



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD CELULAR CON
APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA**

**PRESENTADA POR
ESTRELLA MARCELA LOPEZ ALVAREZ**

**ASESORA
ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER EN
ODONTOLOGÍA**

LIMA – PERÚ

2019



CC BY-NC-ND

Reconocimiento – No comercial – Sin obra derivada

La autora sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTIN DE PORRES

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
TITULADO:**

**MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD CELULAR
CON APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
BACHILLER EN ODONTOLOGÍA**

**AUTOR: ESTRELLA MARCELA LOPEZ ALVAREZ
ASESOR: DRA. C.D. ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO**

LIMA – PERÚ

2019

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CONTENIDO TEMÁTICO	3
CAPITULO I: VIABILIDAD CELULAR	3
1.1 Definición	3
1.2 Métodos para la determinación de la viabilidad	3
1.2.1 Evaluación de la integridad de la membrana celular	4
1.2.2 Ensayos funcionales	7
1.2.3 Biosensores de fluorescencia	9
1.2.4 Estudios de morfología celular	9
1.2.5 Microanálisis por energía dispersa de rayos x	10
1.2.6 Expresión génica	11
CAPITULO II: MÉTODOS APLICADOS EN ODONTOLÓGIA	12
2.1 La viabilidad celular en la pulpa dental	12
2.2 La viabilidad celular del ligamento periodontal	12
2.3 La viabilidad celular en el uso de materiales dentales	12
CONCLUSIONES	14
RECOMENDACIONES	15
FUENTES DE INFORMACIÓN	16
ANEXOS	20

INTRODUCCIÓN

Viabilidad celular es la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular. La viabilidad celular es un marcador predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos. Dicho de otra forma, no se podrá garantizar la funcionalidad de un tejido si previamente no se garantiza la viabilidad de las células empleadas para tal fin¹.

La viabilidad celular sirve como control de calidad para descubrir aquellos subcultivos que presenten una mayor funcionalidad adecuada para su uso en terapia regenerativa e ingeniería tisular. Por otro lado las investigaciones en odontología en base a la viabilidad de las células madre de la pulpa humana (DPSC) han sido mínimas en la actualidad y con relación al ligamento periodontal es de crucial importancia el tiempo fuera de la cavidad oral. Por ello se usan diferentes métodos para determinar la viabilidad de las células, pero muchos de estos métodos no son conocidos, usados a criterio o mejorados por el investigador²⁻⁵.

Frente a esta situación se formula la siguiente pregunta: ¿Qué métodos son los utilizados para evaluar la viabilidad celular y sus aplicaciones en odontología?

El objetivo general es:

Determinar los métodos utilizados para evaluar la viabilidad celular y sus aplicaciones en odontología.

Para esto se trabajarán los siguientes objetivos específicos:

Determinar los métodos más usados para evaluar la viabilidad celular.

Determinar los métodos de viabilidad celular adecuados para su aplicación en odontología.

La importancia de este trabajo monográfico permite reconocer los métodos adecuados que garantizan el mantenimiento y proliferación celular, es decir su viabilidad celular. Permitiendo su aplicación en el desarrollo de investigaciones a nivel odontológico¹.

El capítulo I, se define la viabilidad celular, y se desarrolla seis métodos de determinación indicando definición, procedimiento y limitaciones. En el capítulo II, se describe los métodos para determinar la viabilidad celular en tejidos dentales, como son la pulpa, el ligamento periodontal y su uso en materiales dentales.

CONTENIDO TEMÁTICO

CAPITULO I: VIABILIDAD CELULAR

1.1 DEFINICIÓN:

Viabilidad celular se define como el número de células vivas encontradas en una muestra y/o población³. La estimación de la viabilidad de una población celular sirve como una condición de control de calidad para instaurar el momento óptimo de utilización de dichas células, sobre todo en aquellas células potenciales para la utilización en Ingeniería Tisular². Con frecuencia los métodos utilizados para determinar la viabilidad celular son comunes para la detección de la proliferación celular⁴.

1.2 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD:

Los diferentes métodos se basan en diversas funciones celulares; estos se clasifican en diferentes categorías como son:

1.2.1 Evaluación de la integridad de la membrana celular, a través de:

- Métodos de sustancias colorantes o fluorescentes.
- Métodos de tinciones catiónicas.
- Métodos basados en la liberación de sustancias al medio extracelular.

1.2.2 Ensayos funcionales son:

- Cuantificación de los niveles de adenosín trifosfato (ATP), a través de la prueba 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difenil-2h-tetrazolio (MTT).
- Síntesis del nuevo ADN.
- Detección de proteínas (relacionadas con la proliferación celular).

1.2.3 Métodos biosensores de fluorescencia (marcadores de proteínas).

1.2.4 Métodos según morfología celular.

1.2.5 Métodos de microanálisis por energía dispersiva de rayos X.

1.2.6 Métodos de determinación de la expresión génica (microarrays)^{1, 4}.

1.2.1 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular realiza innumerables reacciones químicas e interacciones moleculares, al estar en un proceso de muerte celular, esta integridad celular se altera y se modifica sus funciones.

