



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**TESIS**

**EFFECTOS DE PRODUCTOS DE LA CORROSIÓN NÍQUEL-TITANIO (Ni-Ti)  
SOBRE CÉLULAS HUMANAS EN CULTIVO**

**PRESENTA**

**M.C.S. ALFREDO SALAZAR DE SANTIAGO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TUTORES:**

**Dra. en C. Alma Lilian Guerrero Barrera**

**Dr. en C. Francisco Javier Avelar González**

**INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL**

**Dr. en C. Edgar Eduardo Hernández Cuéllar**

**Aguascalientes, Ags., 21 de Septiembre del 2020.**

### AUTORIZACIONES



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

**PRESENTE**

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designados del estudiante **M. en C. S. Alfredo Salazar de Santiago con ID 232442** quien realizó la tesis titulada: **EFFECTOS DE PRODUCTOS DE LA CORROSIÓN NIQUEL-TITANIO (Ni-Ti) SOBRE CÉLULAS HUMANAS EN CULTIVO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado, en cuanto los artículos enviados a publicación a revistas indexadas JCR sean aceptados.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 11 de agosto de 2020.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Francisco Javier Avelar González  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Edgar Eduardo Hernández Cuellar  
Asesor de Tesis

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 03-sep-20

NOMBRE: ALFREDO SALAZAR DE SANTIAGO ID 232442

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): Toxicología y bioingeniería ambiental

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TITULO: EFECTOS DE PRODUCTOS DE LA CORROSIÓN NÍQUEL-TITANIO (Ni-Ti) SOBRE CÉLULAS HUMANAS EN CULTIVO

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

Se obtuvieron células madre a partir de terceros molares humanos con posibilidad de ser usadas para tratamiento de enfermedades metabólicas en el humano

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento:

Al **Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP)** de la Secretaría de Educación del Gobierno de México, por haberme otorgado la beca No. UAZ-399/511-6 /17-6885 para la realización de los estudios de Doctorado.

A la **Universidad Autónoma de Zacatecas y a sus autoridades**, por haberme brindado las condiciones académicas y administrativas para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Especialmente quiero agradecer a la **Dra. en C. Alma Lilian Guerrero Barrera**, por haber creído en mí como persona y como profesionista y que me brindó la oportunidad y confianza para integrarme a su equipo y trabajar a su lado y concluir el día de hoy con el presente trabajo. Gracias por su amistad, paciencia y ejemplo, sus enseñanzas y conocimientos forjaron en mí la posibilidad de observar la ciencia con un enfoque diferente.

Al **Dr. en C. Francisco Javier Avelar González**, quien además de cumplir con su responsabilidad como Rector de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se dio el tiempo para ser mi Tutor. Gracias por brindarme sus conocimientos. Aprendí con Usted que la ciencia requiere de darle su tiempo y sustento, ello trae consigo un cimiento más firme para la generación de nuevos conocimientos.

Al **Dr. en C. Edgar Eduardo Hernández Cuéllar**. Gracias por brindarme sus conocimientos, amistad y confianza durante mi estancia como estudiante de Doctorado.

Al **Dr. en C. Juan Manuel Díaz Villaseñor**, compañero de estudios, asesor y amigo. Gracias por el tiempo y asesorías que me permitieron alcanzar los resultados del presente trabajo.

A la **Biol. Adriana C. Moreno Flores** y a la **Ing. Fabiola Galindo Guerrero**. Gracias por su paciencia y enseñanzas.

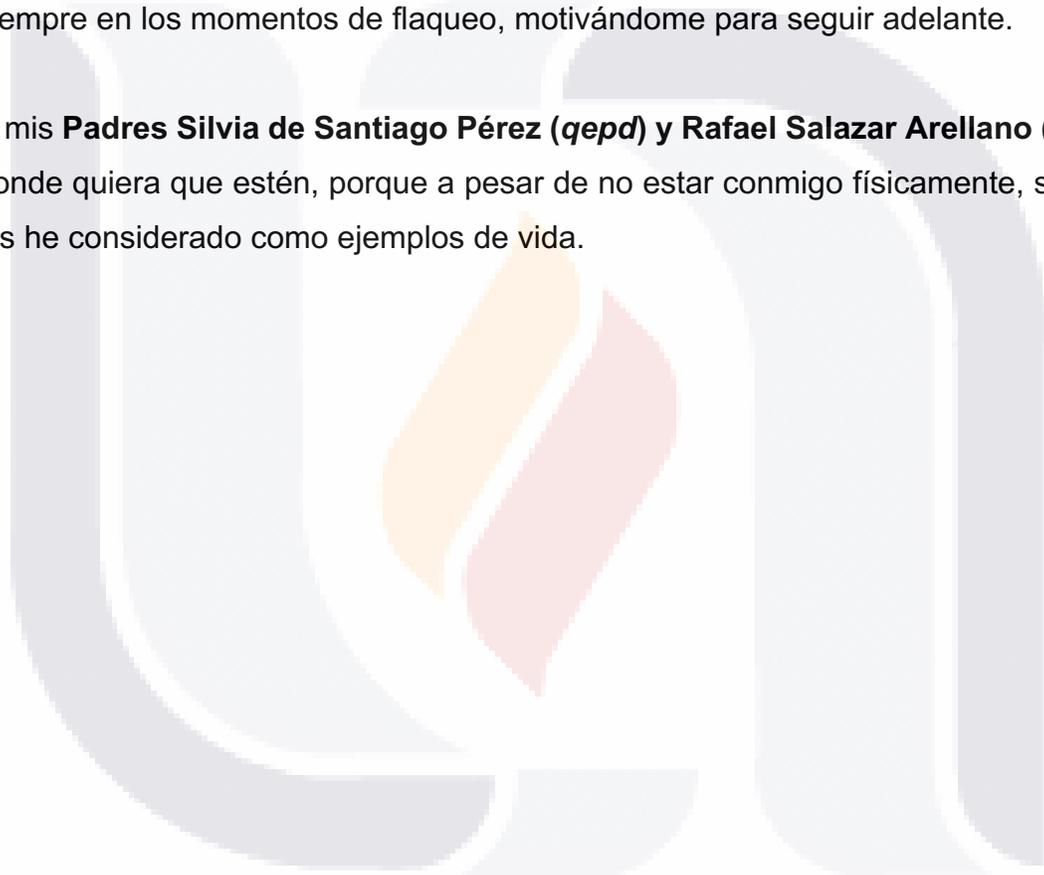
A todos los integrantes del equipo de **Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la UAA** por su compañerismo y solidaridad.

## DEDICATORIAS

Soy un hombre de Fe y doy gracias a **Dios** por haberme dado la oportunidad de creer y encomendarme a Él para alcanzar mis objetivos y metas.

Le dedico este trabajo a toda mi Familia, por ser quien son y representan el todo para mi. Gracias por acompañarme a lo largo del camino y por el apoyo hoy y siempre en los momentos de flaqueo, motivándome para seguir adelante.

A mis **Padres Silvia de Santiago Pérez (qepd) y Rafael Salazar Arellano (qepd)**, donde quiera que estén, porque a pesar de no estar conmigo físicamente, siempre los he considerado como ejemplos de vida.



**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	1
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	5
<b>ACRÓNIMOS</b>	10
<b>1. RESUMEN</b>	13
<b>2. ABSTRACT</b>	14
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	15
3.1 Biomateriales	15
3.2 El fenómeno de la corrosión y los biomateriales	16
3.2.1 El ataque uniforme	16
3.2.2 La corrosion por picaduras o grietas	16
3.2.3 La corrosion galvánica	17
3.2.4 Corrosión por fricción	17
3.2.5 Corrosión por estrés	17
3.2.6 Corrosión inoculada microbiológicamente	17
3.3 Pruebas de Biocompatibilidad	17
3.4 Biomateriales y su uso en odontología	18
3.5 Cultivos celulares para el estudio <i>in vitro</i> de los biomateriales	20
3.6 Las Células Madre: concepto y clasificación	20
3.7 Fuentes de obtención de MSCs	21
3.8 Células Mesenquimales derivadas de los tejidos dentales (DSCs)	22
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>5. HIPÓTESIS</b>	23
<b>6. OBJETIVOS</b>	24
6.1 Objetivo General	24
6.2 Objetivos Específicos	24

<b>7. METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
7.1 Diseño del estudio para la obtención de células mesenquimales de tejidos dentales humanos.	24
7.2 Establecimiento de los cultivos celulares primaries	25
7.3 Inmunofenotipificación de las células mesenquimales de pulpa dental, encía y cresta ósea alveolar	26
7.4 Ensayo de proliferación celular	27
7.5 Evaluación de la capacidad pluripotencial de diferenciacion de células mesenquimales obtenidas a partir de tejidos dentales humanos	27
7.5.1 Diferenciación osteoblástica	28
7.5.2 Diferenciación ameloblástica	29
7.6 Obtención de los productos de la corrosion de Níquel-Titanio (Ni-Ti) de biomaterials usados en el área de odontología	29
7.7 Evaluación del efecto del Cloruro de Níquel (NiCl <sub>2</sub> ) sobre células humanas en cultivo	31
7.7.1 Efecto citotóxico del NiCl <sub>2</sub> a través del ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)	31
7.7.2 Evaluación de cambios morfológicos en células mesenquimales de cresta ósea alveolar humana (HABMSCs) por exposición a NiCl <sub>2</sub>	32
7.8 Evaluación del efecto de los productos de la corrosion de Ni-Ti liberados de biomateriales usados en el área de odontología en un Modelo Animal (Rata Wistar)	33
7.9 Métodos estadísticos	33
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
8.1 Características de los pacientes donadores	34
8.2 Establecimiento de los cultivos celulares primarios	34
8.3 Inmunofenotipificación	35
8.4 Ensayo de proliferación celular	37

8.5 Evaluacion de la capacidad pluripotencial de diferenciación de las células mesenquimales obtendias a partir de tejidos dentales humanos	38
8.5.1 Diferenciación osteoblástica	38
8.5.2 Diferenciación ameloblástica	39
8.6 Obtención de los productos de la corrosion de Níquel-Titanio (Ni-Ti) de biomateriales usados en el área de odontología	42
8.6.1 Análisis de biomaterials por microscopía electrónica de barrido (MEB) y Espectrometría de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS-Rx)	42
8.7 Evaluación del efecto citotóxico del Cloruro de Níquel (NiCl <sub>2</sub> ) sobre células de cresta ósea alveolar medido por el ensayo de liberación de LDH	46
8.8 Evaluación de los cambios morfológicos en células mesenquimales de cresta ósea alveolar por exposición al NiCl <sub>2</sub>	47
8.9 Evaluación del efecto de los productos de la corrosion de Ni-Ti liberados de biomateriales usados en el área de odontología en Modelo Animal (Rata Wistar)	51
<b>9. DISCUSIÓN</b>	52
<b>10. CONCLUSIONES</b>	56
<b>11. REFERENCIAS</b>	58
<b>12. ANEXOS</b>	

**ÍNDICE DE TABLES**

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Descripción de los primers utilizados para la fenotipificación de las células de pulpa dental humana.	27
<b>Tabla 2.</b> Relación de Anticuerpos primarios y su dilución empleados para la detección de las proteínas de esmalte.	30
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la expresión de genes de los marcadores de superficie (CD) de mesenquimalidad en las células de pulpa dental (hDPSC) mediante RT-PCR. (+) Marcador positivo para hDPSC. (-) Marcador negativo para hDPSC. (S) Muestra.	36

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Distribución por género de los pacientes donadores de terceros molares.	34
<b>Figura 2.</b> Cultivos celulares con >80% de confluencia posterior a 28 días de establecimiento (20X). A. Células de tejido pulpar (Bar=250 µm). B. Células de tejido gingival (Bar=250 µm). C. Células de cresta ósea alveolar (Bar=300 µm).	35
<b>Figura 3.</b> Inmunocitofluorescencia con la expresión de Marcadores de Mesenquimalidad en las células de pulpa dental, tejido gingival y de cresta ósea alveolar. CD-40 con FITC-Hoechst (A, D, G); CD-44 con FITC-Hoechst (B, E, H); CD-105 con Alexa 568-Hoechst (C, F, I). (Bar=50 µm).	35
<b>Figura 4.</b> RT-PCR. Análisis de expresión de CD de marcadores de pluripotencialidad (CD44, STRO-1, CD34, CD14) en muestras de células de tejido pulpar. El GAPDH se utilizó como gen constitutivo. S = Muestras. C (-) = Control negativo.	36
<b>Figura 5.</b> Ensayo de proliferación celular por MTT con un seguimiento de 24, 48, 72, 96 y 120 horas. A. Células mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSCs). B. Células mesenquimales de cresta alveolar humana (HABMSCs). Los recuentos se realizaron por triplicado y se muestra la desviación estándar de los mismos. ( $p \leq 0,05$ ) * ( $p \leq 0,001$ )***.	37
<b>Figura 6.</b> Diferenciación osteoblástica de hDPSCs demostrada con los métodos de tinción de Fosfatasa Alcalina, Rojo de Alizarin y Vonkossa. B. Tinción del incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa	38

alcalina (flechas negras) (20X) (Bar=400  $\mu\text{m}$ ). D. Presencia de cristales de calcio a través de la tinción de Alizarin Red S (flechas negras) (20X) (Bar=100  $\mu\text{m}$ ). F. Presencia de cristales de calcio mediante la tinción de Von Kossa (flechas negras) (20X) (Bar=100  $\mu\text{m}$ ). (A, C, E) Controles.

**Figura 7.** Diferenciación osteoblástica de GMSCs demostrada con los métodos de tinción de Fosfatasa Alcalina, Rojo de Alizarin y Vonkossa. B. Tinción del incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (flechas negras) (20X) (Bar=300  $\mu\text{m}$ ). D. Presencia de cristales de calcio a través de la tinción de Alizarin Red S (flechas negras) (20X) (Bar=300  $\mu\text{m}$ ). F. Presencia de cristales de calcio mediante la tinción de Vonkossa (flechas negras) (20X) (Bar=200  $\mu\text{m}$ ). (A, C, E) Controles. 39

**Figura 8.** Inmunocitofluorescencia y análisis con microscopía confocal de la expresión de proteínas del esmalte dental en hDPSCs tratadas con gel de matriz extracelular de piel de cerdo. (A, D, G, J, M) Contratinción nuclear celular con Hoechst. (B) Detección de amelogenina con Alexa Fluor® 488. (E) Detección de ameloblastina con Alexa Fluor® 594. (H) Detección de enamelisina con Alexa Fluor® 488. (K) Detección de Tuftelina con Alexa Fluor® 594. (N ) Detección de parvalbúmina con Alexa Fluor® 488. (C, F, I, L, O) Merge: Anticuerpo-Hoechst. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 40

**Figura 9.** Inmunocitofluorescencia y análisis con microscopía confocal de la expresión de proteínas del esmalte dental en hDPSCs tratadas con gel de matriz extracelular de tendón de cola de rata. (A, D, G, J, M) Contratinción nuclear celular con Hoechst. (B) Detección de amelogenina con Alexa Fluor® 488. (E) Detección de ameloblastina con Alexa Fluor® 594. (H) Detección de enamelisina con Alexa Fluor® 488. (K) Detección de Tuftelina con Alexa Fluor® 594. (N ) Detección de 41

parvalbúmina con Alexa Fluor® 488. (C, F, I, L, O) Merge: Anticuerpo-Hoechst. Bar = 50 µm.

**Figura 10.** Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a diferentes aumentos (150X; 500X; 1000X; 4000X) de la superficie de segmentos de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 7.2 (fisiológico). Se observa la presencia de picaduras o grietas que se hacen más evidentes a un mayor aumento (flechas negras). C. Arcos usados por pacientes en tratamiento de ortodoncia durante 28 días. Obsérvese la presencia de aparente corrosión tipo picadura y por fricción (flechas negras). (Bar=100 µm; 50 µm; 10 µm; 5 µm).

**Figura 11.** Análisis cuantitativo y cualitativo por EDS-Rx de la composición química de la superficie de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 7.2 (fisiológico). C. Arcos usados por pacientes en tratamiento de ortodoncia durante 28 días. (Bar=100 µm; 50 µm; 10 µm; 5 µm).

**Figura 12.** Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a diferentes aumentos (150X; 500X; 1000X; 4000X) de la superficie de segmentos de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 4.2 (ácido). Se observa la presencia de picaduras o grietas que se hacen más evidentes a un mayor aumento (flechas negras).(Bar=100 µm; 50 µm; 10 µm; 5 µm).

**Figura 13.** Análisis cuantitativo y cualitativo por EDS-Rx de la composición química de la superficie de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 4.2 (ácido) (Bar=100  $\mu\text{m}$ ; 50  $\mu\text{m}$ ; 10  $\mu\text{m}$ ; 5  $\mu\text{m}$ ). 46

**Figura 14.** Daño celular medido por liberación de LDH en HABMSCs tratadas con diferentes concentraciones de  $\text{NiCl}_2$  (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mM) durante 12 h y 24 h. Se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas de tratamiento a concentraciones 0.01 mM, 0.1 mM y 0.5 mM en comparación con el *high control* alto según ANOVA de dos vías y pruebas de comparación múltiple de Tukey's ( $p \leq 0,05$ ) \*. 47

**Figura 15.** Análisis por MEB de HABMSCs expuestas a  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. Células control (A, B, C). HABMSCs con tratamiento de 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h (D, E, F) (Bar=50  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ ). 48

**Figura 16.** Inmunofluorescencia por microscopía confocal del citoesqueleto de HABMSCs con tratamiento 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. A. Morfología del citoesqueleto de F-actina en células de control. B. Las células tratadas con  $\text{NiCl}_2$  mostraron desintegración de los filamentos de F-actina con redondeo celular y alteración general de la morfología (flechas blancas). C. Morfología del citoesqueleto de  $\alpha$ -tubulina en células control. D. Las células tratadas mostraron desorganización, rotura y fragmentación del citoesqueleto de tubulina (flechas blancas). Bar = 20  $\mu\text{m}$ . 49

**Figura 17.** Análisis de inmunofluorescencia con microscopía confocal para la detección del daño de organelos celulares en HABMSCs después del tratamiento con 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. A. Morfología 50

de núcleos en las HABMSCs control. B. Células con tratamiento que muestran cambios en la apariencia de núcleos con fragmentación de material nuclear con signos apoptóticos (flechas blancas). C. Distribución del retículo endoplásmico en células control. D. Retículo endoplásmico en HABMSCs con tratamiento mostrando pérdida de su distribución uniforme (flechas blancas). E. Distribución del aparato de Golgi en las HABMSCs control. F. Células con tratamiento donde se observa pérdida de localización perinuclear del aparato de Golgi (flechas blancas). G. Distribución de Lamp-1 en las células control. H. HABMSCs con tratamiento mostrando falta de cambios aparentes en la distribución de Lamp-1. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 18.** Análisis de los resultados de las pruebas realizadas en orina de 24 horas y suero de ratas Wistar (controles y con tratamiento) que consumieron los productos de la corrosión de Ni-Ti, liberados por biomateriales de uso odontológico (arcos dentales de ortodoncia) posterior al envejecimiento *in vitro*. A. Concentración de creatinina en orina. B. Concentración de creatinina en suero. C. Concentración de fosfatasa alcalina (ALP) en suero. D. Concentración de alanino-aminotransferasa en suero.

51

## ACRÓNIMOS

**ASC.** Células madre adultas que son específicas de un tejido (también conocidas como células madre somáticas, ASC, *adult stem cells*, por sus siglas en inglés) que aparecen durante el desarrollo fetal y permanecen en el cuerpo durante toda la vida.

**CD.** Antígenos de diferenciación (CD, *cluster differentiation* por sus siglas en inglés). Son grupos de diferenciación y se refiere a grupos de anticuerpos monoclonales que muestran una reactividad similar con ciertas subpoblaciones de antígenos de un linaje o etapa de diferenciación celular.

**DSC.** Células mesenquimales derivadas de tejidos dentales (DSC, por sus siglas en inglés: *dental stem cells*).

**EDS-Rx.** Análisis de espectrometría de dispersión de energía de Rayos X empleado para conocer los elementos químicos que están presentes en una muestra y que se realiza mediante un aditamento acoplado a un microscopio electrónico de barrido.

