial AAE: Chicago 2012.

(26) Kim SG, Zheng Y, Zhou J, Chen M, Embree MC, Song K, et al. Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. Endodontic Topics 2013;28(1):106-117.

(27) Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment Options: Biological Basis of Regenerative Endodontic Procedures. J Endod 2013;39(3, Supplement):S43.

(28) Dominici, Le Blanc, Mueller, Slaper-Cortenbach, Marini, Krause, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315-317.

(29) Romero JAA, Guerrero DMP, Pardo VMR. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. Nova 2007;5(8).

(30) Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. J Endod 2013;39(3):S43.

(31) Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. J Cell Physiol 2010;222(2):268-277.

(32) Melton D. “Stemness”: definitions, criteria, and standards. Handbook of Stem Cells (Second Edition): Elsevier; 2013. p. 5-12.

(33) Nakashima M, Iohara K, Murakami M. Dental pulp stem cells and regeneration. Endodontic Topics 2013;28(1):38-50.

(34) Hosoya A, Nakamura H. Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue. Japanese Dental Science Review 2015;51(3):75-83.

(35) da Rosa W, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. Int Endod J 2018.

(36) Munévar Niño JC, Becerra Calixto, Andrea del Pilar, Bermúdez Olaya C. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. Acta Odontológica Venezolana 2013;46(3).

(37) Sharma, Sikri, Sharma, Sharma. Regeneration of tooth pulp and dentin : trends and advances. Annals of Neurosciences 2010 01;17(1):31-43.

(38) Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod 2008;34(2):166-171.

(39) Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Declercq H, Martens L, De Coster P. Gene expression profiling and molecular signaling of various cells in response to tricalcium silicate cements: a systematic review. J Endod 2016;42(12):1713-1725.

(40) Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. J Endod 2009;35(6):818-823.

(41) Agata H, Kagami H, Watanabe N, Ueda M. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells. Differentiation 2008;76(9):981-993.

(42) Abe S, Imaizumi M, Mikami Y, Wada Y, Tsuchiya S, Irie S, et al. Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010 Jan;109(1):149-154.

(43) Yan M, Wu J, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, et al. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway. J Endod 2014;40(5):640-647.

(44) Saber SEM. Tissue engineering in endodontics. J Oral Sci 2009;51(4):495-507.

(45) Wang Y, Li J, Song W, Yu J. Mineral trioxide aggregate upregulates odonto/osteogenic capacity of bone marrow stromal cells from craniofacial bones via JNK and ERK MAPK signalling pathways. Cell Prolif 2014;47(3):241-248.

(46) Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. J Dent Res 2009;88(10):904-909.

(47) Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. J Dent Res 2009;88(10):904-909.

(48) Jin Y, Wang C, Cheng S, Zhao Z, Li J. MicroRNA control of tooth formation and eruption. Arch Oral Biol 2017;73:302-310.

(49) Conde M, Chisini LA, Sarkis-Onofre R, Schuch HS, Nör JE, Demarco FF. A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation. Int Endod J 2017;50(9):860-874.

(50) Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. J Endod 2011;37(8):1109-1115.

(51) Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. J Endod 2011;37(11):1536-1541.

(52) Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. Dent Clin North Am 2010;54(2):291-312.

(53) Pang N, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, et al. Effect of EDTA on Attachment and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. J Endod 2013.

(54) Sam C, Lu H. The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. Journal of Dental Sciences 2009;4(2):45-54.

(55) Harper R, Wu K, Chang MM, Yoneda K, Pan R, Reddy SP, et al. activation of Nuclear Factor-κ B Transcriptional Activity in Airway Epithelial Cells by Thioredoxin but Not by N-acetyl-cysteine and Glutathione. American journal of respiratory cell and molecular biology 2001;25(2):178-185.

(56) Garcia F, Murray PE, Garcia-Godoy F, Namerow KN. Effect of aquatine endodontic cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. Journal of Applied Oral Science 2010;18(4):403-408.

(57) Sandra HR, Claudia S, Juan G. Actividad bactericida del ácido hipocloroso sobre 5 cepas causantes de infección nosocomial. Revista Universidad nacional de Colombia 2002;15:136-142.

(58) Gruber JF, Tano D, Teran C. Propiedades del ácido hipocloroso como irrigante en endodoncia: remoción del barrillo dentinarioUniversidad El Bosque; 2011.