Los métodos para la evaluación de la integridad de la membrana celular son:

- 1.2.1.1 Métodos basados en sustancias colorantes o fluorescentes (ensayos de exclusión con el azul de tripán e inclusión con yoduro de propidio mediante técnicas de microscopía, citometría de flujo o ELISA)
- 1.2.1.2 Métodos basados en la liberación de sustancias al medio extracelular (enzimas citosólicas como LDH, lactato deshidrogenasa y elevado de ADN).
- 1.2.1.3 Métodos basados en tinciones catiónicas (éster de rodamina mediante microfluorimetría)^{1, 6}.

1.2.1.1 MÉTODOS BASADOS EN SUSTANCIAS COLORANTES O FLUORESCENTES:

- Ensayos de Exclusión, Azul de Tripán.

El azul de tripán es un colorante vital que deja las células no viables con un color azul al ser observadas bajo un microscopio o una cámara Neubauer, mientras que las células viables aparecen sin teñir, blancas o con un halo azul. Las células viables tienen membranas celulares intactas, estas son selectivas a los compuestos que dejan pasar y por ende, no permiten el ingreso de tinciones en la célula siendo no absorbido el azul de tripán por estas⁷.

Para determinar el número de células viables con el azul de tripán podemos utilizar cualquiera de los dos métodos que nos brinda; método manual de preparación de la muestra y el método automatizado (con programas de análisis Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer, Vi-CELL™ XR Quad Pak Reagent Kit y Vi-CELL™ Sample Vials^{7, 8}).

Procedimiento convencional o manual.

Se realiza una mezcla con suspensión de células que sea equivalente 1:1 a la solución de azul de tripán 0.4%, se deja reposar de 2–5 minutos, se toma 10–15 microlitros (μl) de la solución y se lleva al hemocitómetro previa limpieza de este instrumento con etanol al 70%, dejar reposar de 1-2 minutos, luego examinar con un microscopio de luz invertida. El hemocitómetro (cámara Neubauer) está delineado por líneas de cuadrícula que identifican las zonas de la cámara, con cuatro zonas que están divididas por 16 cuadrados pequeños (figura 1). Se realiza el recuento del número de células viables (sin teñir) y no viables (teñidas), en cada una de las 4 zonas A, B, C, D (figura 2) ⁷⁻⁹.

Siendo el:

$$\text{N}^\circ \text{ células} = ((A+B+C+D)/4) \times 10^4 \times 2 \times \text{dilución de la muestra}$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \text{N}^\circ \text{ de células viables} / \text{N}^\circ \text{ total de células}$$

Este ensayo es el más usado entre las investigaciones para determinar la viabilidad celular, por ser un ensayo sencillo, económico y efectivo. Sin embargo, este no distingue entre células apoptóticas y células necróticas, un requerimiento indispensable para saber si el porcentaje de viabilidad encontrado es óptimo o real para ser usado en futuras construcciones de tejidos y órganos. Es decir, solo distingue a las células no viables cuando la membrana celular es irreparable, pero no determina el estado vital de las células viables, por ende, no garantiza una buena tasa de supervivencia⁴⁻⁹.

➤ Ensayos de Inclusión, Ioduro de Propidio.

La tinción celular con Ioduro de Propidio (IP) permite evaluar la viabilidad mediante la apreciación de la integridad de la membrana plasmática y nuclear, siendo evaluada la etapa final de la muerte celular.

La viabilidad con citometría de flujo cuantitativa se determina en un ciclo de criopreservación (protocolo más eficiente para la recuperación de células viables post-almacenamiento). Se emplea el marcador IP mezclando con 2 μl de suspensión celular

de IP antes de la adquisición de datos. La célula teñida por IP indica alteración de la integridad de la membrana plasmática. La marcación en color verde corresponde a las células necróticas, y en color rojo a las células vivas. La citometría mostrará poblaciones celulares vivas (IP-negativas) y necróticas (IP-positivas); calculamos la tasa de viabilidad¹⁰.

Siendo el:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Viabilidad postcriopreservación} \times 100}{\text{viabilidad precriopreservación}}$$

1.2.1.2 MÉTODOS BASADOS EN LA LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS AL MEDIO EXTRACELULAR: LDH

El lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que cataliza las interconversiones concomitantes de piruvato a L - lactato y NADH a NAD⁺ durante la glicólisis, y las reacciones inversas durante el ciclo de Cori. En respuesta al daño celular, inducida por mecanismos celulares endógenos o como resultado de mecanismos de forma exógena. La LDH se libera desde el citoplasma al medio ambiente extracelular. La actividad de LDH se determina mediante la utilización de una reacción enzimática acoplada donde LDH oxida a lactato piruvato, que reacciona con cloruro de yodonitrotetrazolio (INT) para formar formazán. La suposición subyacente para este ensayo es que cualquier aumento en la cantidad de formazán producidos en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con la viabilidad celular.

La cuantificación de la enzima LDH es un ensayo que proporciona una visión rápida, robusta y reproducible de la toxicidad de los fármacos en los compuestos experimentales. Su estabilidad en medios de cultivo celular determina la presencia de daño y la toxicidad en tejidos y células de manera segura¹¹.

1.2.2 ENSAYOS FUNCIONALES

Los métodos para estimar el número de células viables en el cultivo se basan generalmente en la medición de un indicador de la actividad metabólica como:

- 1.2.2.1 Método mediante la cuantificación de ATP
- 1.2.2.2 Método mediante la síntesis del nuevo ADN
- 1.2.2.3 Método mediante la síntesis de proteínas^{1, 12}.