**ESC.** Células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés: *embryonic stem cells*), derivadas de la masa celular interna del blastocisto que se forma antes de la implantación en la pared uterina. Conservan la capacidad de dividirse, proliferar y proporcionar células progenitoras que pueden diferenciarse en células especializadas.

**GSCs.** Células mesenquimales derivadas de la encía dental (GSCs, *gum stem cells*, por sus siglas en inglés).

**HABMSCs.** Células mesenquimales derivadas de hueso alveolar humano (HABMSCs: *human alveolar bone mesenchymal stem cells*, por sus siglas en inglés).

**hDPSCs.** Células mesenquimales derivadas del tejido pulpar de los órganos dentarios (hDPSCs, *human dental pulp stem cells*, por sus siglas en inglés).

**MEB.** Microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM, por *Scanning Electron Microscope* por sus siglas en inglés), es un tipo de microscopio electrónico capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

**MSCs.** Células madre mesenquimales, (MSCs, *mesenchymal stem cells*, por sus siglas en inglés) también denominadas células estromales multipotentes o células estromales mesenquimales. Son células madre adultas no hematopoyéticas multipotentes que están presentes en múltiples tejidos, las cuales pueden diferenciarse en linajes mesodérmicos.

**Ni-Ti.** Aleación de Níquel-Titanio empleada para la fabricación de distintos dispositivos de uso médico y odontológico.

**Ni.** Símbolo químico del elemento de la tabla periódica Níquel con número atómico 28 y peso atómico 58.69 u.

**PSC.** Células madre pluripotenciales (PSC, *pluripotent stem cells*, p que pueden dar lugar a las diferentes células que se derivan de las tres capas germinales.

**SC.** Llamadas células madre (*stem cells* por sus siglas en inglés) y que se encuentran relativamente indiferenciadas reteniendo la capacidad de dividirse y proliferar a lo largo de la vida posnatal para proporcionar células progenitoras que pueden diferenciarse en células especializadas.

**Ti.** Elemento metálico de color gris oscuro con número atómico 22, peso atómico 47.867 u y gravedad específica 4.5; es utilizado para la fabricación de biomateriales de uso médico y odontológico.



## 1. RESUMEN

Las aleaciones metálicas de Níquel-Titanio (Ni-Ti) son empleadas como biomateriales en odontología para fabricar equipos y dispositivos usados en los tratamientos de ortodoncia y rehabilitación bucal gracias a sus propiedades de memoria de forma, biocompatibilidad, superelasticidad, resistencia a la corrosión, dureza y valores mecánicos cercanos al tejido óseo. Dado que se colocan en el ambiente de la cavidad bucal, se puede generar un proceso de corrosión y con ello promover la liberación de iones como el Níquel, el cual puede ser tóxico, alergénico, producir inflamación o y cáncer. Además puede afectar la síntesis de proteínas pues induce cambios en la replicación, proliferación y morfología de las células en los tejidos afectados y la formación de radicales libres capaces de modificar la información genética y la ruptura de los filamentos de actina del citoesqueleto de las células. Para determinar esos efectos se deben realizar pruebas de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*. El empleo de cultivos primarios con células madre mesenquimales de origen dental, representa una opción favorable, ya que al ponerlas en contacto con sales de cloruro de níquel emulando una situación real, reflejan una condición fisiológica de la respuesta, aprovechando sus propiedades de proliferación, autorenovación y diferenciación. Así mismo, el análisis estructural de los biomateriales de uso dental ya fabricados, a través de pruebas de envejecimiento *in vitro* con espectrofotometría de absorción atómica y análisis por EDS-Rx con microscopía electrónica de barrido, permite identificar sus componentes estructurales, tanto en cantidad y tipo, como el tiempo en que son liberados. De igual manera, los efectos que provocan los iones liberados por la corrosión de biomateriales en un modelo animal, permite identificar sí la cantidad liberada puede tener repercusiones hepáticas y renales.

**Palabras clave:** Cultivo celular; Células madre; Pluripotencialidad; Corrosión; Biocompatibilidad; Biomaterial; Níquel-Titanio; Espectrofotometría de absorción atómica; Microscopía electrónica de barrido; Análisis EDS-Rx; Microscopía confocal.

## 2. ABSTRACT

Nickel-Titanium (Ni-Ti) metal alloys are used as biomaterials in dentistry to manufacture equipment and devices used in orthodontic treatments and oral rehabilitation thanks to their properties of shape memory, biocompatibility, superelasticity, resistance to corrosion, hardness and mechanical values close to bone tissue. Since they are placed in the environment of the oral cavity, a corrosion process can be generated and thus promote the release of ions such as Nickel, which has toxic, allergenic, inflammatory and carcinogenic properties, it can also affect protein synthesis inducing changes in the replication, proliferation, and morphology of cells in affected tissues and the formation of free radicals capable of modifying genetic information and the breakdown of actin filaments in the cytoskeleton of cells. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility tests are necessary to know these effects. The use of primary cultures with mesenchymal stem cells of dental origin to perform these tests represents a favorable option, since when they are put in contact with nickel chloride salts, emulating a real situation, they reflect a physiological condition of the response, taking advantage of its properties of proliferation, self-renewal, and differentiation. Likewise, the structural analysis of the biomaterials for dental use already manufactured, through *in vitro* aging tests with atomic absorption spectrophotometry and EDS-Rx analysis with scanning electron microscopy, allows us to identify their structural components, both in quantity and kind, like the time they are released. In the same way, the effects caused by the ions released by the corrosion of biomaterials in an animal model makes it possible to identify whether the amount released has liver and kidney repercussions.

**Keywords:** Cell culture; Stem cells; Pluripotentiality; Corrosion; Biocompatibility; Biomaterial; Nickel-Titanium; Atomic absorption spectrophotometry; Scanning electron microscopy; EDS-Rx analysis; Confocal microscopy.

### 3. INTRODUCCIÓN

En el campo de la atención médica se emplean equipos, aparatos y dispositivos fabricados con aleaciones metálicas como la de Níquel-Titanio (Ni-Ti), pues presentan gran biocompatibilidad para su aplicación en los tratamientos de áreas como la cardiología y circulación, ortopedia, urología, odontología, entre otras<sup>1</sup>.

En el área de la odontología se ha incrementado el interés por conocer la biocompatibilidad de los biomateriales y aleaciones de Ni-Ti empleados en los tratamientos dentales y cuáles son sus repercusiones en el organismo<sup>2</sup>, ya que se busca que no sólo deben soportar agresiones físicas, mecánicas y biológicas para su empleo en los tratamientos de ortodoncia y prótesis dental, sino que además deben ser compatibles con el medio bucal<sup>3</sup>.

#### 3.1 Biomateriales

Los biomateriales usados en la atención médica son materiales artificiales o naturales introducidos en los procedimientos terapéuticos o de diagnóstico, que están en contacto con tejidos o fluidos biológicos para actuar e interrelacionar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo<sup>4-6</sup>.

Un biomaterial se distingue por su biocompatibilidad, que es la capacidad de un material para promover una respuesta adecuada del huésped en una situación específica. Para ello la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos estableció que para ser considerado biocompatible, un material no debe causar daño al paciente. Así, la biocompatibilidad de un dispositivo médico debe considerar la compatibilidad biológica de los materiales utilizados, así como su diseño y gestión de riesgos, analizando los componentes, procesos de fabricación, uso clínico, incluida la ubicación anatómica prevista, y la frecuencia y duración de la exposición, debiéndose realizar ensayos de genotoxicidad y carcinogenicidad, toxicidad para la reproducción, interacción con la sangre, citotoxicidad *in vitro*, efectos locales después de la implantación, residuos de esterilización, degradación

de materiales, irritación y sensibilidad, toxicidad sistémica, preparación de muestras, así como la identificación y cuantificación de los productos degradados<sup>7,8</sup>.

Para desarrollar nuevos biomateriales, se requiere realizar: 1) Análisis de sus propiedades mecánicas, 2) Evaluación de la biocompatibilidad y 3) Alta resistencia a la corrosión y al desgaste<sup>5,9</sup>.

### **3.2 El fenómeno de la corrosión y los biomateriales**

Dentro de los atributos necesarios para la selección de biomateriales elaborados a partir de aleaciones metálicas para su empleo médico-terapéutico, la resistencia a la corrosión y al desgaste son aspectos importantes a considerar<sup>10,11</sup>.

La corrosión se define químicamente como la destrucción visible de un metal. Se debe a las reacciones electroquímicas durante las cuales la superficie de un metal se deteriora por la liberación de iones. Este fenómeno es un proceso complejo en el que el biomaterial se ve afectado por el entorno químico del cuerpo, donde los cambios de pH, fluidos corporales, exposición a procesos celulares etc., logran generar la liberación de los elementos iónicos como el Níquel, mismo que puede generar efectos biológicos adversos, tales como daño celular debido a la toxicidad, alergia, mutagenicidad o carcinogenicidad, lo anterior como producto de una exposición prolongada<sup>12-15</sup>.

A continuación se explica la clasificación de los tipos de corrosión en metales y aleaciones<sup>17</sup>.

#### **3.2.1 El ataque uniforme**

Es la forma más común de corrosión. Afecta a todos los metales, aunque a diferentes velocidades. El metal experimenta una reacción *redox* con el entorno circundante, y puede no detectarse hasta que gran parte del metal se vea afectado.

#### **3.2.2 La corrosión por picaduras y grietas**

Esta se puede formar en las superficies de los dispositivos que no son perfectamente lisos como los aparatos de ortodoncia. En un nivel microscópico, pueden exhibir hoyos y grietas. Se cree que estas características aumentan la

susceptibilidad a la corrosión debido a su capacidad para albergar microorganismos formadores de placa dentobacteriana.

### **3.2.3 La corrosión galvánica**

Este tipo de corrosión ocurre cuando dos metales se unen y se colocan en una solución conductora o un electrolito. Cuanto más electronegativo son los metales se convierte en el ánodo; al ser más electropositivo el metal noble se convierte en el cátodo. Por lo tanto, el metal más electropositivo se corroe de manera preferencial.

### **3.2.4 Corrosión por fricción**

Esta ocurre en áreas de contacto metálico sujetas a cargas sostenidas. Un ejemplo de este tipo de corrosión se presenta en el campo de la ortodoncia en lo que se denomina la interfaz *archwire/bracket-slot*.

### **3.2.5 Corrosión por estrés**

Los metales generalmente tienen una mayor tendencia a fracturarse bajo estrés cíclico repetido (fatiga). Este fenómeno se acelera si la aleación también está expuesta a un medio corrosivo; esto se llama fatiga por corrosión.

### **3.2.6 Corrosión inoculada microbiológicamente**

Los microorganismos y sus subproductos pueden afectar las aleaciones de metales de 2 formas: (1) ciertas especies absorben y metabolizan el metal de aleaciones, lo que lleva a la corrosión; y (2) los subproductos metabólicos normales de otras especies microbianas pueden alterar las condiciones ambientales, lo que las hace más conducentes a la corrosión, por ejemplo, al aumentar los niveles de acidez locales.

## **3.3 Pruebas de Biocompatibilidad**

Como se mencionó, para emplear nuevos biomateriales en los tratamientos médico odontológicos son necesarias pruebas de biocompatibilidad que permitan comprender la respuesta biológica de los tejidos y órganos con los que tendrá que

interactuar<sup>18</sup>. Estas pruebas evalúan la capacidad de estos materiales para inducir respuestas en los tejidos vivos, la generación de muerte celular, formación de tumores, daño genético y posibles respuestas inmunitarias<sup>10</sup>.

Las pruebas de biocompatibilidad comienzan con estudios *in vitro*, los cuales son importantes en el desarrollo del biomaterial para su uso específico. En ellos se puede determinar el crecimiento, función, material genético y muerte celular. Posterior a este tipo de estudios, le siguen las pruebas realizadas bajo condiciones *in vivo*, donde se emplean animales con similitudes con el organismo humano en cuanto a respuestas de los tejidos. Las pruebas en animales se pueden subdividir en grupos, como de toxicidad sistémica a corto y largo plazo, de exposición a membranas intactas o dañadas y de sensibilización inmune o respuesta ósea. También hay pruebas que incluyen mutagenicidad, carcinogenicidad y otras condiciones. Posterior a estos estudios, se culmina con investigación de tipo clínico que permitirá en un momento dado el uso general del dispositivo elaborado con algún biomaterial<sup>18,19</sup>.

### **3.4 Biomateriales y su uso en odontología**

El empleo de biomateriales en la odontología se ha incrementado gracias a su biocompatibilidad. Se usan para fabricar prótesis dentales, implantes y materiales de ortodoncia como arcos, bandas, tornillos y brackets. El empleo de biomateriales elaborados con aleaciones de metales nobles, aceros austeníticos, aleaciones de cobalto y las de Ni-Ti, sigue siendo el común denominador, se busca que su empleo alcance la función terapéutica deseada, sin provocar ningún efecto local o sistémico y que generen la respuesta celular o tisular más benéfica<sup>20,21</sup>.

A pesar de las grandes ventajas que presentan estos biomateriales, la corrosión *in vivo* es una potencial desventaja, ya que son colocados en el ambiente bucodental y por lo tanto están sujetos a la acción de factores como la saliva, alimentos, fluctuaciones de temperatura, fuerzas de masticación o la misma carga de su uso<sup>20</sup>.

En general, la corrosión puede causar dos tipos de cambios: 1) reducción de las propiedades mecánicas y acortamiento del tiempo de vida del biomaterial usado,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y 2) reacciones nocivas para el huésped, tanto locales como sistémicas provocadas por los productos de la corrosión. Desde hace algunas décadas, se ha demostrado que los iones metálicos pueden ser liberados en cavidad bucal y localizados en sangre o suero, orina y otros órganos, así como los tejidos adyacentes. Las consecuencias biológicas de esa liberación han sido extensamente estudiadas *in vitro* e *in vivo*<sup>22</sup>.

Las aleaciones de Níquel-Titanio (50% de Níquel-50% de Titanio) son los biomateriales empleados en el 70%-80% de los tratamientos dentales. Su uso se debe a sus excelentes propiedades como el efecto de memoria de forma, buena biocompatibilidad y superelasticidad, con valores mecánicos (módulo elástico y resistencia a la compresión) cercanos a los del tejido óseo, así como su resistencia a la corrosión y al desgaste<sup>10,23</sup>.

Por lo anterior, la condición natural de la cavidad bucal ofrece un ambiente ideal para la biodegradación de estas aleaciones de metales, lo que facilita la liberación de iones metálicos como el Níquel y Titanio, los cuales pueden causar efectos adversos<sup>24</sup>.

Se ha reportado que durante los tratamientos odontológicos que emplean aleaciones de Ni-Ti, frecuentemente se observan manifestaciones orales como glositis, sabor metálico, labios escamosos, eritema multiforme e hipertrofia gingival y se han asociado principalmente con los iones de Níquel que son liberados durante la exposición a estos dispositivos, ya que se crea un ambiente potencialmente corrosivo<sup>25</sup>.

El Níquel es el alérgeno más conocido además de presentar propiedades tóxicas, inflamatorias, mutagénicas y cancerígenas. A pesar de que se considera un oligoelemento esencial y que su ingesta diaria es de 200 a 300  $\mu\text{g}/\text{día}$ , se ha informado que dosis mayores a dicha cantidad podrían ser absorbidos por difusión en los canales de calcio y también por fagocitosis, lo cual puede inducir cambios en la replicación, proliferación y morfología celular y por tanto afectar a los organelos celulares, provocando cambios en la homeostasis celular y la regulación de la expresión genética<sup>4,10,22,26-28</sup>.

### **3.5 Cultivos celulares para el estudio *in vitro* de los biomateriales**

La primera etapa en la realización de pruebas de biocompatibilidad para evaluar la actividad de un biomaterial se realiza *in vitro*, donde son evaluadas las reacciones celulares de proliferación, homeostasis, daño genético y muerte celular posterior a la interacción con los biomateriales. En este proceso, los cultivos celulares tienen un papel determinante, pues permiten el aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos, para posteriormente ser colocadas en un ambiente artificial que favorece su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos diferenciación, además que permite estudiar la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, las interacciones célula-célula, la genética y la generación de metabolitos de interés<sup>29</sup>.

Es importante mencionar que para realizar las pruebas preclínicas de los biomateriales, deben utilizarse cultivos celulares primarios, ya que las líneas celulares no pueden mostrar completamente una situación fisiológica real<sup>4</sup>. Además de lo anterior y dado que los tejidos humanos están compuestos por células específicas, es necesario considerar el empleo de células de diferentes orígenes y con diversas funciones, por lo que se ha sugerido que las células madre, que tienen propiedades como la plasticidad y pluripotencialidad, se pueden considerar como las candidatas ideales para ser usadas en las pruebas de biocompatibilidad<sup>30-32</sup>.

### **3.6 Las Células Madre: concepto y clasificación**

Las células madre son células no especializadas del cuerpo humano, presentes a lo largo de toda la vida, desde la etapa embrionaria del desarrollo hasta la edad adulta. Este tipo de células puede diferenciarse en cualquier tipo de célula de un organismo, se autorenewan y sirven de base para todos los tejidos y órganos<sup>32,33</sup>.

Por su origen, se pueden clasificar en dos categorías a saber: las células madre embrionarias (células ES) y células madre postnatales o adultas (células AS). Por lo que corresponde a las células madre embrionarias, éstas se obtienen del

interior del blastocisto (embrión de etapa temprana, de dos semanas de edad que consta de 50-150 células) de la etapa posterior a mórula. Estas células forman las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo), y son capaces de desarrollar más de 200 tipos de células<sup>34,35</sup>.

Por su capacidad para diferenciarse se pueden clasificar en: 1) Totipotentes, que pueden ser implantadas en el útero y dar lugar a un organismo completo; 2) Pluripotentes, pueden dar lugar a cada tipo de células de un organismo, excepto tejidos extraembrionarios como la placenta; 3) Multipotentes, son células madre adultas que sólo generan linajes específicos de células. A este grupo pertenecen las células madre de adultos; 4) Células madre pluripotentes inducidas (iPS), son células somáticas a las que se le introducen los genes Oct-4, Sox2, c-Myc y Klf4eI, con la capacidad de ser similares a las embrionarias<sup>34,36</sup>.

Las células madre adultas, conocidas como células madre mesenquimales (MSCs), a pesar de tener plasticidad reducida, representan una fuente prometedora para su aplicación en el campo médico-clínico. Se ha establecido que tienen origen en la médula ósea pero se ubican en el estroma, son no hematopoyéticas y se encuentran en un nicho perivascular, con capacidad de autorrenovación, son adherentes, con morfología fibroblastoide y capaces de diferenciarse a células de origen mesodérmico como osteoblastos, condrocitos y adipocitos<sup>37,38</sup>.

### **3.7 Fuentes de obtención de MSCs**

La fuente principal de obtención de las células madre mesenquimales es a partir de la médula ósea; sin embargo, es posible encontrar otras fuentes como el páncreas, cerebro, pulpa dental, placenta, tejido adiposo, folículo piloso, membrana sinovial, ligamento periodontal, sangre periférica, endometrio y cordón umbilical<sup>38-40</sup>.

Para considerarlas células madre derivadas del mesénquima, en 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció los siguientes criterios: 1) Adherencia al plástico *in vitro*. Capacidad que no presentan las células madre hematopoyéticas. 2) Inmunofenotipo: expresan los siguientes marcadores de superficie celular como el CD73, CD90, y CD105 y la ausencia de los marcadores

CD45 y CD34, CD14 y CD11b, CD79a, CD19 y HLADR; 3) Limitada Plasticidad: Capacidad de diferenciación a tres linajes celulares tales como osteoblastos, condroblastos y adipocitos *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo<sup>41-43</sup>.

Las MSCs están presentes en todos los tejidos del cuerpo humano, aunque su número es limitado, no se dividen en circunstancias normales ya que están inactivas, sin embargo, al presentarse un daño o lesión tisular, actúan dividiéndose y diferenciándose, ya que su principal función consiste en la reparación<sup>44</sup>.