(59) Law AS. Considerations for regeneration procedures. J Endod 2013;39(3):S56.

(60) Fouad AF, Nosrat A. Pulp regeneration in previously infected root canal space. Endodontic Topics 2013;28(1):24-37.

(61) Petrino, Boda, Shambarger, Bowles, McClanahan. Challenges in Regenerative Endodontics: A Case Series. Journal of Endodontics 2010 03;36(3):536-541.

(62) Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. Int Endod J 2009;42(12):1118-1126.

(63) Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endod 2004;30(4):196-200.

(64) Bryce G, O'donnell D, Ready D, Ng Y, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single-and dual-species biofilms. J Endod 2009;35(9):1243-1248.

(65) Martin, De Almeida, Henry, Khaing, Schmidt, Teixeira, et al. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. Journal of Endodontics 2014 1;40(1):51-55.

(66) Ding, Cheung, Chen, Yin, Wang, Zhang. Pulp Revascularization of Immature Teeth With Apical Periodontitis: A Clinical Study. Journal of Endodontics 2009 5;35(5):745-749.

(67) Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2011;112(5):662-666.

(68) David E. Martin, DDS, Jose Flavio A. De Almeida, DDS, Michael A. Henry, DDS, et al. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. ;40.

(69) Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2011;112(5):662-666.

(70) Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. Journal of Endodontics 2014;40(1):133-139.

(71) Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. J Endod 2013;39(1):138-144.

(72) Shimizu E, Ricucci D, Albert J, Alobaid AS, Gibbs JL, Huang GT, et al. Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. J Endod 2013;39(8):1078-1083.

(73) da Silva, Lea Assed Bezerra, Nelson-Filho P, da Silva, Raquel Assed Bezerra, Flores DSH, Heilborn C, Johnson JD, et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2010;109(5):779-787.

(74) Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, et al. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. J Endod 2011;37(3):390-397.

(75) Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. J Endod 2012.

(76) Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. Journal of Endodontics 2010 11;36(11):1805-1811.

(77) Ruparel, de Almeida, Henry, Diogenes. Characterization of a Stem Cell of Apical Papilla Cell Line: Effect of Passage on Cellular Phenotype. Journal of Endodontics 2013 3;39(3):357-363.

(78) Rasmussen ES. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. In vitro and molecular toxicology 1999;12(1):47-58.

(79) Atale N, Gupta S, Yadav U, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. J Microsc 2014;255(1):7-19.

(80) Cummings BS, Wills LP, Schnellmann RG. Measurement of cell death in mammalian cells. Current protocols in pharmacology 2012;56(1):12.8. 24.

(81) Solozobova V, Blattner C. p53 in stem cells. World journal of biological chemistry 2011;2(9):202.

(82) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods 2001;25(4):402-408.

(83) The University of Utah Eccles Health Sciences Library. Histology Procedure Manuals: VonKossa Stain for calcium. 2017; Available at: https://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MANUALS.html.

(84) Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. J Dent 2008;36(6):379-386.

(85) Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod 2008;34(6):645-651.

(86) Lee B, Moon J, Chang H, Hwang I, Oh W, Hwang Y. A review of the regenerative endodontic treatment procedure. Restorative dentistry & endodontics 2015;40(3):179-187.

(87) Martin DE, De Almeida, Jose Flavio A, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. J Endod 2014;40(1):51-55.

(88) Lin LM, Kahler B. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry 2017;51(3 Suppl 1):S41.

(89) American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. 2016; Available at: https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf.

(90) Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. Int Endod J 2016;49(6):581-590.

(91) Scott MB, Zilinski GS, Kirkpatrick TC, Himel VT, Sabey KA, Lallier TE. The Effects of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla, Including Endocyn. J Endod 2018;44(2):263-268.

(92) FDA U.S Food & Drug Administration. 510(k) Premarket Notification: Endocyn. 2014; Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K141352. Accessed Apr 1, 2018.

(93) Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. Journal of burns and wounds 2007;6.

(94) Winter J, Ilbert M, Graf P, Ozcelik D, Jakob U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. Cell 2008;135(4):691-701.

(95) Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo, Jose Antonio Poli. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone®, Aquatine Alpha Electrolyte® and sodium hypochlorite. Australian Endodontic Journal 2013;39(2):57-61.