1.2.2.1 MÉTODO MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE ATP: ENSAYO MTT

El proceso de los resultados de la muerte celular es la pérdida de la capacidad para sintetizar ATP nuevo¹².

Convertido en el estándar de oro, la prueba MTT es un ensayo de bromuro ampliamente usado por su correlación directa de funcionalidad mitocondrial y supervivencia celular que presenta mayor sensibilidad comparada con otras pruebas que evalúan citotoxicidad^{13, 14}. El ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difenil-2H-bromuro tetrazolio), basado en tetrazolio es la conversión enzimática del colorante (color amarillo) a cristales de formazán (color morado) insolubles en agua, principalmente por deshidrogenasas succínicas mitocondriales que se produce en numerosos organelos incluyendo la mitocondria y el retículo endoplásmico de las células (figura 3 y figura 4). También pueden estar implicadas enzimas citosólicas como la nicotimida adenina dinucleótido (NADH) reductasa y flavina oxidasa. La tasa de la conversión de formazán se ha demostrado estar en relación directa con el número de células vivas¹.

Procedimiento.

Las células se colocan en placas de 96 pocillos estériles (50 – 10000 células / pocillo) en un medio estándar. Para la reproductibilidad, la incubación se realiza a 37°C con 5% de CO₂ después de 24 h o 48 h; se agrega 20 microlitros de una solución MTT, 5 mg/ml a cada pocillo y la placa se incuba a 4 horas adicionales, el medio se aspira o elimina y los pocillos se lavan con PBS (solución tamponada con fosfato), el colorante convertido se solubiliza con etanol al 100% (figura 5). La absorbancia del colorante convertido se mide

a una longitud de onda de 570 nanómetro (nm) con sustracción de fondo a 630–690 nm^{14, 15}.

El ensayo MTT es el patrón de oro de los ensayos de citotoxicidad y recuento de la proliferación celular por ser un ensayo colorimétrico rápido, fácil de efectuar y de resultados consistentes. Sin embargo, los nuevos estudios han demostrado este ensayo como poco fiable por tener muchas interferencias que afectan los resultados, es decir los resultados pueden sufrir alteraciones ya sea por la estructura celular y sus diferentes sustancias que pueden hacer interacciones con el tetrazolio^{14, 16}.

1.2.2.2 MÉTODO MEDIANTE LA SÍNTESIS DEL NUEVO ADN

Basado en la incorporación de timidina (marcada radiactivamente con tritio (3H)) en el medio de cultivo para que se introduzca en el ADN durante la replicación de este. Siendo cuantificada por la obtención de radioactividad^{1, 17}.

Procedimiento de timidina tritiada (H³)

Se adiciona metil-timidina H³ en PBS 18 h antes de la cosecha de las células, se cuenta la incorporación de la timidina H³ después de la adición del líquido de centelleo (PPO-tolueno, 0.4%) a cada muestra. Los especímenes se examinan en un contador de centelleo¹⁶.

Este procedimiento brinda los resultados de la concentración celular viable después de varios pasos realizados, llevando al investigador más horas de trabajo, por ende, este método ha sido sustituido por el ensayo MTT^{15, 16}.

1.2.2.3 MÉTODO MEDIANTE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La actividad de la proteasa se encuentra predominantemente en células viables intactas y se miden usando marcadores de un sustrato péptido permeable de células fluorogénicas (glicil-fenilafanil-aminonofluorocoumarin; GF-AFC). Este sustrato impregna las células intactas donde se divide para generar una señal fluorescente proporcional al número de células vivas. Tras la muerte celular, la proteasa que cercena el sustrato GF-

AFC se vuelve inactiva. Una segunda proteasa activada se libera en el medio de las células muertas que han perdido integridad de membrana, esta se mide usando un sustrato péptido fluorogénico no permeable (bis-alanylalanyl-phenylalanylrhodamine110; bis-AAF-R110). Debido a que el sustrato no puede entrar en las células viables, la señal de este sustrato es para células muertas¹².

1.2.3 BIOSENSORES DE FLUORESCENCIA

Los biosensores de proteínas fluorescentes (proteínas marcadas) ayudan a medir la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones, en células individuales destinadas a identificar compuestos que se dirigen selectivamente en la función enzimática o la conformación de la célula, para explorar muestras de vida funcionales. Las proteínas son muy adecuadas para actuar como sensores intracelulares, sensibles y específicos de los cambios químicos y moleculares en las células vivas, debido a que sus actividades se creen que miden todas las reacciones químicas en las células.

La actividad de las proteínas se expresa a través de su interacción con diversos ligando, a partir de iones y metabolitos a las macromoléculas y organelos. Para inducir la actividad, algunas proteínas requieren una interacción con iones metálicos o metabolitos. Los biosensores de proteínas fluorescentes (figura 6) informan la modulación de la actividad catalítica en las células vivas, por lo tanto, la actividad de una enzima en una célula viva puede ser mapeada usando sustratos fluorescentes y para cuantificar los cambios conformacionales de la misma enzima resultante de la interacción^{18, 19}.