Debido a sus diversas ubicaciones dentro del cuerpo humano, obtener y aislar el MSCs no es una tarea fácil, principalmente por las complicaciones que pueden traer consigo, por lo que es necesario identificar aquellas fuentes que permitan ser menos invasivas y garantizar su capacidad de proliferación. Por lo anterior, actualmente los tejidos de origen dental se consideran una fuente efectiva y de fácil acceso para la obtención de MSCs<sup>45</sup>, que para el caso se han denominado colectivamente Células Madre Dentales (DSCs por sus siglas en inglés)<sup>46,47</sup>.

### **3.8 Células Mesenquimales derivadas de los tejidos dentales (DSCs)**

En los últimos años, diversos tipos de células madre adultas han podido ser aisladas de los tejidos de la cavidad bucal<sup>46,48-53</sup>, entre ellas están: las células madre de pulpa dental (hDPSCs), Células madre gingivales (GSCs), Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED), Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), Células madre progenitoras del folículo dental (DFPCs), Células madre de la papila apical (SCAPs), Células madre de hueso alveolar (HABMSCs) y Células madre de pulpas dentales natales (NDP-SC).

A través de las investigaciones realizadas, se ha observado que las DSCs son poblaciones celulares similares a las MSCs, además que dado sus orígenes ectomesenquimales, pueden mostrar características tanto del mesodermo como del ectodermo. Este hecho es muy importante, ya que la asociación células mesenquimales y epiteliales es necesaria para regenerar o construir un nuevo diente<sup>46</sup>. Es un hecho relevante mencionar que las DSCs presentan capacidad de autorenovación y potencial de multidiferenciación, pudiendo diferenciarse a tejido osteoblástico, odontogénico, dentinogénico, cementogénico, adipogénico,

condrogénico, miogénico y neurógeno y mantienen sus propiedades multipotentes después de la crioconservación a corto y largo plazo<sup>54</sup>.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El empleo de biomateriales fabricados con aleaciones de metales para la elaboración de dispositivos y materiales de uso médico-odontológico, requieren de una evaluación previa que permita estimar su biocompatibilidad. Estas pruebas se llevan a cabo con el propósito valorar la susceptibilidad que presentan ante los procesos de corrosión, dado que son colocados en ambientes orgánicos y en contacto con fluidos, células y tejidos desencadenando la liberación de iones metálicos que pueden tener un efecto toxicológico local o sistémico.

El tipo de aleaciones que más se usan en el campo odontológico sobre todo en las áreas de ortodoncia y prostodoncia, son las de Níquel-Titanio (Ni-Ti), las cuales y a pesar de sus propiedades favorables y recomendaciones para su uso, no las excluye de que puedan sufrir procesos de corrosión, lo que trae consigo la liberación de iones como el Níquel, considerado un elemento generador de reacciones alérgicas, inflamatorias, inmunológicas o incluso cancerígenas.

Debido a las afecciones clínicas de las afecciones producidas por el contacto prolongado con los productos de la corrosión de estos materiales se requiere profundizar en el conocimiento que permita describir y analizar su nivel de biocompatibilidad y de qué manera afectan los productos liberados como radicales libres que entran en contacto directo con los nichos celulares en los diversos tejidos de la cavidad bucal, afectando su viabilidad, proliferación y expresión genética.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los productos de la corrosión de la aleación Ni-Ti derivados de los biomateriales usados en los tratamientos odontológicos, modifican la capacidad de proliferación, viabilidad y expresión genética de las células humanas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General:

Determinar la reacción y efecto de células humanas en cultivo ante los productos de corrosión derivados de la aleación de Níquel-Titanio (Ni-Ti) de biomateriales empleados en tratamientos odontológicos.

### 6.2 Objetivos Específicos:

- Establecer un cultivo de células pluripotenciales a partir de células de pulpa dental humana.
- Obtener productos de la corrosión de aleaciones de Ni-Ti de biomateriales empleados en tratamientos odontológicos.
- Describir el efecto de los productos de la corrosión de la aleación de Ni-Ti sobre la viabilidad, proliferación y expresión genética de células humanas en un cultivo.
- Describir en un modelo animal (rata Wistar), el efecto que presentan los productos de la corrosión de la aleación de Ni-Ti de los biomateriales empleados en tratamientos odontológicos.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Diseño del estudio para la obtención de células mesenquimales de tejidos dentales humanos

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Tisular del Departamento de Morfología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (U.A.A.) y fue aprobado por el Comité Institucional de Biotética de la propia institución. Se trata de un estudio de tipo básico-experimental, transversal y analítico, donde se emplearon cultivos primarios de células mesenquimales de tejidos dentales humanos (DSCs) obtenidas bajo consentimiento informado de 10 donadores entre 16 a 24 años de ambos sexos y que fueron atendidos por

tratamiento de cirugía de terceros molares en la clínica dental de la Unidad Biomédica de la U.A.A.

## **7.2 Establecimiento de los cultivos celulares primarios**

Se establecieron cultivos celulares primarios a partir de tejido de pulpa dental, tejido gingival y cresta ósea alveolar. Para la obtención del tejido pulpar y después del procedimiento quirúrgico, los terceros molares se lavaron en solución salina al 0.9% con 1,2 mg/ml de clindamicina y fueron transportados a 4 °C en medio completo compuesto de Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucosa (DMEM) (Gibco®, USA), 15% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco®, USA), 1% de antibióticos Penicilina-Estreptomicina (Gibco®, USA) y 1% de anfotericina B (Gibco®, USA)<sup>53</sup>. Los molares fueron lavados 3x con PBS pH 7,4 (Gibco®, USA) suplementado con antibióticos<sup>55</sup>. El tejido pulpar se obtuvo realizando cortes con disco de diamante estéril y micromotor de baja velocidad e irrigación constante a nivel de la unión amelocementaria de la corona clínica de los órganos dentales accediendo a la cámara pulpar quedando el tejido pulpar expuesto para poder retirarlo<sup>56</sup>.

El tejido gingival se obtuvo producto de las cirugías dentales realizadas, donde previo a la sutura, se realizó una gingivoplastia que permitió la obtención del tejido, aplicándosele lavado con solución salina con clindamicina y transportado a 4 °C en medio DMEM/15% SBF y 1% de antibióticos para su procesamiento.

Para la obtención de muestras de tejido de cresta alveolar ósea, durante la realización de las cirugías y previo a suturar, se realizó una alveoloplastia y se obtuvieron porciones de tejido óseo, a los cuales se les aplicó el mismo tratamiento que al tejido gingival.

Las muestras de los diferentes tejidos se maceraron en porciones de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y se les aplicó un procedimiento de digestión enzimática con 2 mg/ml de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidrato (EDTA) (Affymetrix USB Products, USA)/PBS durante 10 minutos a 37°C. Se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos y se incubaron posteriormente con 333 mg/μl de Colagenasa Tipo I (Gibco®, USA) por 30 minutos<sup>57</sup>. Posterior a centrifugar a 1000 g por 5 minutos, se sembraron en medio completo en placas de cultivo de 35 mm y

se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. El cambio de medio se realizó 2 ocasiones por semana hasta alcanzar confluencia >80%<sup>58</sup>. Los cultivos de los diferentes tipos de células se observaron a las 48 h, 72 h, 96 h y 120 h, utilizando un microscopio óptico invertido (Zeiss, Primo star, Germany) y las imágenes fueron capturadas por el software AmScope (Versión: x64, 3.7.7303).

### **7.3 Inmunofenotipificación de las células mesenquimales de pulpa dental, encía y cresta ósea alveolar**

El origen mesenquimal de las células se evaluó por inmunocitofluorescencia, utilizando los siguientes anticuerpos<sup>39</sup>: CD40 (conjugado de fluoresceína anti-CD40 humana (ratón), Calbiochem®, USA, dilución: 1:10), CD44 (CD44 antihumano de ratón FITC, BD Pharmingen™, USA, dilución: 1:20) y CD105 (CD105 antihumano de ratón PE, BD Pharmingen™, dilución: 1: 6). A partir del cuarto pase, las células se sembraron en cámara Lab-Tek de 8 pocillos (Thermo-Scientific, USA) y al alcanzar confluencia fueron fijadas, se bloquearon sitios de unión no específicos y se lavaron 3 ocasiones con PBS<sup>59</sup>. A continuación, las muestras se incubaron con los anticuerpos CD40, CD44 y CD105 respectivamente, durante 12 h a 4 °C en oscuridad.

Las muestras se contratiñeron con 2 µg/ml de Hoechst (Molecular Probes, USA) por 15 minutos, se lavaron tres ocasiones y se montaron con ProLong Gold (Invitrogen, USA). Las imágenes se obtuvieron con microscopio invertido confocal LSM700 Carl Zeiss Axio Observer Z1; Objetivo: ECPlnN 40x / 1.3 Oil DICIII, a una resolución de 0.26µm; Optovar 1x; Nene. revista 400x, siendo procesado en el software ZEN Black 2.3 SP1.

En las células de pulpa dental humana se realizó el análisis de la expresión de marcadores de mesenquimalidad por RT-PCR y PCR punto final. Se aisló el RNA total de 5 muestras de hDPSCs utilizando TRIzol (TRIzol™, USA) según el protocolo del fabricante<sup>60</sup>. La síntesis de ADN complementario (ADNc) se obtuvo con el reactivo de transcriptasa inversa (Life Technologies™, USA). El ADNc obtenido se cargó en gel de agarosa al 1,6% mediante tinción de bromuro de etidio (EtBr) 0,5

µg/ml. Los primers para la detección de marcadores de mesenquimalidad<sup>61</sup> utilizados, se presentan en la Tabla 1. Se utilizó el GAPDH como gen constitutivo.

**Tabla 1**  
Descripción de los primers utilizados para la fenotipificación de las células de pulpa dental humana.

GEN	GENE ID	PRIMERS 5' → 3'	Tm	Producto de PCR (pb)
CD14	929	F: GACCTAAAGATAACCGGCACC R: GCAATGCTCAGTACCTTGAGG	60	161
CD34	947	F: CACAGGAGAAAGGCTGGG R: CGTGTTGTCTTGCTGAATGG	58	179
CD44	960	F: CAACACAAATGGCTGGTACG R: GTGTGGTTGAAATGGTGCTG	60	153
STRO-1	683	F: CAGGCACTCTATTCCCAGAG R: TCTGTGCGACACCAGCTCAAG	60	149

#### 7.4 Ensayo de proliferación celular

En los diferentes tipos de células se realizó el recuento celular hasta alcanzar confluencia de ~ 80% a los 28 días. La prueba de proliferación celular se realizó por ensayo de exclusión de colorante vital<sup>62</sup> y el recuento se realizó mediante hemocitómetro siguiendo el método Strober<sup>63</sup>, hasta alcanzar el pase 3.

Así mismo, se utilizó el ensayo MTT (Roche, Germany) descrito por Mosmann<sup>64</sup>. El ensayo de proliferación celular se realizó cada 24 horas hasta alcanzar 120 horas y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas se cuantificaron mediante absorbancia con lector de placas (Bio-Rad, USA) con un filtro de 570 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, analizados y comparados estadísticamente con su control usando la prueba de comparación múltiple de Tukey's.

#### 7.5 Evaluación de la capacidad pluripotencial de diferenciación de las células mesenquimales obtenidas a partir de tejidos dentales humanos

Las muestras de hDPSCs fueron inducidas a diferenciación de linaje osteoblástico mediante el empleo de medio de cultivo inductor compuesto por

DMEM completo, 0.01 mM de dexametasona, 50  $\mu$ M de ácido ascórbico y 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma Aldrich, USA) por un periodo de 21 días, haciendo cambio de medio de cultivo dos veces por semana<sup>65</sup>.

Se llevo a cabo la diferenciación de hDPSCs hacia un linaje ameloblástico. Se procesaron geles de Matriz Extracelular (MEC) de piel de cerdo y tendón de cola de rata por digestión con método ácido<sup>66</sup>, considerados andamios naturales por su contenido de proteoglicanos y diversas proteínas como la vimentina y varios tipos de colágena que promueven la proliferación y diferenciación celulares<sup>67,68</sup>. Se trataron cajas de cultivo por un periodo de 14 días. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células hDPSCs en las cajas tratadas por un periodo de 21 días en medio DMEM completo para inducir la diferenciación. Se realizó cambio de medio 2 ocasiones por semana hasta alcanzar confluencia.

Se realizó la diferenciación de células mesenquimales de tejido gingival (GSCs) a linaje osteoblástico por medio la inducción con geles de MEC de vesícula biliar e intestino delgado de cerdo obtenidas por liofilización<sup>69,70</sup> con los que se realizó el tratamiento de cajas de cultivo por 14 días. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células GSCs en las cajas tratadas por un periodo de 21 días en medio DMEM completo para inducir la diferenciación. Se realizó cambio de medio 2 ocasiones por semana hasta alcanzar confluencia.

En los diversos tipos de geles se realizó la cuantificación del componente protéico mediante método Bradford<sup>71</sup>.

### **7.5.1 Diferenciación osteoblástica**

La diferenciación hacia linaje osteoblástico se demostró por el reconocimiento de la fosfatasa alcalina (ALP), la producción de fosfato de calcio empleando las tinciones de Von Kossa y rojo Alizarina. Después de 21 días de cultivo, se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron.

Para la tinción de ALP se incubaron en oscuridad con BCIP-NBT (5 -bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul tetrazolio) (Sigma-Aldrich, USA) y se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, USA).

Para la tinción de Von Kossa, las células se tiñeron con 0,5 ml de solución de nitrato de plata al 3% (Sigma-Aldrich, USA) bajo una fuente de luz de 70 watts, añadiéndose posteriormente tiosulfato de sodio al 5% (Sigma-Aldrich, USA) y se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer.

Para la tinción de rojo Alizarina las células se tiñeron con Alizarin Red S al 2% (Sigma-Aldrich, USA) y se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer<sup>72-74</sup>. Todas las muestras se observaron en microscopio óptico invertido.

### **7.5.2 Diferenciación ameloblástica**

La diferenciación del linaje ameloblástico en las hDPSCs se realizó mediante la detección de las proteínas de esmalte: amelogenina, ameloblastina, enamelinina, tuftelina y parvalbúmina por ensayo de inmunofluorescencia.

Del total de células tratadas con geles de MEC, se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en cámara Lab-Tek de 8 pocillos hasta alcanzar ~ 80% de confluencia. Se realizó la fijación y se bloquearon sitios de unión no específicos.

Para la detección de proteínas del esmalte, las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C con los anticuerpos primarios enumerados en la Tabla 2. A esto le siguió la incubación con los anticuerpos secundarios con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, USA) y Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, USA).

Todas las muestras se sometieron a contratinción nuclear y se montaron. Las imágenes se obtuvieron utilizando microscopio confocal. Los controles en este experimento se establecieron con hDPSC sin tratamiento de diferenciación.

### **7.6 Obtención de los productos de la corrosión de Níquel-Titanio (Ni-Ti) de biomateriales usados en el área de odontología**

En 50 ml de solución salina al 0.9% se sometieron a envejecimiento *in vitro* Arcos Dentales para Ortodoncia nuevos de marca comercial Highland Metals Incorporated con las siguientes características: Heat activated NiTi Arches; Size: .019x.025; Form: Natural; REF: 11219251124; LOT: 614186, para conocer la cantidad de iones de Níquel y de Titanio liberados.

**Tabla 2**

Relación de Anticuerpos primarios y su dilución empleados para la detección de las proteínas de esmalte

Anticuerpo primario	Dilución
Anti-AMELX. Rabbit polyclonal (ABCAM, USA)	1:25
Anti-MMP20 (EP-1275Y). Rabbit monoclonal (ABCAM, USA)	1:25
Parvalbumin. Rabbit Polyclonal (Invitrogen, USA)	1:25
TUFT1. Rabbit Polyclonal (Invitrogen, USA)	1:100
Ameloblastin (H300) Rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology, USA)	1:200

Se formaron dos grupos tomando como base el pH de la solución: Grupo 1: pH 7.12 (fisiológico) y Grupo 2 pH 4.2 (emulación de pH ácido en cavidad bucal por la producción de ácidos por la actividad bacteriana)<sup>75-78</sup>.

De igual manera se establecieron los controles de calidad para la lectura (solución estándar y solución fortificada).

Previo a desarrollar el proceso de envejecimiento, se pesaron las muestras de arcos dentales y se les aplicó tratamiento recomendado por la Sociedad Americana para Metales y Aleaciones con el propósito de evaluar los procesos de liberación de metales<sup>78-80</sup>. Además se realizó el análisis de la superficies de los arcos bajo Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL LV, Japan), así como el análisis de los componentes químicos mediante el analizador Espectrómetro de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS Rx) acoplado al MEB<sup>75-77,81,82</sup>.

Se realizaron lecturas de los diferentes grupos de arcos en proceso de envejecimiento a los 7, 14, 21 y 28 días para conocer la cantidad de iones de níquel y titanio liberados usando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Mod PinAAcle 900 H, USA).

Se realizó un comparativo con arcos dentales usados por pacientes durante 28 días en cavidad bucal mediante análisis por MEB y EDS Rx.

### **7.7 Evaluación del efecto del Cloruro de Níquel (NiCl<sub>2</sub>) sobre células humanas en cultivo**

Dentro de las pruebas para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales se encuentran las iniciales o primarias que incluyen pruebas de citotoxicidad donde se ponen en contacto los biomateriales o sus productos con células vivas. Para evaluar el efecto citotóxico, los cultivos celulares obtenidos cresta ósea alveolar por su relación en una condición *in vivo* con los biomateriales de uso odontológico, a partir del pasaje 4 se sometieron a la exposición del reactivo Nickel (II) chloride hexahydrate (Sigma Life Science, USA) a una concentración de 50 ppm (0.2 mM) durante 24 horas<sup>83,84</sup>.

#### **7.7.1 Efecto citotóxico del NiCl<sub>2</sub> a través del ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)**

Se realizó la siembra de  $5 \times 10^4$  de células de cresta ósea alveolar en 250  $\mu$ l de medio completo en placas de 48 pozos. En los cultivos confluentes se les colocó el reactivo Nickel (II) chloride hexahydrate (Sigma Life Science, USA) a concentraciones de 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM y 0.01 mM y a diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72 horas)<sup>84</sup>.

Se realizó la observación de los cambios morfológicos al microscopio óptico que presentaron las células a los diferentes tiempos. El daño celular fue determinado por la liberación de LDH<sup>85,86</sup> usando LDH-Cytotoxicity Assay Kit II (Biovision, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue medida a través de densidad óptica de 495 nm usando un lector de placas (Bio-Rad, USA). Se empleó un control background (medio de crecimiento) y control de lisis con tratamiento de Tritón X-100 (Sigma Life Science, USA) para calcular el porcentaje de LDH liberado al medio.

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se aplicaron pruebas estadísticas para encontrar diferencias estadísticamente significativas.

### **7.7.2 Evaluación de cambios morfológicos en células mesenquimales de cresta ósea alveolar humana (HABMSCs) por exposición a NiCl<sub>2</sub>**

Las HABMSCs se sembraron en una cámara Lab-Tek de 8 pocillos hasta alcanzar ~ 80% de confluencia. Se trataron con NiCl<sub>2</sub> durante 24 horas a una concentración de 2 mM (500 µg/ml)<sup>83,84</sup>. Las muestras se fijaron y se deshidrataron con concentración creciente de etanol (60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%), incubándose cada concentración durante 10 min. Finalmente, las muestras se trataron con CO<sub>2</sub> en el punto crítico superior<sup>87</sup> y se recubrieron con 10 Å de oro.

El efecto se analizó mediante MEB. Además se evaluaron los efectos en el citoesqueleto de actina, tubulina y organelos celulares por ensayo de inmunofluorescencia. Las células se fijaron y se bloquearon sitios inespecíficos y se incubaron con anticuerpos primarios durante 12 h a 4°C y protegidas de la luz.