(96) Ghisi AC, Kopper PMP, Baldasso FE, Stürmer CP, Rossi-Fedele G, Steier L, et al. Effect of superoxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic components of bovine root dentin. J Endod 2015;41(6):925-930.

(97) Ghisi AC, Kopper PMP, Baldasso FE, Stürmer CP, Rossi-Fedele G, Steier L, et al. Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness. Braz Dent J 2014;25(5):420-424.

(98) Kunawarote S, Nakajima M, Shida K, Kitasako Y, Foxton RM, Tagami J. Effect of dentin pretreatment with mild acidic HOCl solution on microtensile bond strength and surface pH. J Dent 2010;38(3):261-268.

(99) Singla MG, Garg A, Gupta S. MTAD in endodontics: an update review. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2011;112(3):e76.

(100) Calderón JL. ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)"Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia". Laboratorio Actual 2010;42:27-31.

(101) Bao Tran HL, HuyenDinh T, Thu Nguyen H. Stem cells from apical papilla and their properties in two primary culture methods. International Journal of Biomedical Research 2014 Aug 30,;5(8):516.

(102) Wang L, Yan M, Wang Y, Lei G, Yu Y, Zhao C, et al. Proliferation and osteo/odontoblastic differentiation of stem cells from dental apical papilla in mineralization-inducing medium containing additional KH2PO4. Cell Prolif 2013;46(2):214-222.

(103) Peters OA. Research that matters–biocompatibility and cytotoxicity screening. Int Endod J 2013;46(3):195-197.

(104) Labban N, Yassen GH, Windsor LJ, Platt JA. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. Dental Traumatology 2014;30(6):429-434.

(105) Justo Leonardo Calderón Mendoza. Efecto in vitro de una solución estabilizada de ácido hipocloroso (HOCl) para uso odontológico sobre la expresión de factores de crecimiento y el ciclo celular en fibroblastos orales humanosUniversidad El Bosque; 2016.

(106) Mollashahi NF, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. Iranian endodontic journal 2016;11(4):293.

(107) Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. The journal of contemporary dental practice 2014;15(4):473-481.

(108) Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O, Muftuoglu S, Zeybek ND, Küçükkaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. Med Sci Monit Basic Res 2014 Mar 10,;20:22-26.

(109) Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. J Endod 2005;31(10):746-748.

(110) Chopra H, Hans MK, Shetty S. Stem cells-the hidden treasure: a strategic review. Dental research journal 2013;10(4):421.

(111) Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell–mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. Tissue Engineering Part A 2009;16(2):605-615.

(112) Li J, Yan M, Wang Z, Jing S, Li Y, Liu G, et al. Effects of canonical NF-κB signaling pathway on the proliferation and odonto/osteogenic differentiation of human stem cells from apical papilla. BioMed research international 2014;2014.

(113) Kim TH, Bae CH, Lee JC, Kim JE, Yang X, de Crombrugghe B, et al. Osterix regulates tooth root formation in a site-specific manner. J Dent Res 2015;94(3):430-438.

(114) de Sousa-Romero L, Moreno-Fernandez AM. Growth and transcription factors in tooth development. International Journal of Oral and Craniofacial Science 2016;2(1):15.

(115) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002;108(1):17-29.

(116) He YD, Sui BD, Li M, Huang J, Chen S, Wu LA. Site-specific function and regulation of Osterix in tooth root formation. Int Endod J 2016;49(12):1124-1131.

(117) D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. Journal of Bone and Mineral Research 1997;12(12):2040-2049.

(118) Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, et al. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca2+ store. J Biol Chem 2003 May 09,;278(19):17500-17508.

(119) Alsanea R, Ravindran S, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. Biomimetic approach to perforation repair using dental pulp stem cells and dentin matrix protein 1. J Endod 2011 Aug;37(8):1092-1097.

(120) Qin C, D'Souza R, Feng JQ. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. J Dent Res 2007 Dec;86(12):1134-1141.

(121) Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, et al. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. Dev Biol 2007;303(1):191-201.

(122) Molchadsky A, Shats I, Goldfinger N, Pevsner-Fischer M, Olson M, Rinon A, et al. p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. PloS one 2008;3(11):e3707.

(123) Wang X, Kua H, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, et al. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. J Cell Biol 2006 -1-2;172(1):115-125.

(124) Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. Nucleic Acids Res 2016;45(D1):D338.