1.2.4 ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA CELULAR

Cada tipo de célula deberá mostrar ciertas cualidades, en algunas ocasiones el proceso de apoptosis (muerte celular) condiciona que el tamaño de las células se vea modificado como grandes o crecientes y pequeñas o decrecientes, además de deformaciones que conjuntamente con otros métodos se observan mejores resultados²⁰.

La morfología de las células se monitoriza utilizando un microscopio de luz y fotomicrografías del aspecto celular en la ampliación de 200x comúnmente²¹.

1.2.5 MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSA DE RAYOS X

Se basa en el conteo del contenido de iones, especialmente potasio (K), sodio (Na) o cloro (Cl). Los cambios iónicos que ocurren en los cultivos celulares pueden ser marcadores tempranos de la muerte celular y son encontrados en las células antes que se manifiesten los cambios morfológicos. Las concentraciones intracelulares de estos iones se correlacionan bien con el estado vital de las células siendo un excelente marcador de la fisiología celular y la viabilidad celular. Este sistema es útil en la identificación de células vivas, pero que están predispuestas a morir en un periodo corto⁶.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos x (EPXMA), es una técnica altamente sensible que nos ayuda a monitorizar la viabilidad celular brindándonos perfiles iónicos. Como por ejemplo cuando la concentración intracelular de potasio y cloro esta disminuida y el sodio estable estamos ante un perfil iónico típico de una población celular en estado pre-apoptótico^{2, 22}.

Procedimiento.

Para EPXMA, las células se colocan con tripsina-EDTA sobre rejillas cubiertas con fina capa de butiral de polivinilo, luego se siembran las células a una densidad de 5000 células por rejilla y se cultiva en un medio. Después de 24 horas, se lava en agua destilada a 4°C por 5 segundos para desechar el medio extracelular, después del lavado el exceso de agua se drena a la superficie y se sumerge en nitrógeno líquido; luego de la criofijación se colocan en portamuestras de aluminio previamente enfriadas a -196°C con nitrógeno líquido y se secan a temperatura decreciente por 24 horas en un liofilizador (permiten la eliminación del agua de productos o disoluciones), se reviste con carbono en un sistema de recubrimiento de alto vacío y microanálisis durante 6 horas. Se realiza el sondeo de electrones con un microscopio de barrido ambiental, equipado con un sistema de microanálisis y un detector de electrones retrodispersados en estado sólido (figura 7). Como constantes se utiliza 10 Kv, aumentos 1000, ángulo de superficie 0°, cuentas por segundo (CPS) registradas por el detector 500, tiempo de acumulación de cuentas 200s, tamaño del haz de electrones de 5, distancia de trabajo de 10 mm^{6, 22, 23}.

La microscopía analítica por dispersión de rayos X, es un procedimiento bien establecido para evaluar la viabilidad y el estado fisiológico de las células cultivadas, especialmente cuando están destinadas para los propósitos clínicos o la construcción de equivalentes de tejidos por ingeniería tisular. Es un método altamente sensible para la determinación de la viabilidad celular, al tener correlación entre los cambios morfológicos durante la muerte celular y los niveles intracelulares de diferentes componentes iónicos en las células vivas, apoptóticas y necróticas, es decir, trabaja como un excelente marcador de la funcionalidad y la viabilidad celular^{6, 22, 23}.

1.2.6 EXPRESIÓN GÉNICA

El microarray es un método que permite la evaluación de una variedad de genes o un genoma completo. Estructurado por sondas que se organizan en filas y columnas en una superficie de deslizamiento sólida en un patrón altamente reproducible, para permitir una identificación fácil y precisa. Detecta eventos de reconocimiento por fluorescencia o por una señal electroquímica. El microarray podría identificar genes relacionados con la muerte celular, un método importante para la obtención de la viabilidad celular. El método común es el microarrays de expresión génica, basada en la detección de ARN mensajero presente en muestras biológicas y genes de respuesta a la apoptosis / estrés (HIF-1-alfa, Glut 1, CA IX, caspasa, hsp70, XIAP); y se investigan por medio de inmunohistoquímica^{1, 24, 25}.

CAPITULO II: MÉTODOS APLICADOS EN ODONTOLÓGIA

2.1 LA VIABILIDAD CELULAR EN LA PULPA DENTAL

La aplicación de los métodos para determinar la viabilidad celular de la pulpa dental tiene como objetivo encontrar el procedimiento adecuado que brinde el porcentaje de viabilidad celular seguro, confiable y reproducible para su futuro uso en ingeniería tisular y medicina regenerativa. Por ejemplo, el uso de métodos como el MTT y la evaluación morfológica de las células madre de la pulpa dental como estrategia prometedora de uso en reconstrucciones óseas orofaciales y el uso del método de tinción con azul de tripano para controlar procesos celulares de la curación y la angiogénesis durante la reparación del tejido inflamado^{26, 27}.

2.2 LA VIABILIDAD CELULAR DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

La aplicación del método de exclusión de azul de tripan se ha utilizado para evaluar el potencial de la leche, el agua de coco y la mantequilla en el mantenimiento de la viabilidad de las células del ligamento periodontal para la reimplantación inmediata del diente⁵.