El citoesqueleto de actina se marcó empleando faloidina marcada con Alexa Fluor® 488, dilución 1: 300 (Molecular Probes™, USA); la tubulina se marcó con anticuerpo anti-alfa tubulina, dilución 1: 250 (Invitrogen™, USA). Para el retículo endoplásmico (ER) con Anti-proteína disulfuro isomerasa, dilución 1:200 (ThermoFisher, USA); para lisosomas con anti-Lamp-1, dilución 1:375 (Santa Cruz, USA). A esto le siguió la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, dilución 1:800 (ThermoFisher, USA.) para la identificación de tubulina y Lamp-1. Para la detección del aparato de Golgi (GA), se usó Cell Light™ Golgi-RFP, dilución 1: 200 (Molecular Probes™ USA) en medio de crecimiento y se aplicó directamente a las células vivas durante 2 h. A todas las muestras se les aplicó contratinción nuclear.

El efecto de la apoptosis se analizó mediante criterios morfológicos de los núcleos celulares. Para ello, las células se fijaron con acetometanol (acetona-metanol 1:1) durante 4 h a 4°C, se tiñeron con Hoechst 33342 y se incubaron en la oscuridad durante 15 min a 37°C<sup>88,89</sup>.

Todas las muestras se montaron y observaron bajo microscopio confocal.

## **7.8 Evaluación del efecto de los productos de la corrosión de Ni-Ti liberados de biomateriales usados en el área de odontología en un Modelo Animal (Rata Wistar)**

Para observar los efectos toxicológicos que pueden tener los productos de la corrosión de Ni-Ti liberados por biomateriales de uso odontológico (arcos de ortodoncia) posterior al envejecimiento *in vitro*, se realizó un estudio agudo empleando 10 Ratas Wistar Macho de 120 gramos, divididas en dos grupos (control y con tratamiento).

Al grupo de tratamiento se le proporcionó como agua de beber *ad libitum* la solución salina con los productos de la corrosión liberados de los arcos dentales a estimar mediante análisis con espectrofotómetro de absorción atómica. Al grupo control se les proporcionó únicamente solución salina al 0.9%. El consumo del líquido en ambos casos, se proporcionó por 3 días continuos.

Se realizó la evaluación de posible daño renal mediante la afectación de la excreción de creatinina, para lo cual se recolectó orina de 24 horas. Se realizó el sacrificio de los animales y se obtuvieron muestras de sangre tanto del grupo de tratamiento como de las de control y se realizaron pruebas con kits diseñados para la determinación en suero de creatinina, fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa (Bio-Systems, Spain) que reflejan daño hepático y renal. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

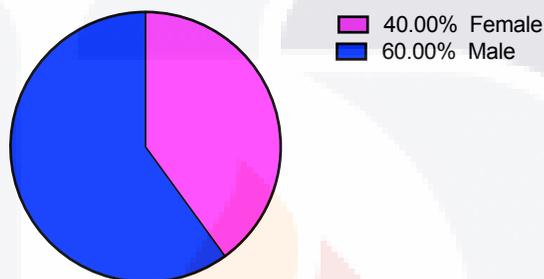
## **7.9 Métodos estadísticos**

GraphPad Prism 8.0 fue el software usado para evaluar los datos cuantitativos en este estudio. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y las gráficas muestran los promedios y desviaciones estándar. La presencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ )\* ( $P \leq 0.001$ )\*\*\* en los resultados del ensayo MTT fueron analizados y comparados con sus controles usando la prueba de comparación múltiple de Tukey's. El ensayo de Liberación de LDH se evaluó usando la prueba de comparación múltiple ANOVA de dos vías y comparación múltiple de Tukey's ( $P \leq 0.05$ )\*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Características de los pacientes donadores

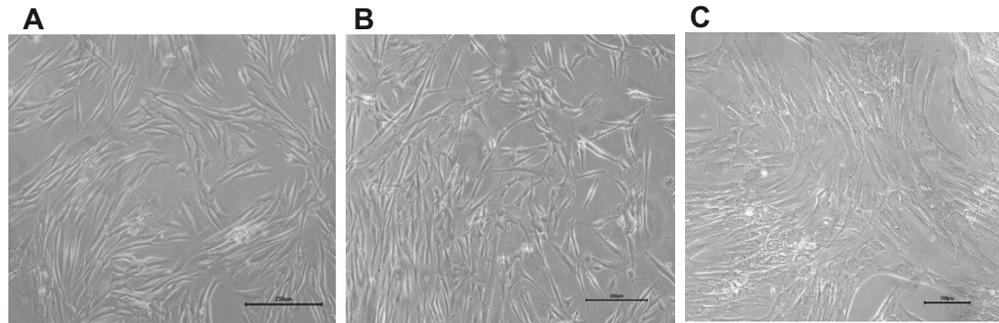
Los donadores que participaron en este estudio, fueron pacientes atendidos por cirugía de terceros molares en la Unidad Biomédica de la UAA. De éstos el 40% fueron del género femenino, en tanto que el 60% fueron masculinos y sus edades flucturaron entre los 16 y 24 años (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución por género de los pacientes donadores de terceros molares.

### 8.2 Establecimiento de los cultivos celulares primarios

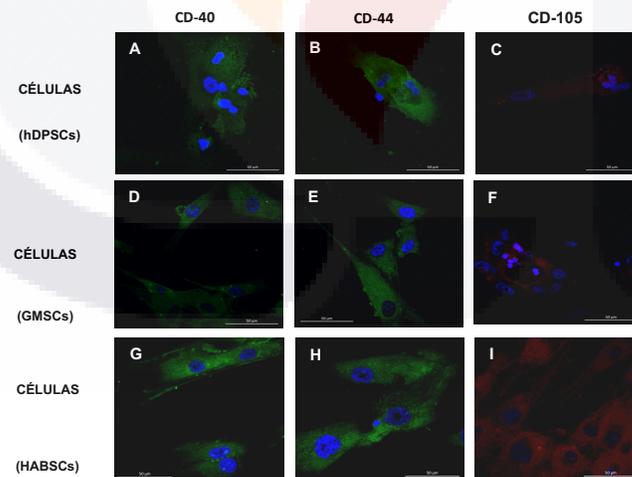
El comportamiento *in vitro* de las células mesenquimales derivadas de pulpa dental, tejido gingival y cresta ósea alveolar en cultivo primario aisladas, formaron colonias adherentes a partir de las primeras 24 horas de cultivo. Las células aisladas mostraron una morfología elongada, y estrellada, con contornos poligonales, fusiformes y agrupados en colonias. A partir de las 72 horas de ser cultivadas, se observaron poblaciones celulares más homogéneas, con características semejantes a fibroblastos con extensiones citoplasmáticas, núcleos ovalados y ubicados en la parte central. Como se muestra en la Figura 2, los diferentes cultivos celulares alcanzaron una confluencia >80% a los 28 días posteriores a su establecimiento.



**Figura 2.** Cultivos celulares con >80% de confluencia posterior a 28 días de establecimiento (20X). A. Células de tejido pulpar (Bar=250 µm). B. Células de tejido gingival (Bar=250 µm). C. Células de cresta ósea alveolar (Bar=300 µm).

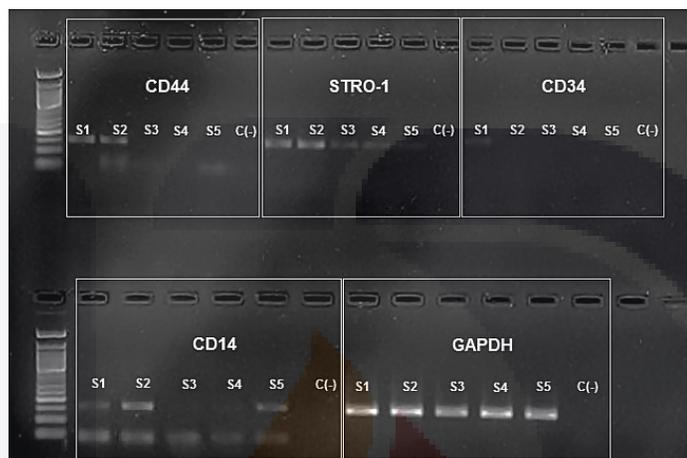
### 8.3 Inmunofenotipificación

El análisis del fenotipo de mesenquimalidad quedó demostrado por el ensayo de inmunocitofluorescencia en las células de tejido pulpar, gingival y de cresta ósea alveolar, ya que expresaron la presencia de los marcadores de superficie: CD40, CD44 y CD105 (Figura 3).



**Figura 3.** Inmunocitofluorescencia con la expresión de Marcadores de Mesenquimalidad en las células de pulpa dental, tejido gingival y de cresta ósea alveolar. A, D, G. CD-40 con FITC-Hoechst; B, E, H. CD-44 con FITC-Hoechst; C,F,I, CD-105 con Alexa 568-Hoechst. (Bar=50 µm).

Asimismo, y como se observa en la Figura 4, en el ensayo de RT-PCR realizado a las células de pulpa dental se observó la expresión de los marcadores CD14, CD44 y STRO-1. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 3 (Kanafi *et al.*, 2013)<sup>90</sup>.



**Figura 4.** RT-PCR. Análisis de expresión de CD de marcadores de pluripotencialidad (CD44, STRO-1, CD34, CD14) en muestras de células de tejido pulpar. El GAPDH se utilizó como gen constitutivo. S = Muestras. C (-) = Control negativo.

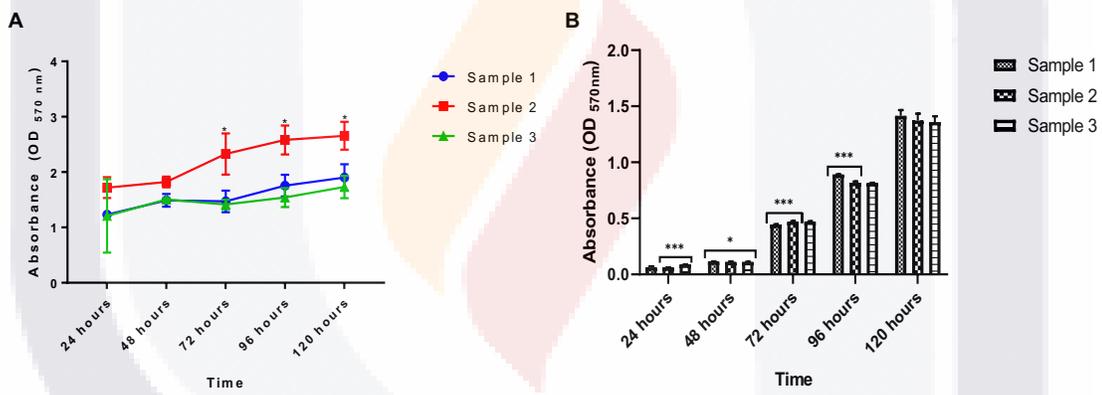
**Tabla 3**

Resultados de la expresión de genes de los marcadores de superficie (CD) de mesenquimalidad en las células de pulpa dental (hDPSC) mediante RT-PCR. (+) Marcador positivo para hDPSC. (-) Marcador negativo para hDPSC. (S) Muestra.

CDs	Marcador esperado (Kanafi <i>et al.</i> , 2013) <sup>90</sup>	S1	S2	S3	S4	S5
CD14	-	+	+	+	+	+
CD34	-	+	-	-	-	-
CD44	+	+	+	+	-	+
STRO-1	+	+	+	+	+	+

### 8.4 Ensayo de proliferación celular

El recuento celular a través de ensayo de exclusión de colorante vital se realizó en los cultivos a partir del pase 0 hasta el pase 3 en 3 muestras diferentes de células pulpares, gingivales y de cresta ósea alveolar que alcanzaron una confluencia relativamente superior al 80% en un período de 28 días de cultivo *in vitro*. El crecimiento celular observado por la curva de crecimiento mostró un comportamiento normal y estable en las fases de latencia, logarítmica y estacionaria. Como se muestra en la Figura 5, se observa el comportamiento de la proliferación celular de las células de pulpa dental y de cresta alveolar ósea evaluada mediante el ensayo MTT, donde se observó que las tasas de crecimiento en los diferentes cultivos fueron en aumento durante el periodo de seguimiento de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey's ( $p < 0,05$ ) \* ( $p < 0,001$ ) \*\*\*.

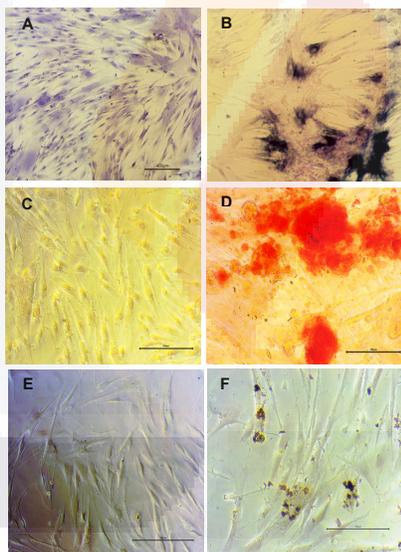


**Figura 5.** Ensayo de proliferación celular por MTT con un seguimiento de 24, 48, 72, 96 y 120 horas. A. Células mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSCs). B. Células mesenquimales de cresta alveolar humana (HABMSCs). Los recuentos se realizaron por triplicado y se muestra la desviación estándar de los mismos. ( $p \leq 0,05$ ) \* ( $p \leq 0,001$ ) \*\*\*.

## 8.5 Evaluación de la capacidad pluripotencial de diferenciación de las células mesenquimales obtenidas a partir de tejidos dentales humanos

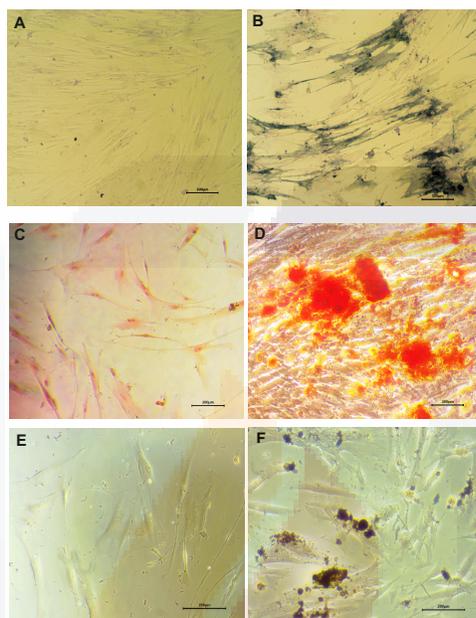
### 8.5.1 Diferenciación osteoblástica

Con el empleo del medio osteodiferenciador, se logró inducir un proceso de diferenciación de las células mesenquimales derivadas de pulpa dental hacia un linaje osteoblástico posterior al tratamiento durante 21 días, realizando cambio de medio en dos ocasiones por semana. Como se demuestra en la Figura 6, posterior al tratamiento y con la aplicación de la tinción de la fosfatasa alcalina (ALP), se observó la actividad enzimática con la presencia de fosfatos en color morado lila. De igual manera con las tinciones de rojo de Alizarina y Vonkossa, se mostró la detección de sales de calcio, las cuales se tiñeron en color rojo y café oscuro respectivamente.



**Figura 6.** Diferenciación osteoblástica de hDPSCs demostrada con los métodos de tinción de Fosfatasa Alcalina (ALP), Rojo de Alizarin y Vonkossa. B. Tinción del incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (flechas negras) (20X) (Bar=400  $\mu$ m). D. Presencia de cristales de calcio a través de la tinción de Alizarin Red S (flechas negras) (20X) (Bar=100  $\mu$ m). F. Presencia de cristales de calcio mediante la tinción de Vonkossa (flechas negras) (20X) (Bar=100  $\mu$ m). (A, C, E) Controles.

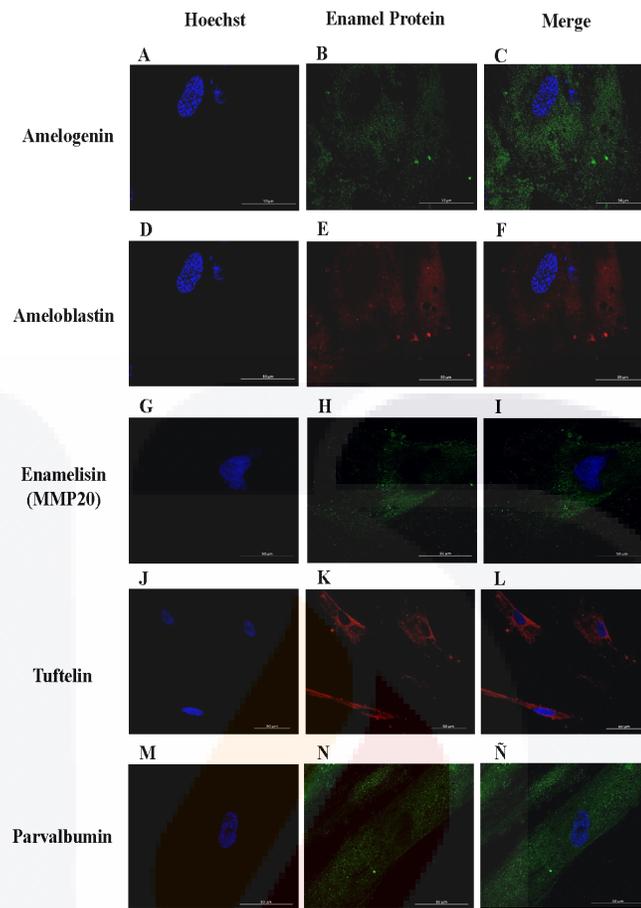
Empleando placas de cultivo forradas con Matriz Extracelular de cerdo, se obtuvo la diferenciación de GMSCs hacia un linaje osteoblástico, donde se demostró a través de tinciones, la presencia de cristales de fosfato y de calcio respectivamente (Figura 7).



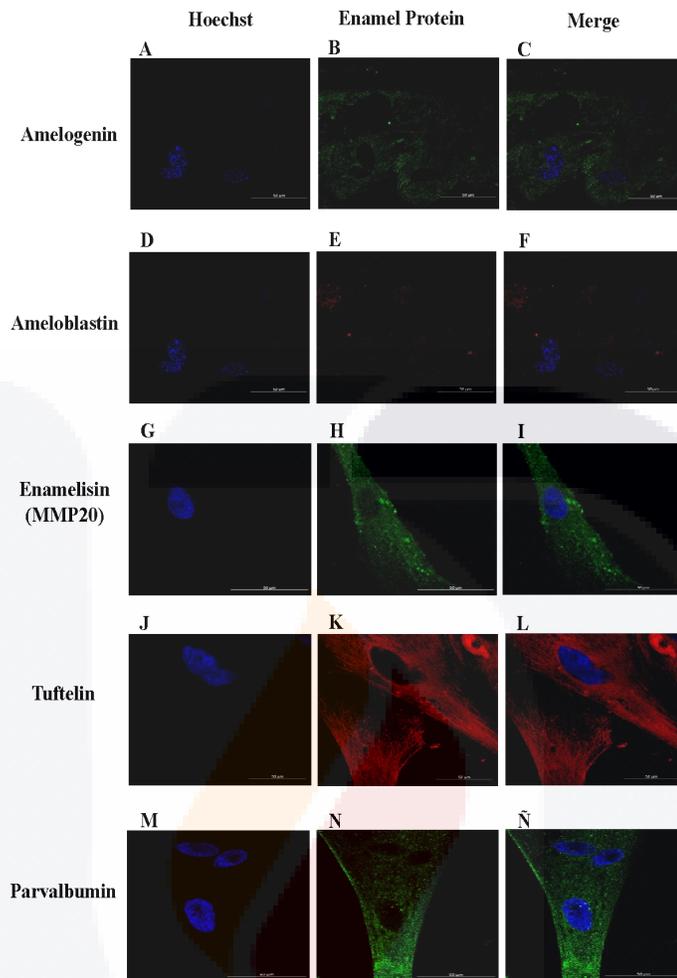
**Figura 7.** Diferenciación osteoblástica de GMSCs demostrada con los métodos de tinción de Fosfatasa Alcalina, Rojo de Alizarin y Vonkossa. B. Tinción del incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (flechas negras) (20X) (Bar=300  $\mu$ m). D. Presencia de cristales de calcio a través de la tinción de Alizarin Red S (flechas negras) (20X) (Bar=300  $\mu$ m). F. Presencia de cristales de calcio mediante la tinción de Vonkossa (flechas negras) (20X) (Bar=200  $\mu$ m). (A, C, E) Controles.