(125) Gene Ontology Consortium. Biological Process Ontology Guidelines. Available at: http://geneontology.org/page/biological-process-ontology-guidelines.

(126) Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. Endodontic Topics 2013;28(1):2-23.

(127) Liu G, Ma S, Zhou Y, Lu Y, Jin L, Wang Z, et al. Signaling pathways in dental stem cells during their maintenance and differentiation. Dental Stem Cells: Springer; 2016. p. 69-92.

(128) Diao S, Lin X, Wang L, Dong R, Du J, Yang D, et al. Analysis of gene expression profiles between apical papilla tissues, stem cells from apical papilla and cell sheet to identify the key modulators in MSCs niche. Cell Prolif 2017;50(3).

(129) Liu G, Ma S, Zhou Y, Lu Y, Jin L, Wang Z, et al. Signaling Pathways in Dental Stem Cells During Their Maintenance and Differentiation. Dental Stem Cells: Springer, Cham; 2016. p. 69-92.

(130) Wu X, Hu L, Li Y, Li Y, Wang F, Ma P, et al. SCAPs Regulate Differentiation of DFSCs During Tooth Root Development in Swine. International journal of medical sciences 2018;15(4):291.

(131) Zhang F, Song J, Zhang H, Huang E, Song D, Tollemar V, et al. Wnt and BMP Signaling Crosstalk in Regulating Dental Stem Cells: Implications in Dental Tissue Engineering. Genes Dis 2016 Dec;3(4):263-276.

(132) Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, Koedam M, Chiba H, Uitterlinden AG, et al. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. J Cell Biochem 2008;104(2):568-579.

(133) Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/β-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. J Dent Res 2008;87(2):126-130.

(134) Wang J, Liu B, Gu S, Liang J. Effects of Wnt/β-catenin signalling on proliferation and differentiation of apical papilla stem cells. Cell Prolif 2012;45(2):121-131.

(135) Zhang H, Wang J, Deng F, Huang E, Yan Z, Wang Z, et al. Canonical Wnt signaling acts synergistically on BMP9-induced osteo/odontoblastic differentiation of stem cells of dental apical papilla (SCAPs). Biomaterials 2015;39:145-154.

(136) Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. Int J Dev Biol 2004;50(6):511-521.

(137) Hosoya A, Kim J, Cho S, Jung H. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. Cell Tissue Res 2008;333(3):503.

(138) Jung H, Hosoya A, Kim J, Cho S. The Role of BMP4 in HERS during Tooth Root Development. Journal of Oral Biosciences 2008;50(3):160-166.

(139) Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, et al. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. Development 2002 Mar;129(6):1533-1541.

(140) Aurrekoetxea M, Irastorza I, García-Gallastegui P, Jiménez-Rojo L, Nakamura T, Yamada Y, et al. Wnt/β-Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. Front Cell Dev Biol 2016;4:25.

(141) He L, Pan S, Li Y, Zhang L, Zhang W, Yi H, et al. Increased proliferation and adhesion properties of human dental pulp stem cells in PLGA scaffolds via simulated microgravity. Int Endod J 2016 Feb;49(2):161-173.

(142) National Library of Medicine, (US). Genetics Home Reference: SMAD4 gene. Available at: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SMAD4.

(143) Kim T, Bae C, Lee J, Lee J, Ko S, Chai Y, et al. Temporo-spatial requirement of Smad4 in dentin formation. Biochem Biophys Res Commun 2015;459(4):706-712.

(144) Yun C, Choi H, You Y, Yang J, Baek J, Cho E. Requirement of Smad4-mediated signaling in odontoblast differentiation and dentin matrix formation. Anatomy & cell biology 2016;49(3):199-205.

(145) Gao Y, Yang G, Weng T, Du J, Wang X, Zhou J, et al. Disruption of Smad4 in odontoblasts causes multiple keratocystic odontogenic tumors and tooth malformation in mice. Mol Cell Biol 2009;29(21):5941-5951.

(146) Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. Nature 2002;420(6916):629.

(147) Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nature reviews Molecular cell biology 2008;9(9):690.

(148) Biz M, Marques M, Crema V, Moriscot A, dos Santos M. GTPases RhoA and Rac1 are important for amelogenin and DSPP expression during differentiation of ameloblasts and odontoblasts. Cell Tissue Res 2010 Jun;340(3):459-470.