2.3 LA VIABILIDAD CELULAR EN EL USO DE MATERIALES DENTALES

En la actualidad la venta de nuevos productos de materiales dentales nos obliga a determinar cuál brinda mejores beneficios al paciente, por ende, es importante saber qué consecuencias tendrán estos materiales en las células cercanas o en contacto directo con ellas. El ensayo de MTT y el método de la doble tinción de las células con anexina - V y 7-AAD evaluaron la tasa de proliferación de células madre del ligamento periodontal que crecen en la presencia de los diferentes selladores de endodoncia²⁸.

Asimismo, el descubrimiento de fármacos se basa en gran medida en los estudios de viabilidad celular para evaluar el potencial de toxicidad de los fármacos candidatos¹⁰. Con respecto a esto, el método de exclusión de azul de tripan y MTT evaluaron la viabilidad celular *in vitro* de fibroblastos de pulpa dentaria bajo contacto con HEMA

(sistema adhesivo, que al contacto directo con la pulpa puede tener un gran efecto citotóxico) ²⁹.

CONCLUSIONES

se determinó que algunos métodos se encuentran en desuso por la cantidad de pasos y su poca fiabilidad en comparación con los métodos comúnmente usados en la actualidad. Por ello su insuficiente uso nos lleva a escasa información sobre algunos métodos en cuestión. Por ejemplo, el ensayo basado en 3H-timidina ha sido sustituido por el ensayo MTT.

Los métodos más usados para evaluación de viabilidad celular en odontología son MTT, azul de tripán, por ser métodos sencillos, económicos y efectivos; sin embargo, no son precisos para identificar procesos de muerte celular por apoptosis o necrosis, solo identifican daños celulares irreversibles, siendo esto una de sus principales limitaciones.

El método adecuado es microanálisis por energía dispersa de rayos X porque tiene como ventaja identificar patrones iónicos que están en correlación con el estado funcional. Para garantizar que las células son completamente funcionales y que se van utilizar en la ingeniería de tejidos u otros estudios *in vivo*, se recomienda utilizar de dos a tres métodos en la misma investigación.

RECOMENDACIONES

Tener en cuenta que algunos métodos de uso común (azul de tripán y MTT) en la actualidad no necesariamente brindan datos específicos, por ello investigar con métodos que demuestren datos íntegros o el uso en conjunto de nuevos métodos con los habituales.

Incidir en la investigación sobre el método de microanálisis por energía dispersa de rayos X, puesto que es un método que en la actualidad se está usando como un método de control de calidad para determinar los datos de viabilidad celular; es decir, que se requiere mayor información sobre su uso, limitaciones, accesibilidad, credibilidad y reproductibilidad.

FUENTES DE INFORMACIÓN

- (1) Martín Piedra M. Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular [Tesis Doctoral]. Granada: Editorial de la Universidad de Granada, Universidad de Granada: 2014.
- (2) Martín M, Garzón I, Sánchez C, Alaminos M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. *Rev. Actual. Med.* 2012; 97 (786): 006-012.
- (3) Stoddart M. Mammalian Cell viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. En: Stoddart M. Cell Viability Assays: Introduction. Davos Platz: Suiza; 2011. p. 1-6.
- (4) Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17(14):1213-1221.
- (5) Kokkali VV, Bendgude V, Sharangpani G. Comparative evaluation of post-traumatic periodontal ligament cell viability using three storage media. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2017 Jun; 18(3):209-214.
- (6) Rodríguez-Morata A, Garzón I, Alaminos M, García-Honduvilla N, Sánchez-Quevedo MC, Bujan J, Campos A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 2008 May-Jun; 22(3):440- 8.
- (7) Stoddart M. Mammalian Cell viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. En: Siegel K. Cell viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. Davos Platz: Suiza; 2011. p. 7-12.
- (8) Hebling J, Bianchi L, Basso F, Scheffel D, Soares D, Carrilho M, Pashley D, Tjäderhane L, De Souza Costa CA. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dent Mater.* 2015 Apr; 31(4):399-405.
- (9) Ferreira D, Oliveira L, Rodrigues I, Bentes R, Barreto A. Culture of human dental pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Braz Oral Res.* 2018 Feb 1; 32:e003.

- (10) Pereira N, González E, Caviedes P. Cryopreservation of adipose derived stromal cells: viability using a defined free of animal protein medium. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2017 Dic; 43(4): 381-386.
- (11) Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Koulen P. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Curr Protoc Toxicol.* 2017 May 2; 72:2.26.1-2.26.10.
- (12) Stoddart M. Mammalian Cell viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. En: Riss T. Moravec R. Niles A. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. Davos Platz: Suiza; 2011. p. 103-114.
- (13) Zarria J, Osorio A, Pino J, Shiga B, Vivas D. Efecto De Las Nanopartículas Industriales TiO₂, SiO₂ y ZnO Sobre La Viabilidad Celular Y Expresión Génica En Médula ósea roja de Músculo. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública.* 2017; 34(3):436-444.
- (14) Van A, Joubert A, Cromarty A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 - diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8: 47.
- (15) Albiero M, Stipp R, Saito M, Casati M, Sallum E, Nociti F, Silvério K. Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With Porphyromonas gingivalis Protein Extract. *J Periodontol.* 2017 Nov; 88(11):188-199.
- (16) Bautista C, Acosta E, Toledo I. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados. *Vet Mex.* 2000; 31(2).
- (17) De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V, Baron J. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology.* 2001 Jan; 142(1):430-6.
- (18) Prével C, Kurzawa L, Van T, Morris M. Fluorescent biosensors for drug discovery new tools for old targets--screening for inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem.* 2014 Dec; 88:74-88.