### 8.5.2 Diferenciación ameloblástica

La capacidad pluripotencial de las hDPSCs para dar origen a células de diferente origen embrionario, además de las propias del mesodermo, quedó demostrado, ya que con el empleo de gel de matriz extracelular de piel de cerdo y tendón de cola de rata como medios de inducción para la diferenciación ameloblástica, se logró la estimular la expresión de proteínas del esmalte dental, que como se sabe, es de origen neuro-ectodérmico (Figuras 8 y 9).



**Figura. 8.** Inmunocitofluorescencia y análisis con microscopía confocal de la expresión de proteínas del esmalte dental en hDPSC tratadas con gel de matriz extracelular de piel de cerdo. (A, D, G, J, M) Contraintinción nuclear celular con Hoechst. (B) Detección de amelogenina con Alexa Fluor® 488. (E) Detección de ameloblastina con Alexa Fluor® 594. (H) Detección de enamelinina con Alexa Fluor® 488. (K) Detección de Tuftelina con Alexa Fluor® 594. (N ) Detección de parvalbúmina con Alexa Fluor® 488. (C, F, I, L, O) Merge: Anticuerpo-Hoechst. Bar = 50  $\mu$ m.



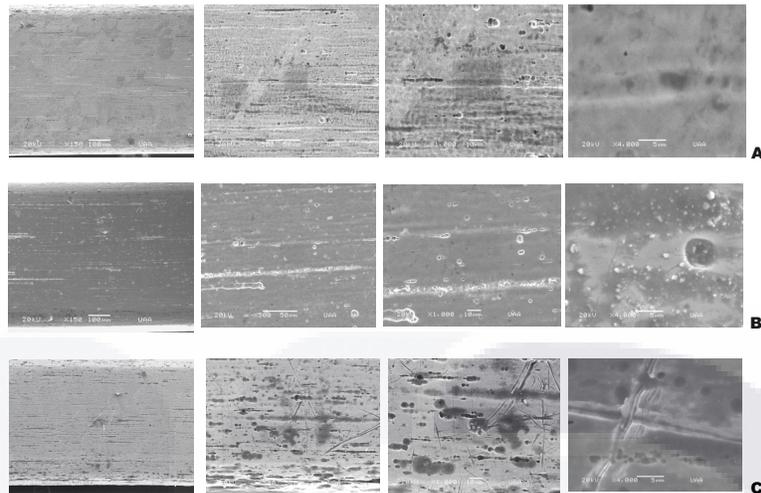
**Figura 9.** Inmunocitofluorescencia y análisis con microscopía confocal de la expresión de proteínas del esmalte dental en hDPSC tratadas con gel de matriz extracelular de tendón de cola de rata. (A, D, G, J, M) Contraintinción nuclear celular con Hoechst. (B) Detección de amelogenina con Alexa Fluor® 488. (E) Detección de ameloblastina con Alexa Fluor® 594. (H) Detección de enamelisina con Alexa Fluor® 488. (K) Detección de Tuftelina con Alexa Fluor® 594. (N ) Detección de parvalbúmina con Alexa Fluor® 488. (C, F, I, L, O) Merge: Anticuerpo-Hoechst. Bar = 50  $\mu$ m.

## **8.6 Obtención de los productos de la corrosión de Níquel-Titanio (Ni-Ti) de biomateriales usados en el área de odontología**

Producto del proceso de envejecimiento *in vitro* de los biomateriales de uso odontológico (arcos dentales de ortodoncia), se obtuvieron las concentraciones de iones de níquel y titanio que pueden ser liberados emulando la posible condición que se puede presentar en cavidad bucal cuando son usados por los pacientes.

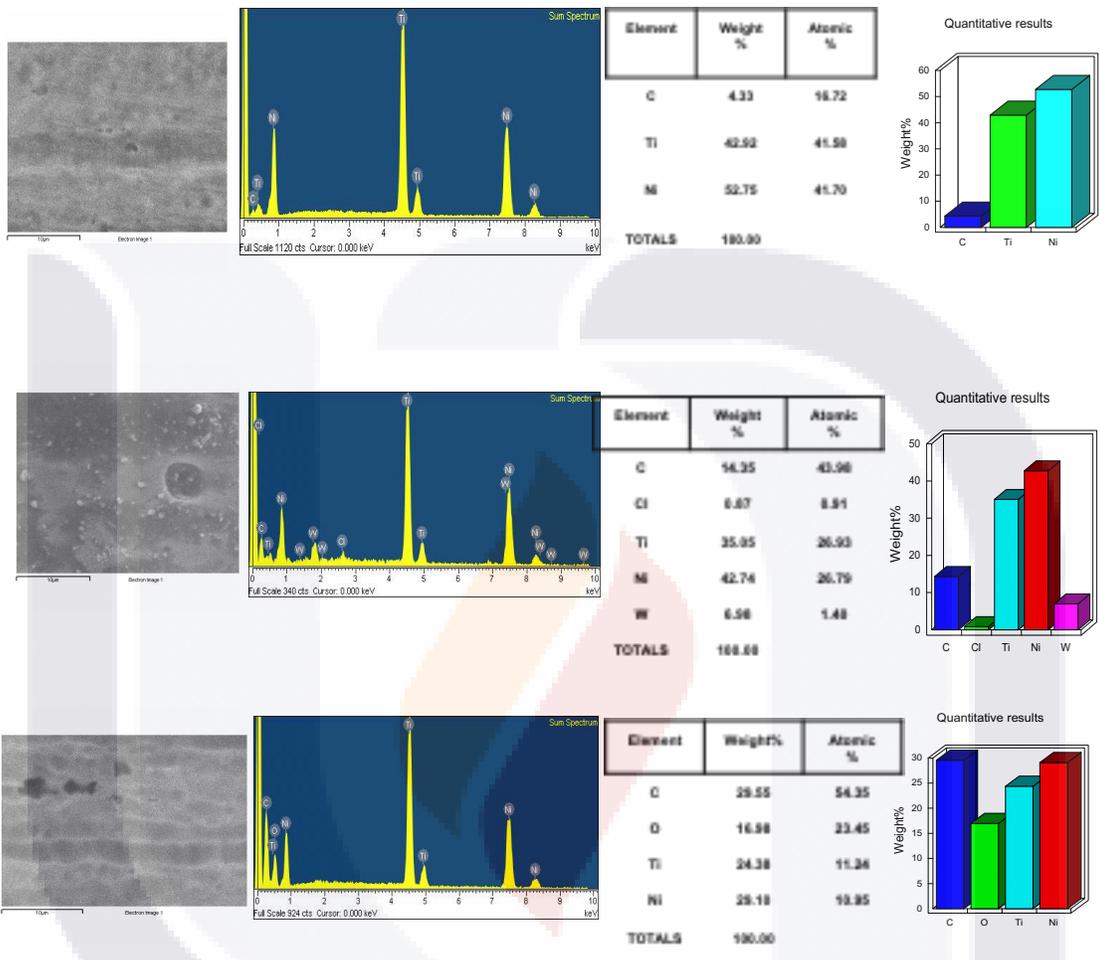
### **8.6.1 Análisis de biomateriales por microscopía electrónica de barrido (MEB) y Espectrometría de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS-Rx)**

A través de MEB y EDS-Rx, se demostraron cambios significativos en la superficie de los arcos así como en su composición original, lo anterior producto de procesos de envejecimiento ya sea *in vitro* o *in vivo*. En el análisis de superficies por MEB, se observó que a pesar de presentar imperfecciones en los arcos nuevos, posterior al uso clínico o de envejecimiento *in vitro*, se presentó un tipo de corrosión por picaduras o grietas, así como del tipo por fricción (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a diferentes aumentos (150X; 500X; 1000X; 4000X) de la superficie de segmentos de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 7.2 (fisiológico). Se observa la presencia de picaduras o grietas que se hacen más evidentes a un mayor aumento (flechas negras). C. Arcos usados por pacientes en tratamientos de ortodoncia durante 28 días. Obsérvese la presencia de aparente corrosión tipo picadura y por fricción (flechas negras). (Bar=100  $\mu\text{m}$ ; 50  $\mu\text{m}$ ; 10  $\mu\text{m}$ ; 5  $\mu\text{m}$ ).

Como se presenta en la Figura 11, al analizar los componentes estructurales de los arcos dentales de ortodoncia por EDS-Rx, se observó que existe una pérdida de los componentes de Níquel y Titanio una vez que los arcos se someten a envejecimiento *in vitro* así como cuando son usados por pacientes en tratamientos de ortodoncia. El porcentaje de pérdida del Titanio tratados *in vitro*, correspondió a 7.87%, en tanto que por el uso clínico fue de 18.54%. Respecto al Níquel, el envejecimiento *in vitro* permitió la liberación del 10% del componente total, en tanto que por el uso clínico se liberó 23.65%.

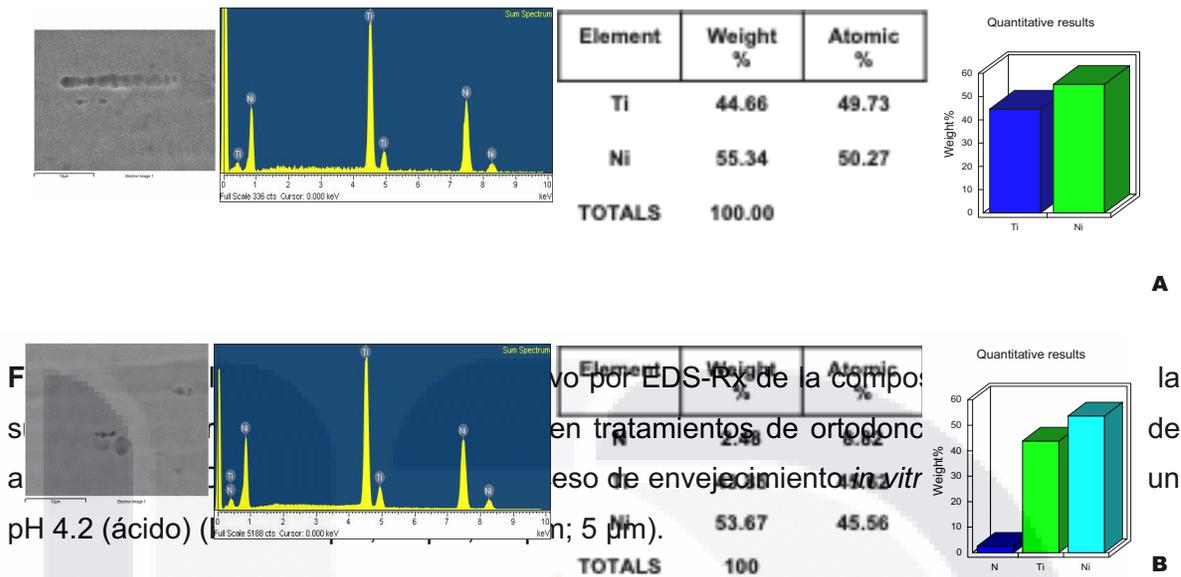


**Figura 11.** Análisis cuantitativo y cualitativo por EDS-Rx de la composición química de la superficie de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 7.2 (fisiológico). C. Arcos usados por pacientes en tratamiento de ortodoncia durante 28 días.

Con la variación a un pH ácido de la solución de envejecimiento *in vitro*, se observó con el análisis por MEB que también se presentó corrosión tipo picadura en la superficie de los arcos, situación que permite deducir que el factor pH favorece mayormente la presencia de corrosión en este tipo de biomateriales (Figura 12). Esta situación se comprobó con el análisis de EDS-Rx, donde se pudo observar que existió principalmente la pérdida de iones de Níquel de 1.67% del total observado en la muestra control (Figura 13).



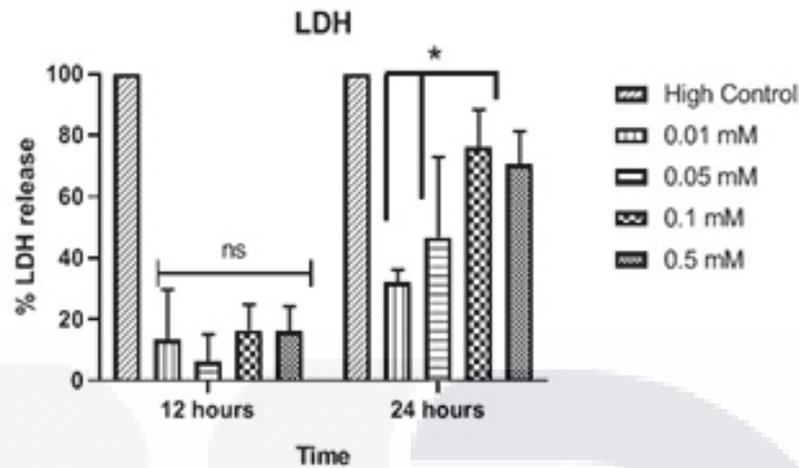
**Figura 12.** Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a diferentes aumentos (150X; 500X; 1000X; 4000X) de la superficie de segmentos de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 4.2 (ácido). Se observa la presencia de picaduras o grietas que se hacen más evidentes a un mayor aumento (flechas negras).(Bar=100 μm; 50 μm; 10 μm; 5 μm).



**Figura 13.** Análisis cuantitativo y cualitativo por EDS-Rx de la composición química de la superficie de arcos dentales empleados en tratamientos de ortodoncia. A. Superficie de arcos nuevos (Control). B. Arcos con proceso de envejecimiento *in vitro* de 28 días con un pH 4.2 (ácido) (5 µm).

**8.7 Evaluación del efecto citotóxico del Cloruro de Níquel (NiCl<sub>2</sub>) sobre células de cresta ósea alveolar medido por el ensayo de liberación de LDH**

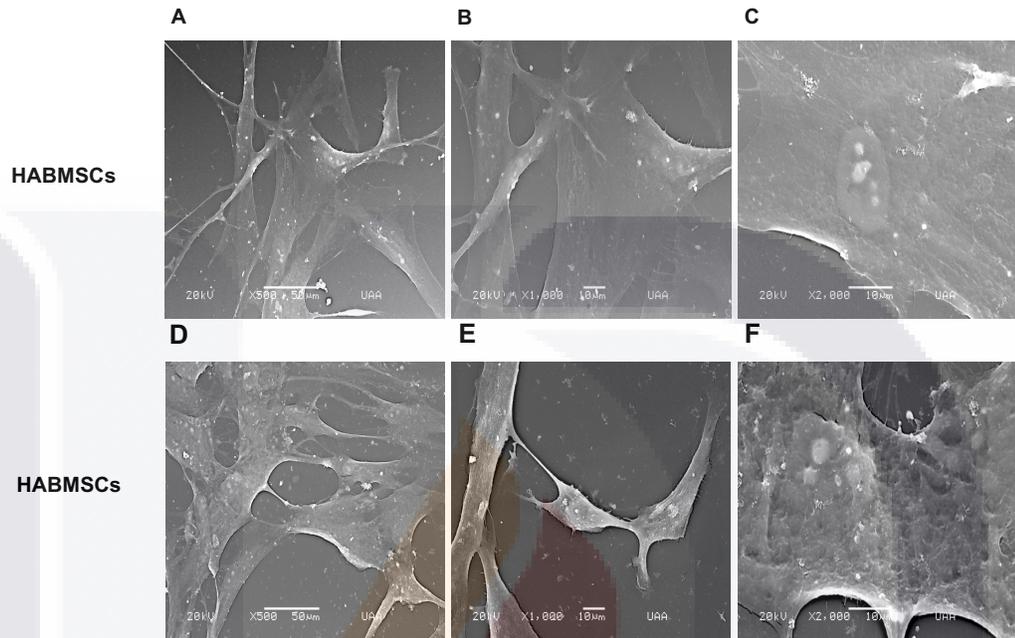
La presencia de LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las células mesenquimales de cresta ósea alveolar, reveló el daño citotóxico que se provoca en la integridad de la membrana celular posterior al tratamiento con NiCl<sub>2</sub>, el cual fue dependiente del tiempo y de la concentración empleada comparada con las células no tratadas. De acuerdo a la prueba de comparación múltiple ANOVA de dos vías y la de comparación múltiple de Tukey's, las concentraciones de 0.01 mM, 0.05 mM y 0.1 mM presentaron diferencias estadísticamente significativas después de 24 h de tratamiento  $p \leq 0,05$  \* en comparación con el *high control* en términos de la LDH liberada (Figura 14).



**Figura 14.** Daño celular medido por liberación de LDH en HABMSCs tratadas con diferentes concentraciones de  $\text{NiCl}_2$  (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mM) durante 12 h y 24 h. Se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas de tratamiento a concentraciones 0.01 mM, 0.1 mM y 0.5 mM en comparación con el *high control* alto según ANOVA de dos vías y pruebas de comparación múltiple de Tukey's ( $p \leq 0,05$ ) \*.

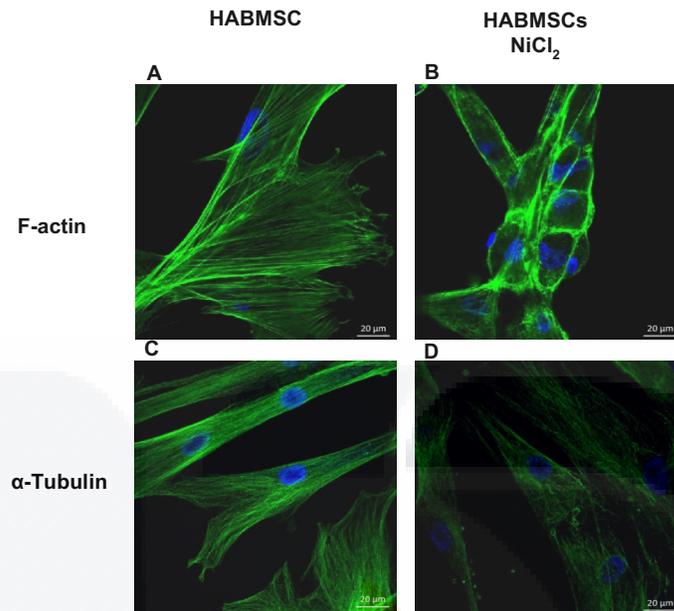
### 8.8 Evaluación de los cambios morfológicos en células mesenquimales de cresta ósea alveolar por exposición a $\text{NiCl}_2$

A través de MEB, se observaron cambios morfológicos en las HABMSCs tratadas con 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h, en comparación con las células control sin tratamiento, ya que mostraron una contracción de la morfología alargada propia y la presencia de pérdida de contacto entre las células. El aspecto normal del citoplasma celular presentó cambios, mostrando pérdida de uniones intercelulares al ser expuestas las células  $\text{NiCl}_2$  (Figura 15).



**Figura 15.** Análisis por MEB de HABMSCs expuestas a  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. A,B,C. Células control. D, E, F. HABMSCs con tratamiento de 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h (Bar=50  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ ).

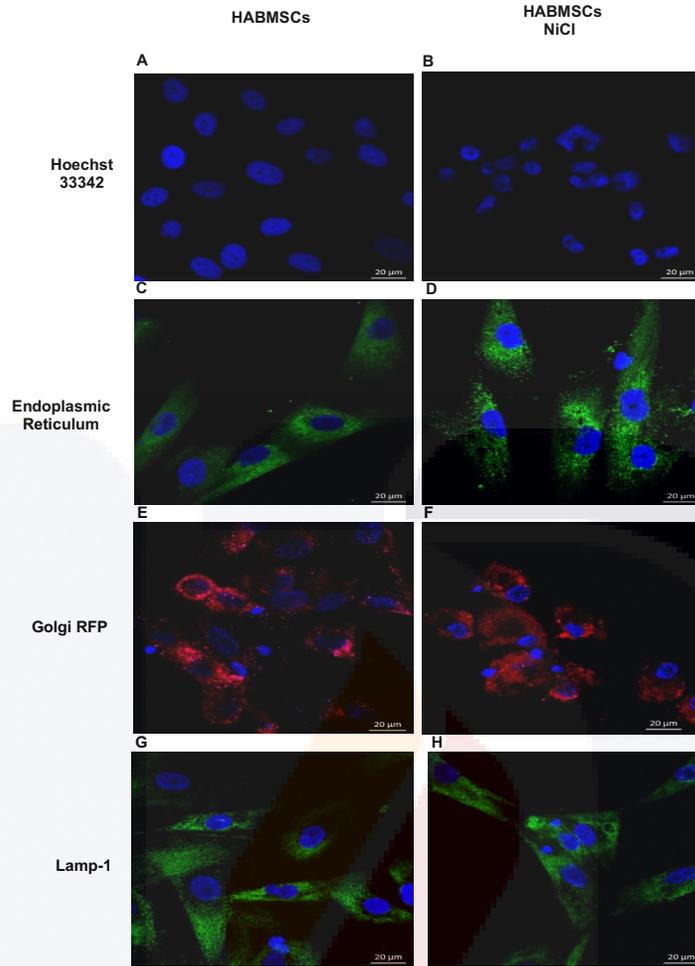
El marcaje para citoesqueleto de actina filamentosa, mostró una redistribución de F-actina acompañada de la pérdida de fibras de estrés, en comparación con el control. (Figura 16 A-B). Además, el  $\text{NiCl}_2$  generó alteraciones y cambios en la organización celular de la  $\alpha$ -tubulina (Figura 16 C-D).