ANEXOS

Anexo 1 Aval del comité de ética

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD EL BOSQUE

MIEMBROS
NADIA YADIRA CASTAÑEDA G.
Lic. Biología y Química
MSc. cPhD.
Investigadora
Presidenta

MARÍA CRISTINA MEJÍA G.
Psicóloga
Representante de la Comunidad
Secretaria Ejecutiva

NOHORA JOYA RAMÍREZ
Psicóloga MS. cPhD.
Experta en Bioética

BORIS JULIÁN PINTO B.
Médico MSc.
Experto en Bioética

JAIRO ANDRÉS MARTÍNEZ J.
Médico MSc.
Farmacólogo

LILIANA OVIEDO ALBÁN
Psicóloga MSc.
Representante de la Comunidad

ABELARDO LEAL HERNÁNDEZ
Abogado Mc. cPhD.
Abogado

DIANA MARCELA BUITRAGO R.
Bacterióloga
PhD Ciencias Farmacéuticas
Experta en Metodología de la Investigación

LILIAN MARITZA NÚÑEZ F.
Bacterióloga
Especialista en Epidemiología General
Experta en Metodología de la Investigación.

Bogotá, D.C., 28 de Enero de 2015

Doctor
MIGUEL OTERO CADENA
Vicerrector de Investigaciones
UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Ciudad

Protocolo: "Efecto del ácido hipocloroso (HOCl) sobre la viabilidad y genes de auto-renovación y pluripotencia de células stem de la papila apical (SCAP)".

Investigador Principal: Paola Andrea Escobar V.

Respetado Doctor Otero:

Atentamente me permito informarle que el Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque, en la sesión ordinaria del 27 de Enero 2015, Acta No.001-2015, reviso y aprobó el protocolo en referencia ya que cumple con los requisitos éticos, se debe cambiar el nombre del presidente del Comité de Ética.

Atentamente,

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Comité Institucional de Ética en Investigaciones

Nadia Yadira Castaneda G.
NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCIA
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigaciones

Diana M.

PBX (57-1) 6 33 13 68 Ext. 520 Fax (57-1) 6489006
Calle 132 No. 7 A – 85 Casa X.5
comiteetica@unbosque.edu.co
Bogotá D.C., Colombia

Anexo 2: Consentimiento y Asentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARTE I

Dirigido a hombres y mujeres entre 15 y 21 años, atendidos en la Clínica Odontológica de la Universidad El Bosque, invitados a participar en la investigación "EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCL) SOBRE LA VIABILIDAD Y GENES DE AUTO-RENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS STEM DE LA PAPILA APICAL (SCAPS)"

Este consentimiento informado deberá ser firmado si usted está de acuerdo en participar en este estudio y usted recibirá una copia completa del documento.

Yo soy el Dr (a) _____ y trabajo como coinvestigador en este proyecto de investigación. Estamos haciendo una evaluación del efecto del ácido hipocloroso sobre las células stem de la papila apical de los dientes permanentes que no han aun terminado la formación de su raíz y sufren una infección.

Lo voy a invitar a participar en ésta investigación y le daré toda la información que usted desee. No tiene que decidir ahora y está en libertad de hablar con la persona que usted desee sobre esta investigación.

Si hay palabras que usted no entienda, puede decírmelo y nos tomaremos el tiempo necesario para poder explicar y aclarar esos términos, de igual manera si hay dudas, preguntas o inquietudes adicionales, puede preguntarme a mí o a cualquier otro miembro del equipo, quienes estaremos atentos a resolverlas de la mejor manera.

Propósito:

El objetivo de este estudio es evaluar en un laboratorio de investigación el efecto de una sustancia usada en la irrigación de los conductos cuando estos se infectan y aún no han terminado de formar su raíz que se llama ácido hipocloroso, la cual se va a poner en contacto con células stem que están en la porción del ápice que aún no ha cerrado y se denomina papila apical, las cuales intervienen en el proceso de formación de la raíz del diente.

Tipo de Intervención de Investigación

Esta investigación se realizará a partir de dientes (uno o varios) que le serán extraídos por una indicación como ortodoncia o cirugía de cordales y que no está relacionada con este estudio. Durante la extracción del diente se obtendrán células especiales (células stem) de una zona específica de ellos (papila apical) con el fin de evaluar el efecto del ácido hipocloroso sobre las mismas.