- (19) Kenneth G, Penny L, Klaus H, Lansing T. Fluorescent protein biosensors: measurement of molecular dynamics in living cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995;24:405-34.
- (20) Fleissig O, Reichenberg E, Tal M, Redlich M, Barkana I, Palmon A. Morphologic and gene expression analysis of periodontal ligament fibroblasts subjected to pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018 Nov; 154(5):664- 676.
- (21) Patntirapong S, Poolgesorn M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. *Oral Dis.* 2018 Oct; 24(7):1294-1302.
- (22) Alaminos M , Sánchez M, Muñoz J, García J, Crespo P, González M, Campos A . Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. 2007 Jun; 211 (3):692-8.
- (23) Campos F, Garzón I, Rodríguez I, Martín M. Evaluación de la viabilidad celular en constructos tisulares. *Actual. Med.* 2016; 101 (797): 13-17.
- (24) Jonczyk R, Kurth T, Lavrentieva A, Walter J, Scheper T, Stahl F. Living Cell Microarrays: An Overview of Concepts. *Microarrays (Basel).* 2016 May 26; 5(2).
- (25) Frohwitter G, Buerger H, Korsching E, van Diest PJ, Kleinheinz J, Fillies T. Site-specific gene expression patterns in oral cancer. *Head Face Med.* 2017 May 10; 13(1): 6.
- (26) Bindal P, Gnanasegaran N, Bindal U, Haque N, Ramasamy TS, Chai WL, Kasim NHA. Angiogenic effect of platelet-rich concentrates on dental pulp stem cells in inflamed microenvironment. *Clin Oral Investig.* 2019 Jan 28.
- (27) Bakopoulou A, Georgopoulou A, Grivas I, Bekiari C, Prymak O, Loza K, Epple M, Papadopoulos GC, Koidis P, Chatzinikolaidou M. Dental pulp stem cells in chitosan/gelatin scaffolds for enhanced orofacial bone regeneration. *Dent Mater.* 2019 Feb;35(2):310-327.
- (28) Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, Llena C, Rodríguez-Lozano FJ. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J.* 2017 Sep; 50(9):875-884.

- (29) Modena KCDS, Calvo AM, Sipert CR, Dionísio TJ, Navarro MFL, Atta MT, Santos CF. Dental Pulp Fibroblasts Response after Stimulation with HEMA and Adhesive System. Braz Dent J. 2018 Sep-Oct;29(5):419-426.

ANEXOS

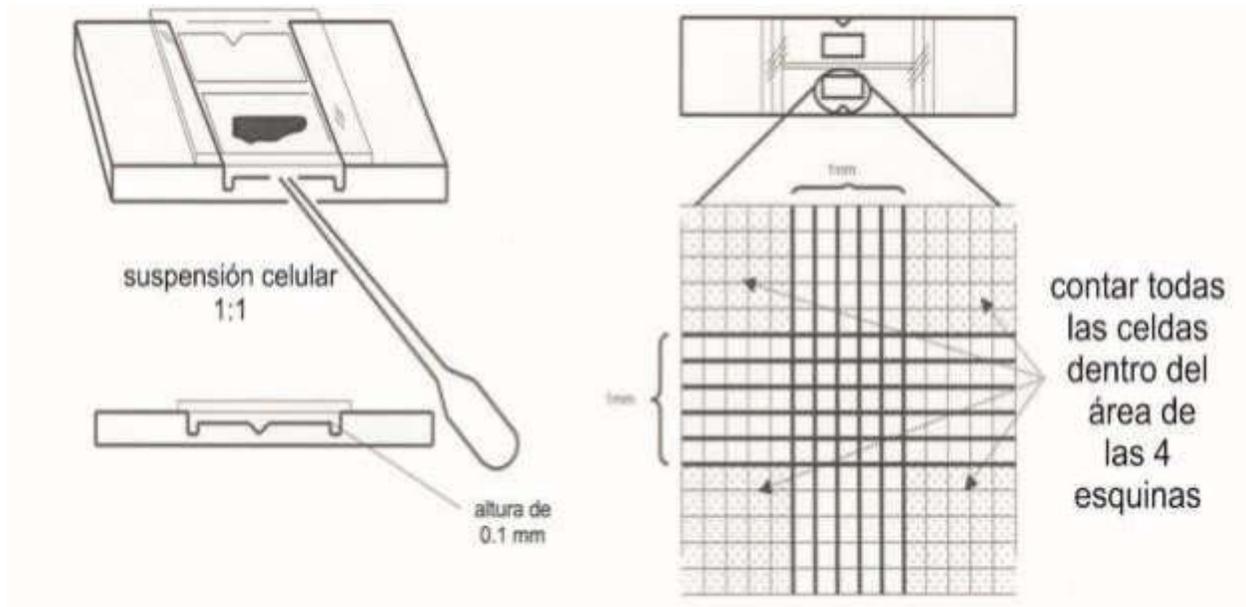


Figura 1. Pasos para la utilización de la cámara Neubauer (hemocitómetro).