**Figura 16.** Inmunicitofluorescencia por microscopía confocal del citoesqueleto de HABMSCs con tratamiento 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. A. Morfología del citoesqueleto de F-actina en células de control. B. Las células tratadas con  $\text{NiCl}_2$  mostraron desintegración de los filamentos de F-actina con redondeo celular y alteración general de la morfología (flechas blancas). C. Morfología del citoesqueleto de  $\alpha$ -tubulina en células control. D. Las células tratadas mostraron desorganización, rotura y fragmentación del citoesqueleto de  $\alpha$ -tubulina (flechas blancas). Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

En cuanto al daño en los organelos celulares, el análisis mostró alteración en la distribución del contenido de los núcleos con presencia de cromatina condensada y fragmentación nuclear, representando una aparente señal apoptótica de los mismos (Figura 17 A-B). En las células tratadas, el retículo endoplásmico presentó una distribución citoplásmica no homogénea (Figura 17 C-D).

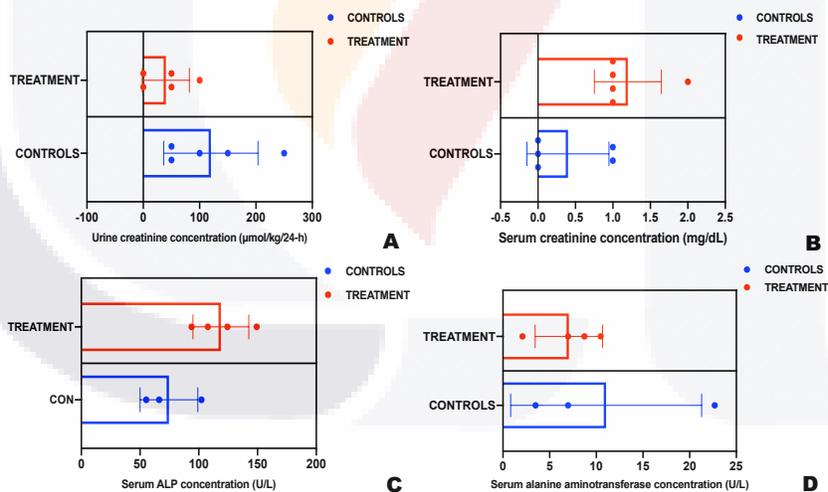
Respecto al aparato de Golgi y dada la contracción en la morfología adoptada por las células tratadas, se observó pérdida de la localización perinuclear uniforme observado en las células control (Figura 17 E-F). Además, respecto al análisis del marcador celular Lamp-1, no mostró cambios evidentes en las células tratadas en comparación con las células control (Figura 17 G-H).



**Figura 17.** Análisis de inmunocitofluorescencia con microscopía confocal para la detección del daño de organelos celulares en HABMSCs después del tratamiento con 2 mM de  $\text{NiCl}_2$  durante 24 h. A. Morfología de núcleos en las HABMSCs control. B. Células con tratamiento que muestran cambios en la apariencia de núcleos con fragmentación de material nuclear con signos apoptóticos (flechas blancas). C. Distribución del retículo endoplásmico en células control. D. Retículo endoplásmico en HABMSCs con tratamiento mostrando pérdida de su distribución uniforme (flechas blancas). E. Distribución del aparato de Golgi en las HABMSCs control. F. Células con tratamiento donde se observa pérdida de localización perinuclear del aparato de Golgi (flechas blancas). G. Distribución de Lamp-1 en las células control. H. HABMSCs con tratamiento mostrando falta de cambios aparentes en la distribución de Lamp-1. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

### 8.9 Evaluación del efecto de los productos de la corrosión de Ni-Ti liberados de biomateriales usados en el área de odontología en Modelo Animal (Rata Wistar)

Los productos de la corrosión liberados posterior al proceso de envejecimiento de los arcos dentales de ortodoncia, concentrados en las soluciones empleadas para tal propósito, alcanzaron una concentración final de 19.92  $\mu\text{g/L}$  de Níquel estimada mediante espectrofotómetro de absorción atómica. El efecto toxicológico de la solución fue estimado a través del daño hepático y renal presentado por las ratas Wistar que la consumieron. Los resultados obtenidos mostraron que los valores de creatinina no presentaron alteración de los valores normales que para el suero es de 1.3 mg/dL y en orina es de 177  $\mu\text{mol/kg/24-h}$ . Así mismo, no se presentó afectación de los valores de la fosfatasa alcalina cuyo valor de referencia es 115U/L y de la enzima alanina-aminotransferasa es de 41U/L, mostrando que el funcionamiento hepático no presentó daño en los sujetos de estudio posterior al consumo de la solución (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de los resultados de las pruebas realizadas en orina de 24 horas y suero de ratas Wistar que consumieron los productos de la corrosión de Ni-Ti, liberados por biomateriales de uso odontológico (arcos dentales de ortodoncia) posterior al envejecimiento *in vitro*. A. Concentración de creatinina en orina. B. Concentración de creatinina en suero. C. Concentración de fosfatasa alcalina (ALP) en suero. D. Concentración de alanino-aminotransferasa en suero.

## 9. DISCUSIÓN

Los estudios de biocompatibilidad de las aleaciones metálicas permiten evaluar su capacidad para inducir respuestas en tejidos vivos, la muerte celular, formación de tumores, daño genético, así como respuestas inmunitarias<sup>7</sup>.

En el campo de la salud, las aleaciones metálicas de Níquel-Titanio (Ni-Ti) son de las más empleadas, ya que presentan características y propiedades adecuadas para cumplir sus funciones terapéuticas dentro del organismo, entre las que se mencionan: gran biocompatibilidad, memoria de forma, super-elasticidad, valores mecánicos cercanos al tejido óseo, resistencia a la corrosión y a la humedad<sup>10</sup>.

La resistencia a la corrosión ha sido muy controversial, dado que los dispositivos médicos fabricados con dicha aleación, se colocan en ambientes húmedos y por lo tanto, es factible que se desarrolle corrosión con la consecuente liberación de iones como el Ni y sus productos, el cual se ha reportado tener propiedades tóxicas, alergénicas, inflamatorias y carcinogénicas<sup>27</sup>.

Evidentemente la liberación de Níquel y sus efectos citotóxicos ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, sigue siendo controvertido si la cantidad liberada es lo suficientemente amplia para ser clínicamente relevante, lo cual depende de las variables clínicas individuales y las características del proceso de producción y composición química de las aleaciones<sup>84</sup>.

A pesar de lo anterior, existe la posibilidad de que las concentraciones liberadas no sean suficientemente tóxicas, aunque no se descarta que puedan provocar efectos biológicos en las células con las que están directamente en contacto<sup>91</sup>.

En el presente trabajo, se realizaron pruebas de biocompatibilidad inicial donde se emplearon cultivos primarios de células mesenquimales derivadas de tejidos como la pulpa dental, tejido gingival y cresta ósea alveolar, las cuales mostraron una viabilidad y proliferación estables<sup>92,93</sup> y fueron usadas para exponerlas a iones de  $\text{NiCl}_2$  *in vitro*, describiendo los posibles efectos que ocurren en condiciones microscópicas y clínicas reales. Su origen mesenquimal fue demostrado, ya que una vez cultivadas adoptaron una morfología típica,

presentaron auto-renovación y propiedades de proliferación<sup>10</sup>, así como la expresión de marcadores de superficie de mesenquimalidad como previamente se ha reportado<sup>94-96</sup>.

Esta última condición permitió demostrar la capacidad de diferenciación que presentan las células, ya que con el uso de un medio de cultivo inductor se logró una diferenciación de las células de pulpa dental hacia un linaje osteoblástico<sup>52</sup>. Además de lo anterior, y gracias al empleo de andamios naturales derivados de matriz extracelular de cerdo, que se ha reportado está compuesta de proteoglicanos, biomoléculas y proteínas específicas como la fibronectina, vitronectina, varios tipos de colágena, etc., y permite el desarrollo, proliferación y diferenciación celular<sup>97</sup>, se logró inducir hacia una diferenciación osteogénica a las células mesenquimales de tejido gingival.

En este mismo sentido, el presente trabajo demostró la capacidad pluripotencial que presentan las células de pulpa dental para expresar proteínas específicas de esmalte dental como la amelogenina, ameloblastina, tuftelina, enamelinina y parvalbumina, las cuales juegan un rol determinante en la amelogenesis mediante procesos de diferenciación<sup>98,99</sup>. Lo anterior se obtuvo a través de la generación de un andamio natural fabricado con un gel de matriz extracelular de piel de cerdo y de tendón de cola de rata, los cuales han sido ampliamente usados en la ingeniería de tejidos en el campo de la odontología<sup>100-103</sup>.

Las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* se realizan con un material o un extracto de éste que se pone en contacto con un sistema biológico<sup>104</sup>. En el presente estudio se estimó el daño celular generado por el NiCl<sub>2</sub> en células mesenquimales de cresta ósea alveolar. Empleando el ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH), se demostró la afectación de la integridad de la membrana celular, la cual fue dependiente del tiempo y concentración usadas, situación que coincide con otros resultados que han sido reportados<sup>85,86</sup>.

Dado que los efectos biológicos de los iones liberados de los dispositivos médicos fabricados con aleaciones metálicas pueden ser potenciados por contacto celular directo, en los resultados del presente estudio por MEB, la exposición *in vitro*

de las HABMSCs al NiCl<sub>2</sub>, demostró el daño en la proliferación, morfología e integridad de las células y núcleos<sup>83-85</sup>.

El citoesqueleto participa en el mantenimiento de la morfología, adhesión, crecimiento y señalización celulares. Los cambios en el citoesqueleto ocurren en respuesta a estímulos mecánicos externos. Uno de sus componentes es la F-actina, la cual determina las propiedades mecánicas de las células vivas<sup>105</sup>. El efecto toxicológico producido por el Ni, indujo alteración del citoesqueleto. Las células adoptaron formas redondeadas asociadas a los cambios en el citoesqueleto de actina, afectándose funciones como la motilidad, resistencia mecánica y el transporte celular<sup>26,106,107</sup>. Los cambios en el citoesqueleto de tubulina han sido reportados que inducen alteración en la organización interna y por lo tanto afectar el ciclo celular normal<sup>106,108</sup>.

Los resultados mostraron alteración en la forma y contenido de los núcleos celulares, lo cual puede estar asociado con la presencia de señales apoptóticas<sup>109-112</sup>. De igual manera, se pudo observar la presencia de alteración en la distribución del retículo endoplásmico con una posible afectación de sus funciones como la síntesis, plegamiento y translocación de proteínas, lo cual influye en la viabilidad celular y desencadena un proceso de apoptosis<sup>9,112,113</sup>. El aparato de Golgi también mostró cambios, lo que sugiere la interrupción de las vías del tráfico celular debido a su relación con el retículo endoplásmico y su participación en la glicosilación, sulfatación y fosforilación de proteínas, como informan otros autores<sup>9,112-115</sup>.

Dentro de los requisitos para el empleo de los biomateriales en los tratamientos médicos, principalmente los elaborados con aleaciones metálicas, juega un papel importante su resistencia a la corrosión y al desgaste<sup>10</sup>. Específicamente el empleo de dispositivos fijos fabricados con aleaciones metálicas de Níquel-Titanio para el tratamiento de las maloclusiones dentales, es un método terapéutico de gran aplicación en la ortodoncia moderna. Los arcos dentales de Ni-Ti son de los más empleados y están estructuralmente compuestos de un 55% de níquel y 45% de titanio<sup>116</sup>.

A pesar de contar con gran biocompatibilidad, el permanecer largos periodos en contacto con otros materiales de ortodoncia, sumado a las condiciones propias

de la cavidad oral, se ven sometidos a un proceso de biodegradación por los constantes cambios químicos, mecánicos, térmicos, microbiológicos y enzimáticos, trayendo consigo la formación de productos de la corrosión<sup>82,117</sup>. A pesar de que las pruebas *in vitro* realizadas para evaluar la cantidad de iones liberados no reflejan una condición real de un tratamiento de ortodoncia en cavidad bucal, permiten identificar la susceptibilidad de los biomateriales a presentar corrosión<sup>116,118</sup>.

En este estudio, los resultados obtenidos con MEB demostraron que las superficies de los arcos dentales de ortodoncia empleados sufrieron cambios con la aparición de corrosión tipo picadura posterior al proceso de envejecimiento *in vitro* por 28 días en solución fisiológica al 0.9%, tanto con un pH fisiológico de 7.2 como de un pH ácido de 4.2, situación que coincide con otros autores<sup>76,116,119</sup>.

Las diversas marcas de arcos dentales varían en cuanto a los materiales y su cantidades empleados para su fabricación<sup>116</sup>. En el caso del presente estudio, los resultados del análisis por EDS-Rx demostraron cambios significativos en cuanto a la cantidad de componentes estructurales de fábrica y posterior al proceso de envejecimiento *in vitro*, además del comparativo que se hizo de los arcos usados en pacientes con tratamiento de ortodoncia. Lo anterior podría ser considerado como un indicador de la susceptibilidad de la marca para presentar procesos de corrosión en ambientes húmedos y con variaciones del pH<sup>76,77,117</sup>.

El efecto toxicológico del consumo de los productos de la corrosión de los biomateriales envejecidos *in vitro* en el modelo animal de rata Wistar, aparentemente no mostró alteración en las pruebas de laboratorio para estimar un posible daño hepático y renal. Lo anterior puede explicarse dado que el tiempo de exposición fue corto y la cantidad de elementos tóxicos como el níquel, no sobrepasaban la cantidad de ingesta diaria de consumo en humanos que se ha estimado es de 200-300  $\mu\text{g}/\text{Ni}$  por día<sup>82</sup>, como lo han reportado otros autores<sup>120,121</sup>.

## 10. CONCLUSIONES

En las últimas décadas se ha observado un interés creciente por conocer los niveles de biocompatibilidad que presentan los biomateriales fabricados con metales y que se usan en los tratamientos médico-odontológicos. A partir de lo anterior y como producto de la presente tesis, se puede concluir lo siguiente:

1. Con el establecimiento de cultivos celulares primarios de células mesenquimales derivados de tejidos dentales, se comprobaron sus propiedades de proliferación, autorenovación y pluripotencialidad, ya que además de demostrar su origen mesenquimal a través de la expresión de marcadores y genes específicos, se logró inducir su diferenciación hacia linaje ameloblástico y osteoblástico en células de pulpa dental y tejido gingival.
2. La exposición *in vitro* de HABMSC a iones  $\text{NiCl}_2$  a diferentes concentraciones, demostró el daño celular que los iones de níquel pueden desencadenar observado por el ensayo de LDH, el análisis SEM y la microscopía de inmunofluorescencia confocal. La inducción de estas alteraciones celulares podría producir daño tisular y fisiológico, por lo tanto son necesarios futuros estudios en este campo para describir con mayor profundidad la acción toxicológica celular que estos productos iónicos corrosivos tienen sobre diferentes modelos celulares, así como sus efectos *in vivo*.
3. El fenómeno de la corrosión fue demostrado con ensayos *in vitro* mediante procesos de envejecimiento de arcos dentales usados como aditamentos en tratamientos de ortodoncia y que de acuerdo con la información obtenida del fabricante, su elaboración es a base de aleaciones con Níquel-Titanio. Los resultados mostraron que usando solución salina, con una temperatura fisiológica de 37.5 °C, diferentes valores de pH y periodos de tiempo variables, se presentó la liberación de iones de Níquel, situación que además se comprobó en el análisis de superficies observadas a través de EDS-Rx por microscopía electrónica de barrido comparados con arcos control sin tratamiento. Esta situación emula lo que clínicamente se puede presentar

durante los tratamientos dentales donde se utilizan dichos aditamentos, ya que permanecen en cavidad bucal durante tiempos prolongados, expuestos a las condiciones de fuerzas de masticación, saliva y sus componentes, cambios de temperatura y los productos bacterianos de la placa dental. Estos elementos han sido reportados como elementos determinantes del grado de corrosión que presentan los biomateriales dentales.

4. Se ha estimado que la lixiviación de Níquel liberado por procesos de corrosión en los dispositivos usados en tratamientos dentales es de 0.14  $\mu\text{g}/\text{día}$ , representando 2143 menos cantidad que el promedio diario que se ingiere en comida o agua en los humanos (200-300  $\mu\text{g}/\text{día}$ ). Sin embargo y a pesar de que es poca la cantidad liberada a través de dispositivos médico-odontológicos, las manifestaciones clínicas de sus efectos no deben hacerse a un lado, ya que de manera inicial puede presentarse afecciones en las mucosas y tejidos circundantes donde se ubica el dispositivo, pero también mediante una exposición prolongada puede ingerirse y ser absorbido y acumulado en otros órganos del cuerpo humano. Los resultados obtenidos en este trabajo en el modelo animal con Rata Wistar a quienes se les expuso a la ingesta de productos de la corrosión de biomateriales envejecidos, no mostraron aparentemente afectación hepática y renal de acuerdo con las pruebas clínicas empleadas. Sin embargo, habría que continuar realizando estudios experimentales de carácter longitudinal con un mayor tiempo de exposición para continuar valorando estos aspectos.
5. Se sugiere continuar trabajando permanentemente en el análisis de los biomateriales fabricados con aleaciones de metales como el Ni-Ti, además de implementar un modelo de protocolo estandarizado y patentado que permita estimar la biocompatibilidad de los nuevos biomateriales mediante pruebas *in vitro* e *in vivo* y se asegure alcanzar los objetivos de los tratamientos médico-odontológicos.

## 11. REFERENCIAS

1. Sevcikova, J., & Pavkova Goldbergova, M. (2017). Biocompatibility of NiTi alloys in the cell behaviour. *Biometals*, 30(2), 163-169.
2. Mikulewicz, M., Chojnacka, K., Kochanowska, I., Dziewicka, A., Janeckzek, M., Cieplik, J.&Chroszcz, A. (2013). Cytotoxic of nickel ions for human osteoblast in the context of orthodontic treatment in humans and animals. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 164-169.
3. Amini, F., Jafari, A., Amini, P., & Sepasi, S. (2011). Metal ion release from fixed orthodontic appliances--an in vivo study. *The European Journal Of Orthodontics*, 34(1), 126-130. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjq181>
4. Michiardi, A., Engel, E., Aparicio, C., Planell, J., & Gil, F. (2008). Oxidized NiTi surfaces enhance differentiation of osteoblast-like cells. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 85A(1), 108-114. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31486>
5. M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia. (2009). Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, 54, 397-495.
6. Manam, N., Harun, W., Shri, D., Ghani, S., Kurniawan, T., Ismail, M., & Ibrahim, M. (2017). Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review. *Journal Of Alloys And Compounds*, 701, 698-715. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.01.196>
7. Festas, A, Ramos, A, Davim, J. (2019). Medical devices biomaterials – A review. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: *Journal of Materials: Design and Applications*, 234(1):218-228.
8. Department of Health and Human (2016). Services Food and Drug Administration (FDA), Center for Devices and Radiological Health. <http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm348890.pdf>. Última consulta: marzo de 2018.