Selección de participantes

Para que pueda participar en este estudio y sus dientes puedan ser utilizados en esta evaluación, usted debe haber recibido por parte de su odontólogo una orden para realizar la extracción de uno o más de sus dientes permanentes con raíz incompletamente formada por razones ajenas a ésta investigación.

Si los dientes que a usted le sean extraídos presentan alguna alteración que no permita la obtención de células stem en el laboratorio de investigación, estos serán retirados del estudio de investigación.

Participación Voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba en esta clínica y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aún cuando haya aceptado antes.

Procedimientos y Protocolo

La(s) exodoncia(s) será(n) realizada(s) por un cirujano maxilofacial o un residente del postgrado de cirugía maxilofacial. Después de la exodoncia el tejido de la papila apical será depositada en una solución de transporte con antibióticos. El recipiente estará marcado con el documento de identidad del paciente/acudiente. Posteriormente, estas muestras serán llevadas al laboratorio de la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, donde se realizarán los estudios contemplados dentro del protocolo de este estudio.

Duración

La investigación durará 12 meses. Sin embargo, su participación en este estudio solo incluye el procedimiento de exodoncia inicial. Posterior a esto debe continuar el tratamiento y seguimiento que se requiera con su odontólogo tratante.

Riesgos

Según el artículo 11 de la resolución N° 008430 del 4 de octubre de 1993, artículo 11 del Ministerio de Salud de Colombia, ésta investigación no representa riesgo para usted debido a que el diente que le va a ser extraído será desechado y la papila apical de éste diente, en caso de desprenderse debe ser retirada para evitar quistes residuales.

Beneficios

El beneficio de este estudio será para la ciencia debido al mejoramiento del conocimiento sobre el efecto del ácido hipocloroso en los procedimientos de endodoncia regenerativa y no beneficios directos para usted.

Incentivos

Usted no recibirá dinero por participar en el estudio. Los costos de la extracción del diente, así como cualquier complicación que pudiera presentarse durante la misma, hacen parte del tratamiento odontológico al cual usted está accediendo.

Confidencialidad

La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial cumpliendo con la protección de los datos personales (Ley de habeas data del 2012). La información acerca de usted, obtenida durante la investigación, nadie sino los investigadores tendrán acceso a ella. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información encerrada en cabina con llave. No será compartida ni entregada a nadie con la excepción de que la ley lo requiera.

Compartiendo los resultados

No se compartirá información confidencial. El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá y se publicará para que otras personas interesadas en el tema puedan aprender de los resultados obtenidos.

De la utilización de las muestras para otros estudios

Una vez terminado este proyecto de investigación, las células obtenidas serán guardadas en un banco de tejidos y podrán ser estudiadas en futuros estudios.

Derecho a negarse o retirarse

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y el negarse a participar no le afectará en ninguna forma su tratamiento en esta Clínica. Usted siempre tendrá todos los beneficios que de otra forma tendría en esta Institución. Usted puede retirarse de la investigación en cualquier momento que desee sin perder sus derechos como paciente. Su tratamiento en esta Clínica no será afectado en ninguna forma.

Alternativas a la Participación

Si usted no desea tomar parte en la investigación, se le proporcionará el tratamiento estándar en uso disponible en la Clínica Odontológica y centros asistenciales de la Universidad.

A Quién Contactar

Si tiene cualquier pregunta, puede hacerla ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Para cualquier información o inquietud, puede comunicarse en cualquier momento con:

- INFORMACION DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ETICA

  Mónica Riva Gutierrez, Presidenta Comité institucional de Ética en Investigaciones, 6489000 extensión 1520, comiteetica@unbosque.edu.co, calle 132 No. 7A – 85.

- INFORMACION DE CONTACTO DEL GRUPO DE INVESTIGACION

  Investigador Principal:
  Dra. Paola Escobar V, Odontóloga – Endodoncista. Estudiante de Maestría en Ciencias Odontológicas, Universidad el Bosque, Bogotá, D.C. Celular: 3155878707. pescobarv@unbosque.edu.co

PARTE II

Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación **"EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCL) SOBRE LA VIABILIDAD Y GENES DE AUTO-RENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS STEM DE LA PAPILA APICAL (SCAPS)".** He sido informado que ésta investigación no representa ningún riesgo para mí según la RESOLUCIÓN Nº008430 de 1993 del Ministerio de Salud, CAPITULO 1, artículo 11. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi tratamiento.