Fuente: Focosi D. Cell Cultures. Lucca, Italy: Molecular Medicine; 2014

Disponible en: http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/cellculture.html [acceso 18 abril 2019]

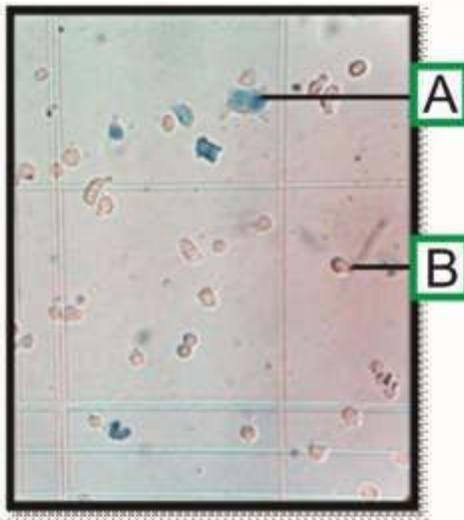


Figura 2. Determinación de viabilidad celular por la técnica de azul tripán.

A. Células teñidas (células no viables), B. células no teñidas (células viables)

Fuente: Carrera L, Pirajan I, Urrea M, Sanchez R, Gómez M, Monroy L. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEP-2: Perspectivas de estudios con Chlamydia trachomatis. Nova (en línea). 2015 Jan (acceso 18 abril 2019); 13(23): 17-29. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100002

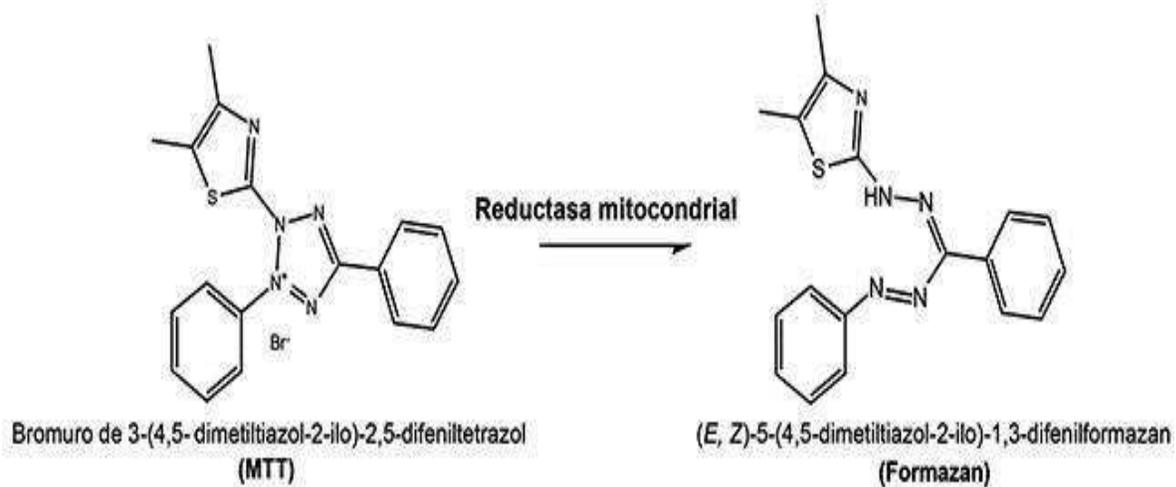


Figura 3. Reacción esquemática de la conversión de MTT a Formazán.

Fuente: Díaz E. Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización.

Una breve revisión. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología (en línea) 2018 Octubre

13 (acceso 17 de abril 2019); 12, (22). Disponible en:

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/nano/rt/printerFriendly/60758/59370>

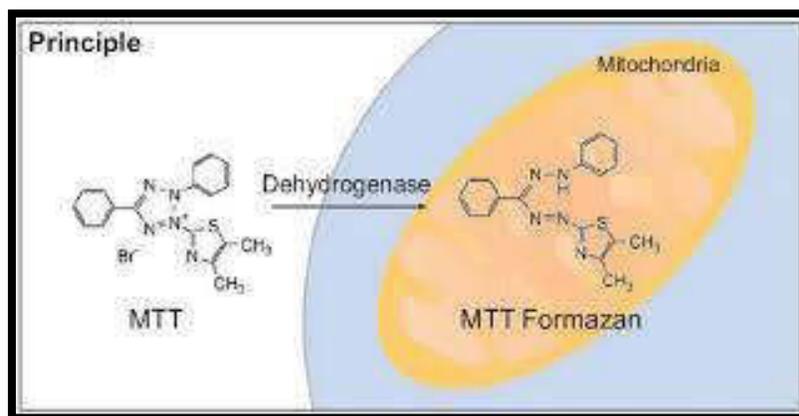


Figura 4. Conversión enzimática en la mitocondria de la célula.