9. Guo, H., Chen, L., Cui, H., Peng, X., Fang, J., & Zuo, Z. et al. (2015). Research Advances on Pathways of Nickel-Induced Apoptosis. *International Journal Of Molecular Sciences*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.3390/ijms17010010>
10. Markhoff, J., Krogull, M., Schulze, C., Rotsch, C., Hunger, S., & Bader, R. (2017). Biocompatibility and Inflammatory Potential of Titanium Alloys Cultivated with Human Osteoblasts, Fibroblasts and Macrophages. *Materials*, 10(1), 52. <https://doi.org/10.3390/ma10010052>
11. Cova, J.L. (2010). Biomateriales Dentales. Colombia: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamericanas (AMOLCA).
12. Matusiewicz, H. (2014). Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles – A systematic analytical review. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2379-2403. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.027>
13. Wataha J. (2000). Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*;83:223-34.
14. De Harfin, J. F. (2005). Tratamiento Ortodóntico en el Adulto. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
15. Kaplan A., De Harfin J.F. (2010). Biodesintegración de aparatología ortodóntica metálica. *Revista de la Facultad de Odontología (UBA)*, 25 (58), 17-20.
16. House, K., Sernetz, F., Dymock, D., Sandy, J., & Ireland, A. (2008). Corrosion of orthodontic appliances—should we care?. *American Journal Of Orthodontics And Dentofacial Orthopedics*, 133(4), 584-592. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2007.03.021>
17. Pound, B. (2014). Corrosion behavior of metallic materials in biomedical applications. I. Ti and its alloys. *Corrosion Reviews*, 32(1-2), 1-20. <https://doi.org/10.1515/correv-2014-0007>
18. Velnar, T., Bunc, G., Klobucar, R., & Gradisnik, L. (2016). Biomaterials and host versus graft response: A short review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(2), 82–90. <http://doi.org/10.17305/bjbms.2016.525>.

19. Villegas, Á.; Naranjo, E., Gómez, D. (2008). Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura. *Revista Estomatología, [S.l.]*, v. 16, n. 2. ISSN 2248-7220. Disponible en: <http://estomatologia.univalle.edu.co/index.php/estomatol/article/view/281/280>. Última consulta: mayo de 2018.
20. Mystkowska, J., Niemirowicz-Laskowska, K., Łysik, D., Tokajuk, G., Dąbrowski, J., & Bucki, R. (2018). The Role of Oral Cavity Biofilm on Metallic Biomaterial Surface Destruction–Corrosion and Friction Aspects. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(3), 743. <https://doi.org/10.3390/ijms19030743>
21. Jaganathan, S., Supriyanto, E., Murugesan, S., Balaji, A., & Asokan, M. (2014). Biomaterials in Cardiovascular Research: Applications and Clinical Implications. *Biomed Research International*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/459465>
22. Sun, Z., Wataha, J., & Hanks, C. (1997). Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 34(1), 29-37. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199701\)34:1<29::aid-jbm5>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199701)34:1<29::aid-jbm5>3.0.co;2-p)
23. Niinomi, M., Liu, Y., Nakai, M., Liu, H., & Li, H. (2016). Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone. *Regenerative Biomaterials*, 3(3), 173-185. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw016>
24. Amini, F., Jafari, A., Amini, P., & Sepasi, S. (2011). Metal ion release from fixed orthodontic appliances--an in vivo study. *The European Journal Of Orthodontics*, 34(1), 126-130. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjq181>
25. Ortiz, A., Fernández, E., Vicente, A., Calvo, J., & Ortiz, C. (2011). Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: Toxicity and DNA damage. *American Journal Of Orthodontics And Dentofacial Orthopedics*, 140(3), e115-e122. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.02.021>

26. Bumgardner, J., & Lucas, L. (1995). Cellular Response to Metallic Ions Released from Nickel-Chromium Dental Alloys. *Journal Of Dental Research*, 74(8), 1521-1527.  
<https://doi.org/10.1177/00220345950740081401>
27. Park, J., Lee, H., Kang, S., Kim, J., & Kim, J. (2019). Effect of core materials for core fabrication for dental implants on in-vitro cytocompatibility of MC3T3-E1 cells. *BMC Oral Health*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0985-0>
28. Haider, W., Munroe, N., Tek, V., Gill, P., Tang, Y., & McGoron, A. (2011). Cytotoxicity of Metal Ions Released from Nitinol Alloys on Endothelial Cells. *Journal Of Materials Engineering And Performance*, 20(4-5), 816-818.  
<https://doi.org/10.1007/s11665-011-9884-5>
29. Tavira Montalván, C.A.; Ortega García, A.; Dávila González, I.; Estrada Mondaca, S.; Meneses Acosta, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Octubre-Diciembre, 35-46.
30. Florencio-Silva, R., Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simões, M., & Cerri, P. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Research International*, 2015, 1-17.
31. Iany, A., Meshcheryakova, A., Beer, A., Ankersmit, H., Paulitschke, V., & Gerner, C. (2014). Plasticity of fibroblasts demonstrated by tissue-specific and function-related proteome profiling. *Clinical Proteomics*, 11(1), 41.  
<https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-41>
32. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
33. Mahla, R. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal Of Cell Biology*, 2016, 1-24.  
<https://doi.org/10.1155/2016/6940283>

34. Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. D., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, A. B., Marín, N., Martínez, S., & Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 17(6), e1062–e1067. <https://doi.org/10.4317/medoral.17925>
35. Leeb, C., Jurga, M., McGuckin, C., Moriggl, R., & Kenner, L. (2009). Promising New Sources for Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews And Reports*, 6(1), 15-26. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9102-0>
36. Fortier, L. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415-423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2005.00063.x>
37. Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal Of Orthopaedic Research*, 9(5), 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
38. Arévalo, J., Páez D., Rodríguez, V. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. NOVA. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS; VOL.5 No. 8:101-212.
39. Lv, F., Tuan, R., Cheung, K., & Leung, V. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 32(6), 1408-1419. <https://doi.org/10.1002/stem.1681>
40. Potdar, P., & Jethmalani, Y. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World Journal Of Stem Cells*, 7(5), 839. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i5.839>
41. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., & Krause, D. et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
42. Otsuru, S., Hofmann, T., Olson, T., Dominici, M., & Horwitz, E. (2013). Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device. *Cytotherapy*, 15(2), 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.012>

43. Cortes, Y., Ojeda, M., Araya, D., Dueñas, F., Fernández, M., & Peralta, O. (2013). Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 133. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-133>
44. Agha-Hosseini, F., Jahani, M., Jahani, M., Mirzaii-Dizgah, I., & Ali-Moghaddam, K. (2009). In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clinical Transplantation*, 24(2), E23-E28. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2009.01137.x>
45. Peng, L., Ye, L., & Zhou, X. (2009). Mesenchymal Stem Cells and Tooth Engineering. *International Journal Of Oral Science*, 1(1), 6-12. <https://doi.org/10.4248/ijos.08032>
46. Zavan, B. & Bressan, E. (2016). Dental Stem Cells: Regenerative Potential. Switzerland: Humana Press.
47. Nakashima, M., Iohara, K., & Sugiyama, M. (2009). Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 435-440. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.012>
48. Honda, M., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., & Morsczech, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal Of Oral Science*, 52(4), 541-552. <https://doi.org/10.2334/josnusd.52.541>
49. Volponi, A., Pang, Y., & Sharpe, P. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends In Cell Biology*, 20(12), 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.012>
50. Rodríguez-Lozano, F., Bueno, C., Insausti, C., Meseguer, L., Ramírez, M., & Blanquer, M. et al. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International Endodontic Journal*, 44(9), 800-806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x>
51. Sedgley, C., & Botero, T. (2012). Dental Stem Cells and Their Sources. *Dental Clinics Of North America*, 56(3), 549-561. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.004>

52. Brizuela C, C., Galleguillos G, S., Carrión A, F., Cabrera P, C., Luz C, P., & Inostroza S, C. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal Of Morphology*, 31(2), 739-746. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022013000200063>
53. Karamzadeh, R., & Baghaban, M. (2013). Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine And Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.5772/55927>
54. Botelho, J., Cavacas, M., Machado, V., & Mendes, J. (2017). Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals Of Medicine*, 49(8), 644-651. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1347705>
55. Akiyama K, Chen Ch, Gronthos S, Shi S (2012) Lineage Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Dental Pulp, Apical Papilla, and Periodontal Ligament. In: Kioussi Ch (ed.) *Odontogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, pp 111-121.
56. Viña-Almunia J, Borrás C, Gambini J, El Alamy M, Peñarrocha M, Viña J (2016) Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. doi:10.4317/medoral.20957.
57. Karaöz E, Dogan B, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç Z, Yürüker S, Duruksu G, Demircan P, Sariboyaci A (2010) Isolation and in vitro characterization of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol* 133:95-112. doi: 10.1007/s00418-009-0646-5
58. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S (2005) Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded *ex vivo* from periodontal ligament. *Int. J Immunopathol Pharmacol* 18(2): 213-221.
59. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, Jung H-S, Hernández F, Casals N, Prosper F, Ferrés-Padró E, Giner L

- (2012) Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.096537
60. Núñez-Toldrà R, Martínez-Sarrà E, Gil-Recio C, Carrasco M, Al Madhoun A, Montori S, Atari M (2017) Dental pulp pluripotent-like stem cells (DPPSC), a new stem cell population with chromosomal stability and osteogenic capacity for biomaterials evaluation. *BMC Cell Biology*. doi: 10.1186/s12860-017-0137-9
61. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S (2005) The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orhtod Craniofacial Res* 8: 191-199. doi:10.1111/j.1601-6343.2005.00331.x.
62. Burciaga-Nava J, Reyes-Romero M, Avelar-Gonzalez F, Guerrero-Barrera A (2009) Establishment and characterization of porcine aortic endothelial cell cultures with prolonged replicative lifespan by a non-enzymatic method. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 45:15-18. doi:10.1007/s11626-008-9146-5.
63. Strober W (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Prot. Immunol.* 111:A3.B.1-A3.B.3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.
64. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
65. Cha, Y., Jeon, M., Lee, H., Kim, S., Kim, S., Lee, J., & Song, J. (2015). Effects of In Vitro Osteogenic Induction on In Vivo Tissue Regeneration by Dental Pulp and Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal Of Endodontics*, 41(9), 1462-1468. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.010>
66. Yang, H., & Shu, Z. (2014). The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research*, 6(2), 683-687. Retrieved 11 November 2019, from <http://www.jocpr.com>
67. Tan, Q., Zhang, Y., Luo, J., Zhang, D., Xiong, B., & Yang, J. et al. (2017). Hydrogel derived from decellularized porcine adipose tissue as a promising biomaterial for soft tissue augmentation. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 105(6), 1756-1764. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36025>

68. Rajan, N., Habermehl, J., Coté, M., Doillon, C., & Mantovani, D. (2006). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols*, 1(6), 2753-2758. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.430>
69. Chang, C., Petrie, T., Clark, A., Lin, X., Sondergaard, C., & Griffiths, L. (2016). Mesenchymal Stem Cell Seeding of Porcine Small Intestinal Submucosal Extracellular Matrix for Cardiovascular Applications. *PLOS ONE*, 11(4), e0153412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153412>
70. Xing, H., Lee, H., Luo, L., & Kyriakides, T. (2020). Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnology Advances*, 42, 107421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>
71. Kruger NJ (1994) The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker JM (ed) *Methods in Molecular Biology Vol 32*. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp 9-16.
72. Mitrano, T., Grob, M., Carrión, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P., & Fierro, F. et al. (2010). Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. *Journal Of Periodontology*, 81(6), 917-925. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090566>
73. Jin, S., Lee, J., Yun, J., Kim, I., Ko, Y., & Park, J. (2014). Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *Journal Of Periodontal Research*, 50(4), 461-467. <https://doi.org/10.1111/jre.12228>
74. Blanco, J., García-Briñon, J., Benito-Garzón, L., Pescador, D., Muntión, S., & Sánchez-Guijo, F. (2018). Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Promote Bone Regeneration in a Xenogeneic Rabbit Model: A Preclinical Study. *Stem Cells International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/7089484>
75. Huang, H. (2003). Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities. *Biomaterials*, 24(20), 3585-3592. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00188-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00188-1)

76. Toker, S., & Canadinc, D. (2014). Evaluation of the biocompatibility of NiTi dental wires: A comparison of laboratory experiments and clinical conditions. *Materials Science And Engineering: C*, 40, 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.060>
77. Nuoh, T., Andre Mars, J., Thovhogi, N., Gihwala, D., Baleg, A.A., Maaza, M. (2015). Influence of temperature and pH on corrosion resistance of Ni-Cr and Co-Cr dental alloys on oral environment. *Journal of Dental Oral Health*, 1(1), 1-9.
78. Thamer, M. & Al-Joubori, S. (2015). The effect of acidity level on ions released and corrosion of metal orthodontic appliances at different time intervals (an in vitro study). *Pedodontics, Orthodontics and Preventive Dentistry*, 27(4), 168-174.
79. Tahmasbi, S. Ghorbani, M., Masudrad, M. (2015). Galvanic corrosion of and ion release from various orthodontic brackets and wires in a fluoride-containing mouthwash. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(3), 160-165.
80. Mirhashemi, A., Jahangiri, S., & Kharrazifard, M. (2018). Release of nickel and chromium ions from orthodontic wires following the use of teeth whitening mouthwashes. *Progress In Orthodontics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s40510-018-0203-7>
81. Rerhrhaye, W., Bahije, L., El Mabrouk, K., Zaoui, F., & Marzouk, N. (2014). Degradation of the mechanical properties of orthodontic NiTi alloys in the oral environment: An in vitro study. *International Orthodontics*, 12(3), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2014.06.006>
82. Wendl, B., Wiltsche, H., Lankmayr, E., Winsauer, H., Walter, A., & Muchitsch, A. et al. (2017). Metal release profiles of orthodontic bands, brackets, and wires: an in vitro study. *Journal Of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie*, 78(6), 494-503. <https://doi.org/10.1007/s00056-017-0107-z>
83. Messer, R., Bishop, S., & Lucas, L. (1999). Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*, 20(18), 1647-1657. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00044-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00044-7)

84. D'Antò, V., Valletta, R., Amato, M., Schweikl, H., Simeone, M., & Paduano, S. et al. (2012). Effect of Nickel Chloride on Cell Proliferation. *The Open Dentistry Journal*, 6(1), 177-181. <https://doi.org/10.2174/1874210601206010177>
85. ZHANG, Y., ZHANG, Z., XIE, Y., WANG, S., QIU, Q., ZHOU, Y., & ZENG, G. (2015). Toxicity of nickel ions and comprehensive analysis of nickel ion-associated gene expression profiles in THP-1 cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3273-3278. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3878>
86. Hajimohammadjafartehrani, M., Hosseinali, S., Dehkohneh, A., Ghoraeian, P., Ale-Ebrahim, M., & Akhtari, K. et al. (2019). The effects of nickel oxide nanoparticles on tau protein and neuron-like cells: Biothermodynamics and molecular studies. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 127, 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.050>
87. Piloni, A., Pompa, G., Saccucci, M., Di Carlo, G., Rimondini, L., & Brama, M. et al. (2014). Analysis of human alveolar osteoblast behavior on a nano-hydroxyapatite substrate: an in vitro study. *BMC Oral Health*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-22>
88. Girigoswami, K., Ku, S., Ryu, J., & Park, C. (2008). A synthetic amyloid lawn system for high-throughput analysis of amyloid toxicity and drug screening. *Biomaterials*, 29(18), 2813-2819. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.022>
89. Pathak, R., Dey, S., Sarma, A., & Khuda-Bukhsh, A. (2007). Genotoxic effects in M5 cells and Chinese hamster V79 cells after exposure to 7Li-beam (LET=60keV/μm) and correlation of their survival dynamics to nuclear damages and cell death. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 628(1), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.010>

90. Kanafi, M., Rajeshwari, Y., Gupta, S., Dadheech, N., Nair, P., Gupta, P., & Bhonde, R. (2013). Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy*, 15(10), 1228-1236.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.008>
91. Azizi, A., Jamilian, A., Nucci, F., Kamali, Z., Hosseinihoo, N., & Perillo, L. (2016). Release of metal ions from round and rectangular NiTi wires. *Progress In Orthodontics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s40510-016-0123-3>
92. Moretti, R., Duailibi, M., Martins, P., Santos, J., & Duailibi, S. (2017). Osteoinductive effects of preoperative dexamethasone in human dental pulp stem cells primary culture. *Future Science OA*, 3(3), FSO184.  
<https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0083>
93. Daniela Ferreira Araújo, B., Luciana Oliveira, P., Izabel Cristina Rodrigues da, S., Ricardo Bentes, A., & Ana Cristina Barreto, B. (2018). Culture of human dental pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Brazilian Oral Research*, 32(0). <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0003>
94. Mehrabani, D., Mahdiyar, P., Torabi, K., Robati, R., Zare, S., Dianatpour, M., & Tamadon, A. (2017). Growth kinetics and characterization of human dental pulp stem cells: Comparison between third molar and first premolar teeth. *Journal Of Clinical And Experimental Dentistry*, 0-0.  
<https://doi.org/10.4317/jced.52824>
95. Mason, S., Tarle, S., Osibin, W., Kinfu, Y., & Kaigler, D. (2013). Standardization and Safety of Alveolar Bone-derived Stem Cell Isolation. *Journal Of Dental Research*, 93(1), 55-61.  
<https://doi.org/10.1177/0022034513510530>
96. Chalisserry, E., Nam, S., Park, S., & Anil, S. (2017). Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal Of Tissue Engineering*, 8, 204173141770253.  
<https://doi.org/10.1177/2041731417702531>

97. Kabirian, F., & Mozafari, M. (2020). Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. *Methods*, 171, 108-118. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.019>
98. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1863-1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
99. Campos-Navarro, PM., Avelar-Gonzalez, F.J., Gutierrez-Cantu, F.J., Mariel-Cardenas, J., Martinez-Rider, R., Guerrero-Barrera, A.L. (2018). Human Ameloblastin Labeling in Fetuses. *Wulfenia Journal Klagenfurt Austria*. 25(2):170-188.
100. Silvipriya, K., Kumar, K., Bhat, A., Kumar, B., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, 123-127. <https://doi.org/10.7324/japs.2015.50322>
101. Böhm, S., Strauß, C., Stoiber, S., Kasper, C., & Charwat, V. (2017). Impact of Source and Manufacturing of Collagen Matrices on Fibroblast Cell Growth and Platelet Aggregation. *Materials*, 10(9), 1086. <https://doi.org/10.3390/ma10091086>
102. Maurer, T., Stoffel, M., Belyaev, Y., Stiefel, N., Vidondo, B., & Küker, S. et al. (2018). Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. *PLOS ONE*, 13(10), e0205027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205027>
103. Davison-Kotler, E., Marshall, W., & García-Gareta, E. (2019). Sources of Collagen for Biomaterials in Skin Wound Healing. *Bioengineering*, 6(3). <https://doi.org/dx.doi.org/10.3390/bioengineering6030056>

104. Villegas, Á.; Naranjo, E., Gómez, D. (2008). Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura. *Revista Estomatología*, [S.I.], v. 16, n. 2. ISSN 2248-7220. Disponible en: <http://estomatologia.univalle.edu.co/index.php/estomatol/article/view/281/28>  
Última consulta: mayo de 2018.
105. Yourek, G., Hussain, M., & Mao, J. (2007). Cytoskeletal Changes of Mesenchymal Stem Cells During Differentiation. *ASAIO Journal*, 53(2), 219-228. <https://doi.org/10.1097/mat.0b013e31802deb2d>
106. Can, G., Akpınar, G., Can, A. (2004). Effects of base-metal castings alloy cytoskeletal filaments in cultured human fibroblasts. *Int J Prosthodont* 17, 45–51.
107. Toy, E., Malkoc, S., Corekci, B., Bozkurt, B.S., Hakki, S.S. (2014). Real-time cell analysis of the cytotoxicity of orthodontic brackets on gingival fibroblasts. *J Appl Biomat Funct Mater* 12, 248-255.
108. Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., & Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. *Journal Of Cell Science*, 130(8), 1347-1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471>
109. Trombetta, D., Mondello, M., Cimino, F., Cristani, M., Pergolizzi, S., & Saija, A. (2005). Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicology Letters*, 159(3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.05.019>
110. Das, K., Reddy, R., Bagoji, I., Das, S., Bagali, S., & Mullur, L. et al. (2018). Primary concept of nickel toxicity – an overview. *Journal Of Basic And Clinical Physiology And Pharmacology*, 30(2), 141-152. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2017-0171>
111. Abdulqadir, S., & Aziz, F. (2019). Internalization and effects on cellular ultrastructure of nickel nanoparticles in rat kidneys. *International Journal Of Nanomedicine*, 2019(14), 3995-4005. Retrieved 1 April 2020, from.