Nombre del Participante_____
Documento de Identidad _____
Firma del Participante_____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas según la RESOLUCIÓN Nº008430 de 1993 del Ministerio de Salud, ART Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo _____
Dirección _____ Teléfono _____
Cédula de Ciudadanía _____
Firma del testigo _____

Nombre del testigo _____
Dirección _____ Teléfono _____
Cédula de Ciudadanía _____
Firma del testigo _____

Nombre del Investigador_____
Cédula de Ciudadanía _____
Firma del Investigador _____

Fecha _____Día/mes/año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado.

FORMULARIO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Parte I: Información acerca de la Investigación

- TÍTULO: "Efecto del ácido hipocloroso (HOCl) sobre la viabilidad y genes de auto-renovación y pluripotencia de células stem de papila apical (SCAPs)"

  - NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

  Paola Andrea Escobar V.

  - INTRODUCCIÓN

Mi nombre es Paola Andrea Escobar y mi trabajo consiste en evaluar unas células que vamos a obtener de tu(s) diente(s) para mejorar los procesos requeridos para llevar a cabo la inducción de la formación de los dientes afectados en los que el desarrollo de su raíz se ha interrumpido. Además, le haremos unas preguntas a tus padres/acudientes que nos ayudarán a conocer tu estado de salud. Te voy a dar información y te invito a tomar parte de este estudio. Puedes elegir si participas o no. Hemos conversado sobre este proyecto con tus padres/acudientes, ellos saben que te estamos preguntando si quieres participar. Debes saber que, aunque tus padres/acudientes acepten que participes en este estudio, tú puedes decir que no y respetaremos tu decisión. Puedes hablar de todo lo que está escrito aquí con tus padres, amigos o, cualquier otra persona con la que te sientas cómodo; después puedes decidir si participas o no. No tienes que decidirlo inmediatamente. Me puedes decir si no entiendes alguna palabra o si quieres que te explique mejor algo que no entiendas. Por favor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré el tiempo necesario para responder lo que me preguntes.

- ¿POR QUÉ SE ESTÁ HACIENDO ESTE ESTUDIO?

Porque queremos determinar en ésta investigación el posible beneficio que se obtendría al utilizar la sustancia que se va a evaluar sobre las células obtenidas de tu(s) diente(s).

- ¿POR QUÉ ME PIDES QUE PARTICIPE?

Porque el diente que deben sacarte tiene células que pueden ser utilizadas para éste estudio.

- ¿TENGO QUE PARTICIPAR?

No tienes que participar en este estudio si no lo deseas. Es tu decisión hacerlo. Si ahora dices que "sí" y después ya no quieres, también podrás retirarte sin ningún inconveniente.

He preguntado al menor y entiende que su participación es voluntaria _____

- PROCEDIMIENTOS ¿QUÉ ME VA A SUCEDER?

Si decides que quieres participar, dos cosas van a hacerse:

1. Te van a extraer o sacar el diente que tu odontólogo ha recomendado
2. Se le harán los estudios necesarios al diente que te extraen o sacan

He preguntado al niño/a y entiende los procedimientos _____

- RIESGOS: ¿ES ESTO MALO O PELIGROSO PARA MÍ?

Los procedimientos de este estudio no te van a hacer daño.

- MOLESTIAS: ¿DOLERÁ?

Los procedimientos que se requieren hacer para este estudio no te dolerán.

He preguntado al niño/a y entiende los riesgos y molestias _____

- BENEFICIOS: ¿ME OCURRIRÁ ALGO BUENO?

No tendrás un beneficio directo. Esta investigación servirá para mejorar los conocimientos que ayudan a inducir la formación de los dientes.

He preguntado al niño/a y entiende los beneficios _____

- INCENTIVOS: ¿OBTENGO ALGO POR PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN?

No se le pagará a tus padres o a ti por participar en el estudio.

- CONFIDENCIALIDAD: ¿VAN A SABER TODOS ACERCA DE ESTO?

No diremos a otras personas que estás participando en este estudio, tampoco diremos lo que tienen tus dientes o lo que tú y tus padres nos cuenten. Tu nombre y todo lo que sepamos de ti se guardará y pondremos un número en vez de tu nombre que solo los investigadores podrán conocer.