Fuente: Oloruntobi T. Impact of vitamin C on genistein-induced cell death in prostate cancer (en línea)

2015 (17 de abril 2019). Disponible en: <https://sciforum.net/manuscripts/3024/slides.pdf>

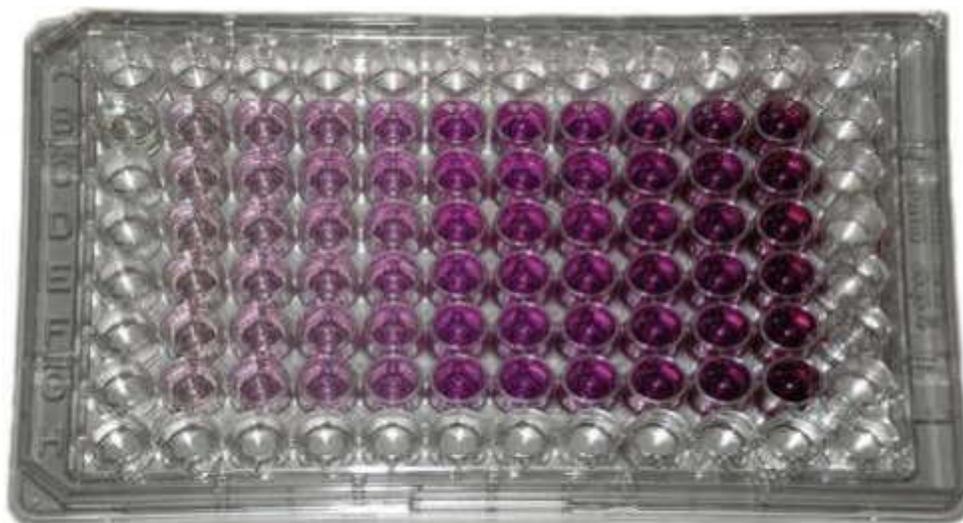


Figura 5. Microplaca observada después de un ensayo por el método de MTT.

El color púrpura intenso indica el incremento de cantidad celular.

Fuente: Díaz E. Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización.

Una breve revisión. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología (en línea) 2018 Octubre 13 (acceso 17 de abril 2019); 12, (22). Disponible en:

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/nano/rt/printerFriendly/60758/59370>

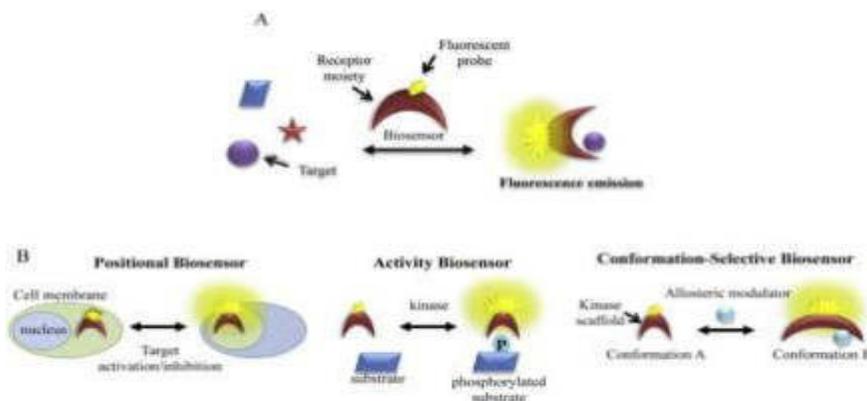


Figura 6. Biosensores fluorescentes

A. Representación gráfica de un biosensor fluorescente. B. Diferentes ejemplos de biosensores fluorescentes: (de izquierda a derecha) posición de biosensores, biosensores basados en la actividad, quinasa derivada de sensores de conformación selectiva.

Fuente: Prével C, Kurzawa L, Van T, Morris M. Fluorescent biosensors for drug discovery new tools for old targets--screening for inhibitors of cyclin-dependent kinases. Eur J Med Chem. 2014 Dec; 88:74-88.

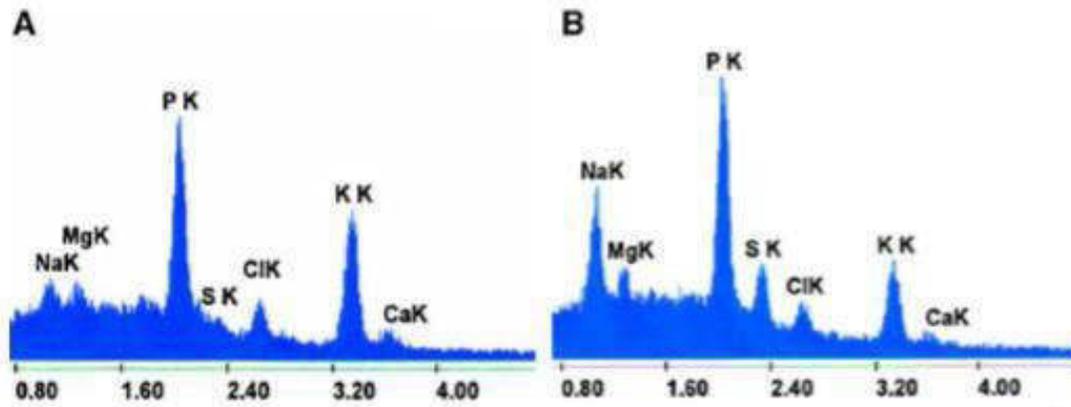


Figura 7. Ejemplos de espectros de microanálisis por dispersión de rayos x.

Fuente: Alaminos M , Sánchez M, Muñoz J, García J, Crespo P, González M, Campos A . Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis.

J Cell Physiol. 2007 Jun; 211 (3): 692-8.