- A QUIEN CONTACTAR: ¿CON QUIÉN PUEDO HABLAR PARA HACER PREGUNTAS?

Puedes hacerme preguntas ahora o más tarde. Si necesitas resolver alguna duda tú y tus padres/acudientes podrán llamar a los teléfonos que están en la última hoja. Si quieres hablar con alguien más que conozcas, como tu profesor, tu médico o, un familiar, puedes hacerlo también.

- INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

  Mónica Riva Gutiérrez, Presidenta Comité Institucional de Ética en Investigaciones, 648 9000 extensión 1520, comiteetica@unbosque.edu.co, Calle 132 No.7A-85.

- INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

  Investigador principal:

  Paola Andrea Escobar Villegas Odontóloga, Endodoncista. Estudiante de Maestría en Ciencias Odontológicas, Universidad el Bosque, Bogotá, D.C. pescobarv@unbosque.edu.co

  Teléfono: 315 5878707 – (2) 5556190.

Si elegiste ser parte de este estudio, también te daré una copia de esta información. Puedes pedir a tus padres que lo examinen si quieres.

Parte II: Formulario de asentimiento

Entiendo que el estudio se trata de analizar con unas pruebas en el laboratorio unas células que van a obtener de el/los diente/s que me tienen que extraer por indicación de mi odontólogo.

"Sé que puedo elegir participar en el estudio o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. Mi padre/acudiente, el doctor que me va a atender o yo leímos lo que dice aquí sobre lo que me van a hacer y ya lo entiendo. Me explicaron lo que no entendía y respondieron mis preguntas. "Sé que puedo hacer más tarde si las tengo. Entiendo que si se hace algún cambio me lo dirán y yo podré decir que no quiero"

"Acepto participar en la investigación" ☐ **_____ (iniciales del menor de edad)**

"No deseo participar en la investigación y no he firmado el asentimiento" ☐ **_____ (iniciales del menor de edad)**

Si el menor asiente:

Nombre del menor: _____ Firma del menor: _____

Fecha: _____

Si es analfabeto:

Una persona **(**diferente a los padres) que sepa leer y escribir debe firmar (si es posible, esta persona debería ser seleccionada por el participante y no debería tener conexión con el equipo de investigación). Los niños analfabetas deben incluir su huella dactilar también.

"He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que ha dado su asentimiento libremente".

Nombre del testigo _____ Firma del testigo _____

Fecha _____

Huella dactilar del niño/menor ☐

El Padre/stem/apoderado ha firmado un consentimiento informado __Si __No (iniciales del investigador/asistente) _____

Anexo 3: Mapa de distribución del RT2 Profiler PCR Array

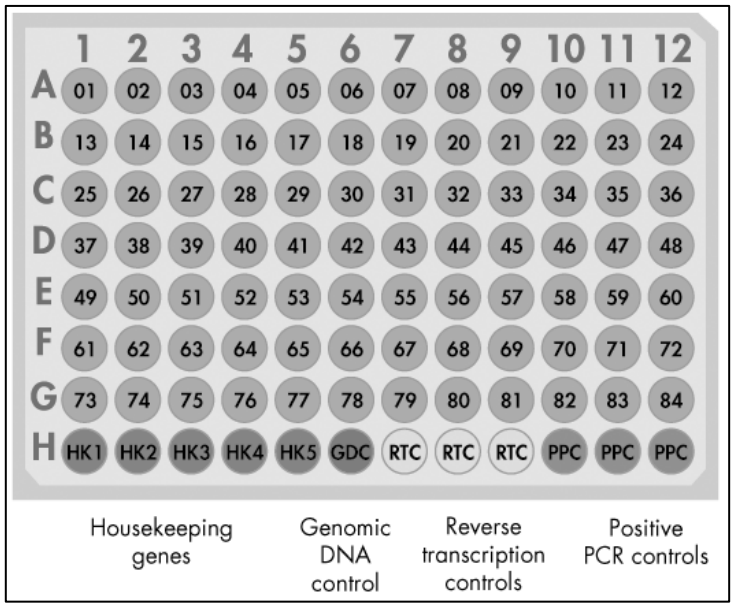


Imagen tomada de: RT^2 Profiler PCR Array Handbook. 2014. p16