112. Guo, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., & Wang, X. et al. (2016). Nickel chloride (NiCl<sub>2</sub>) in hepatic toxicity: apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inflammatory response. *Aging*, 8(11), 3009-3027. <https://doi.org/10.18632/aging.101108>
113. Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., et al. (2014). Endoplasmic Reticulum stress induced by Zinc Oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. *ACS Nano* 8, 2562-2574.
114. Bexiga, M.G. & Simpson, J.C. (2013). Human diseases associated with form and function of the Golgi Complex. *International Journal of Molecular Science* 14, 18670-18681.
115. Wang, F., Gómez-Sintes, R., Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* 19, 918-931.
116. Małkiewicz, K., Sztogryn, M., Mikulewicz, M., Wielgus, A., Kamiński, J., & Wierzchoń, T. (2018). Comparative assessment of the corrosion process of orthodontic archwires made of stainless steel, titanium–molybdenum and nickel–titanium alloys. *Archives Of Civil And Mechanical Engineering*, 18(3), 941-947. <https://doi.org/10.1016/j.acme.2018.01.017>
117. Duffó, G., & Castillo, E. (2004). Development of an Artificial Saliva Solution for Studying the Corrosion Behavior of Dental Alloys. *CORROSION*, 60(6), 594-602. <https://doi.org/10.5006/1.3287764>
118. Thamer, M., & Al-Joubori, S. (2015). The Effect of Acidity Level on Ions Released and Corrosion of Metal Orthodontic Appliances at Different Time Intervals : An in Vitro Study. *Journal Of Baghdad College Of Dentistry*, 27(4), 168-174. <https://doi.org/10.12816/0024957>
119. Briceño, J., Romeu, A., Espinar, E., Llamas, J., & Gil, F. (2013). Influence of the microstructure on electrochemical corrosion and nickel release in NiTi orthodontic archwires. *Materials Science And Engineering: C*, 33(8), 4989-4993. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.024>

120. Singh, A., Kumar, M., Kumar, V., Roy, D., Kushwaha, R., Vaswani, S., & Kumar, A. (2019). Effect of Nickel Supplementation on Liver and Kidney Function Test and Protein Metabolism in Growing Cattle. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(1), 113-122. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01087-9>
121. Zhao, J., Magaya, R., Zou, B., Shi, H., Yu, H., & Yue, X. et al. (2014). Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection. *International Journal Of Nanomedicine*, 1393. <https://doi.org/10.2147/ijn.s56212>



## 12. ANEXOS

La productividad de la presente investigación y del trabajo llevado a cabo durante el desarrollo de los estudios del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas en la U.A.A., se refleja en las siguientes publicaciones y participaciones en congresos:

### PUBLICACIONES:

1. **Salazar de Santiago, A.**, Avelar González, F., Díaz, J., Hernández Cuéllar, E., Moreno Flores, A., Galindo Guerrero, F., & Guerrero Barrera, A. (2019). Mesenchymal stem cells from dental tissues. *Trends In Developmental Biology*, 12, 39-54.
2. **Salazar-de Santiago, A.**, Avelar-González, F.J., Díaz, J.M., Campos-Navarro, P.M., Flores-Villalpando, E.M., Hernández-Cuellar, E.E. & Guerrero-Barrera, A.L. Expression of enamel proteins in Human Dental Pulp Stem Cells by the effect of extracellular matrix. *Int. J. Morphol.*, 38(6):1742-1750, 2020. (*Aceptado para publicación*).
3. Exposition to nickel chloride affects the morphology and cellular organelles distribution on mesenchymal cells derived from the human alveolar bone (*En preparación*).

### OTRAS PUBLICACIONES:

1. Díaz, J., Dozois, C., Avelar-González, F., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., **de Santiago, A.**, & Guerrero-Barrera, A. (2020). The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of Escherichia coli Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00299>

### COMUNICACIONES EN CONGRESOS:

1. "Osteodifferentiation of human dental pulp pluripotential cells". XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VII International Congress of Histology and Tissue Engineering. VI Congreso Iberoamericano de Histología. September 4-6, 2019. Murcia, Spain.

**Salazar de Santiago, A.,** Avelar González, F., Díaz, J., Hernández Cuéllar, E., Moreno Flores, A., Galindo Guerrero, F., & Guerrero Barrera, A. (2019). Mesenchymal stem cells from dental tissues. *Trends In Developmental Biology*, 12, 39-54.

### Mesenchymal stem cells from dental tissues

Alfredo Salazar de Santiago<sup>1</sup>, F. Javier Avelar González<sup>2</sup>, Juan Manuel Díaz<sup>1</sup>, E. Eduardo Hernández Cuéllar<sup>1</sup>, Adriana C. Moreno Flores<sup>1</sup>, Fabiola Galindo Guerrero<sup>1</sup> and Alma L. Guerrero Barrera<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología;

<sup>2</sup>Laboratorio de Ciencias Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, CP 20131, Aguascalientes, Ags., Mexico.

#### ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-specialized cells that have the property of self-renewal and differ in several ways from specialized cells. They are identified in a large number of adult tissues, such as skin, adipose tissue, peripheral blood, bone marrow, pancreas, intestine, brain, hair follicles and dental tissues, being an attractive source for tissue engineering. Currently, as MSCs constitute the means by which some tissues are generated during development, they have attracted interest to restore those tissues that are sick or damaged after birth. In recent years, important advances have been made in the research and knowledge of the MSCs and their potential to be used in cell therapies for a wide variety of medical treatments, such as spinal cord injuries, myocardial infarction, Parkinson's disease, diabetes, among others. Because of their location and given that isolating them is not an easy task as there could be clinical complications, it is necessary to identify accessible sources of MSCs in order to be less invasive and traumatic, trying at the same time to guarantee cell viability, and preserving their proliferation and differentiation capacity. Tissues of dental origin are considered an effective and easily accessible source for obtaining MSCs, collectively referred as Dental Stem Cells (DSC), which have been shown to have the ability to generate adherent and clonogenic cell clusters

*in vitro*. In addition, they proliferate and differentiate into several cell types, representing an alternative to be used in regenerative medicine to treat various types of diseases of immune, degenerative or traumatic origin. The aim of this review is to introduce the concept of mesenchymal stem cells derived from several dental tissues, describe their phenotype, differentiation capacity and their potential use in tissue engineering.

**KEYWORDS:** mesenchymal stem cells, dental pulp stem cells, gingival stem cells, stem cells of deciduous exfoliated teeth, periodontal ligament stem cells, dental follicle progenitor stem cells, apical papilla stem cells, stem cells of natal dental pulps, alveolar bone-derived mesenchymal stem cells.

#### 1. Introduction

Stem cells (SC) are defined as those immature and non-specialized cells that have the ability to self-renew for long periods through cell division and give rise to many different cell lineages as a result of differentiation, even without having the morphology of a tissue-specific cell [1, 2]. This provides the opportunity to investigate the mechanisms that regulate embryonic development, cell differentiation and organ maintenance. Given their proliferation and differentiation capacity, these cells have great potential to develop alternatives based on cell therapy. The term stem cell was coined in 1868, from the work of the

\*Corresponding author: alguerre@correo.uaa.mx

**Salazar-de Santiago, A.,** Avelar-González, F.J., Díaz, J.M., Campos-Navarro, P.M., Flores-Villalpando, E.M., Hernández-Cuellar, E.E. & Guerrero-Barrera, A.L. Expression of enamel proteins in Human Dental Pulp Stem Cells by the effect of extracellular matrix. *Int. J. Morphol.*, 38(6):1742-1750, 2020. (Aceptado para publicación).

*Int. J. Morphol.*,  
38(6):1742-1750, 2020.

### Expression of Enamel Proteins in Human Dental Pulp Stem Cells by the Effect of extracellular Matrix

Expresión de Proteínas de esmalte en Células Madre de Pulpa dental Humana por el Efecto de Matriz Extracelular

Alfredo Salazar-de Santiago<sup>1</sup>; Francisco J. Avelar-González<sup>2</sup>; Juan Manuel Díaz<sup>1</sup>; Paloma M. Campos-Navarro<sup>3</sup>; Elizz M. Flores-Villalpado<sup>1</sup>; Edgar E. Hernández-Cuellar<sup>1</sup> & Alma L. Guerrero-Barrera<sup>1</sup>

SALAZAR-DE SANTIAGO, A.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; DÍAZ, J. M.; CAMPOS-NAVARRO, P. M.; FLORES-VILLALPADO, E. M.; HERNÁNDEZ-CUÉLLAR, E. E. & GUERRERO-BARRERA, A. L. Expression of enamel proteins in Human Dental Pulp Stem Cells by the effect of extracellular matrix. *Int. J. Morphol.*, 38(6):1742-1750, 2020.

**SUMMARY:** Mesenchymal stem cells are present in adult tissues such as the human dental pulp. They are pluripotent and can differentiate into various specialized cell types in vitro through appropriate stimuli. Ameloblasts produce human tooth enamel only during embryonic development before tooth eruption, so endogenous regeneration is not possible. Various efforts have been aimed at generating natural or artificial substitutes for dental enamel with properties similar to the specific components of said tissue. The purpose of this study was to induce human dental pulp stem cells to produce enamel proteins using extracellular matrix derived from the rat tail tendon and pigskin. Primary cultures of human dental pulp stem cells were established and characterized by RT-PCR and immunofluorescence, using mesenchymal cell markers such as CD14, CD40, CD44, CD105, and STRO-1. The cells were then incubated with the extracellular matrix for fourteen days and labeled with specific antibodies to detect the expression of dental enamel proteins such as amelogenin, ameloblastine, amelisin, tuftelin, and parvalbumin, characteristics of the phenotype of ameloblasts. This work demonstrated a positive effect of the extracellular matrix to induce the expression of enamel proteins in the stem cells of the human dental pulp.

**KEY WORDS:** Stem cells; Dental pulp; Extracellular matrix; Tissue engineering; Dental enamel.

#### INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-specialized cells that have the capacity of self-renewal and differentiation into other cell types. They are present in several adult tissues such as skin, adipose tissue, peripheral blood, bone marrow, pancreas, bowels, brain, hair follicles and dental pulp (Potdar & Jethmalani, 2015). These cells are an attractive supply for tissue engineering due to their differentiation versatility to obtain osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, among other cell types (Núñez-Toldrà, *et al.*, 2017). Human dental pulp stem cells (hDPSCs) are an important source of MSCs, with a wide potential application in reconstruction, regenerative therapy and tissue repair. The pluripotential properties of hDPSCs allow their differentiation to cells from any fundamental embryonic layer (Singh *et al.*, 2016) such as odontoblasts, osteoblasts, adipocytes, chondrocytes,

osteocytes, nerve cells, hepatocytes, cardiomyocytes, epithelial corneal cells, melanocytes and insulin producing cells, making the regeneration of new organic tissues possible (Bonato *et al.*, 2017; Benício *et al.*, 2018). The most mineralized tissue in the human body is the dental enamel (Patel & Preedy, 2017). The dental enamel is formed by ameloblasts derived from the ectoderm, which are induced through diverse molecules present in the surrounding extracellular matrix (ECM). The differentiation in ameloblast is characterized by the expression of different proteins such as amelogenin, amelisin, ameloblastin and tuftelin, as well as proteinases, among others, all constituents of the enamel matrix. Thus, the ECM plays an important role in cell differentiation processes by regulating cellular behavior, development, migration, proliferation and maintenance of

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular y Tissular, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Estudios Ambientales, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Histología, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

The research was funded by PRODEP of the Federal Government of Mexico, scholarship No. UAZ-399/511-6/17-6885. Likewise by the Autonomous University of Aguascalientes through the Special Resource for Research in 2017 and 2018 and with resources from Social Impact Projects.

Díaz, J., Dozois, C., Avelar-González, F., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., de Santiago, A., & Guerrero-Barrera, A. (2020). The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of *Escherichia coli* Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00299>

**frontiers**  
in Cellular and Infection Microbiology

ORIGINAL RESEARCH  
published: 26 June 2020  
doi: 10.3389/fcimb.2020.00299

Check for updates

## The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of *Escherichia coli* Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells

**OPEN ACCESS**

**Edited by:**  
Ulrich Dobrindt,  
University of Münster, Germany

**Reviewed by:**  
Lee-Ann H. Allen,  
The University of Iowa, United States  
Alain L. Serin,  
Institut National de la Santé et de la  
Recherche Médicale (INSERM), France

**\*Correspondence:**  
Alma Lillian Guerrero-Barrera  
aiguere@correo.uaa.mx

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Bacteria and Host,  
a section of the journal  
*Frontiers in Cellular and Infection*

**Juan Manuel Díaz<sup>1</sup>, Charles M. Dozois<sup>2</sup>, Francisco Javier Avelar-González<sup>3</sup>, Eduardo Hernández-Cuellar<sup>1</sup>, Pravi Pokharel<sup>2</sup>, Alfredo Salazar de Santiago<sup>1</sup> and Alma Lillian Guerrero-Barrera<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Morbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Aguascalientes, Mexico, <sup>2</sup> Institut National de Recherche Scientifique (INRS)-Centre Armand-Fappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada, <sup>3</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Aguascalientes, Mexico

Urinary tract infections (UTIs) affect more than 150 million people, with a cost of over 3.5 billion dollars, each year. *Escherichia coli* is associated with 70–80% of UTIs. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) has virulence factors including adhesins, siderophores, and toxins that damage host cells. Vacuolating autotransporter toxin (Vat) is a member of serine protease autotransporter proteins of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) present in some uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains. Vat has been identified in 20–36% of UPEC and is present in almost 68% of urosepsis isolates. However, the mechanism of action of Vat on host cells is not well-known. Thus, in this study the effect of Vat in a urothelium model of bladder cells was investigated. Several toxin concentrations were tested for different

“Osteodifferentiation of human dental pulp pluripotential cells”. XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VII International Congress of Histology and Tissue Engineering. VI Congreso Iberoamericano de Histología. September 4-6, 2019. Murcia, Spain.

**Histology and Histopathology**  
*From Cell Biology to Tissue Engineering*

Volume 34 (Supplement 9, 2019) <http://www.hh.umes.es>

XX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA E INGENIERÍA TISULAR

VIII INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOLOGY AND TISSUE ENGINEERING

VI CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA

September 4-6, 2019, Murcia, Spain

Congreso **SEHIT2019**  
4-6 septiembre · Murcia

**Organizan:**

UNIVERSIDAD DE MURCIA  
CMM CAMPUS MARE NOSTRUM 37 38  
SIT

**Patrocina:**

f SéNeCa<sup>(+)</sup>  
Agencia de Ciencia y Tecnología  
Región de Murcia

**Colaboran:**

PROCELLAB s.a.  
EDITORIAL MEDICA panamericana  
Wolters Kluwer

**Apoya:**

Comité Iberoamericano de Histología  
Asociación Iberoamericana de Histología

Oral presentation: Session 1. Room B. Code: 5785

**H**istology and  
**H**istopathology  
*From Cell Biology to Tissue Engineering*

### Osteodifferentiation of human dental pulp pluripotent cells

Salazar A.<sup>1</sup>, Avelar F.J.<sup>2</sup>, Luna F.<sup>3</sup>, Moreno A.<sup>1</sup> and Guerrero-Barrera A.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Tissue Biology, Department of Morphology. Autonomous University of Aguascalientes. Aguascalientes, Mexico, <sup>2</sup>Environmental Sciences Laboratory. Department of Physiology and Pharmacology. Autonomous University of Aguascalientes. Aguascalientes, Mexico, <sup>3</sup>Area of Health Sciences. Autonomous University of Zacatecas. Zacatecas, Mexico

Since the existence of adult mesenchymal stem cells (MSCs) was identified, research has been carried out to know their pluripotentiality characteristics, which allows their differentiation in various cell lineages. MSC's are present in several tissues including skin, adipose tissue, peripheral blood, bone marrow, pancreas, intestine, brain, hair follicles and dental pulp. Dental pulp cells (hDPSCs) derived from the neural crest have the capacity to generate adherent and clonogenic cell clusters when they are sown in the same *in vitro* culture conditions. They are proliferative, pluripotential and can differentiate into several cell types; hDPSCs are the most viable and promising cell line, due to their biological properties. They are easy to obtain because they are present during almost all the useful life in permanent teeth, being an autologous alternative to treat various diseases of Immune, degenerative or traumatic origin.

With approval of the Ethics Committee and informed consent, primary cultures of hDPSCs of third molars from individuals between 13 and 24 years of both sexes were established. The pulpal tissues were subjected to enzymatic digestion with EDTA/Collagenase Type I. The cells were seeded in Dulbecco's medium with 15% FBS and 1% Pen-Strep/Amphotericin B; they were incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Its viability and cell proliferation were determined by MTT assay. With RT-PCR and RT-qPCR phenotyping of hDPSC's was established with identification of CD14, CD34, CD44 and STRO-1 and the genes of osteoblastic cells COL-1-A, COL2, BSP, ALP and GAPDH. A process of cytodifferentiation to osteoblasts was performed with differentiating medium and staining with Alizarin Red.

Primary cultures of hDPSCs from third molars were obtained and showed optimal growth under the conditions in which they were cultivated. They presented spindle-shaped morphology with cytoplasmic extensions and central oval core. The cell growth followed a stable and ascending pattern in the phases of latency, logarithmic and stationary, correlating with the metabolic activity valued by the MTT test. The hDPSCs positively expressed CD14, CD34, CD44 and STRO-1, as well as the osteoblastic genes COL-1A, BSP, ALP and GAPDH. With the application for 21 days of osteodifferentiating medium and through Alizarin red staining, calcium ions were identified in the cells.

The use of the enzymatic digestion method proved to be efficient for the establishment of primary cell cultures of hDPSCs. Since the hDPSCs were described, it has been possible to deepen their phenotypic, ontogenetic and functional characterization; However, it would be necessary to continue deepening the aspects that allow to expand the knowledge about its biology and pluripotentiality capacity.

**Artículo en preparación para enviarse a la Revista: *Toxicology Research*, integrada dentro de la relación del Journal Citation Report (JCR) para su evaluación y posible publicación.**

**Título del Artículo:**

**Exposition to nickel chloride affects the morphology and cellular organelles distribution on mesenchymal cells derived from the human alveolar bone**

**Autores:**

Alfredo Salazar de Santiago<sup>1)</sup>, Francisco J Avelar-González<sup>2)</sup>, Juan M Díaz<sup>1)</sup>, Laura Yamamoto Flores<sup>2)</sup>, Edgar E Hernández-Cuéllar<sup>1)</sup>, Alma L Guerrero-Barrera<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

<sup>2)</sup>Laboratorio de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

**Corresponding author:**

Alma Lilián Guerrero-Barrera.

Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Edificio 203.

Avenida Universidad 940, Universidad Autónoma de Aguascalientes. CP 20131.

Aguascalientes, Ags., México.

#Fax:

Email: [alquerque@correo.uaa.mx](mailto:alquerque@correo.uaa.mx)

## RESUMEN

Las aleaciones dentales que utilizan níquel como parte de su composición, son los biomateriales más utilizados en la fabricación de implantes dentales por sus propiedades de memoria de forma, superelasticidad, dureza, valores mecánicos cercanos al tejido óseo y resistencia a la corrosión. Con el empleo de estudios de biocompatibilidad, que permiten describir el comportamiento de este tipo de biomateriales en contacto con el organismo o las células, se ha informado que se presenta liberación de iones de níquel generando reacciones citotóxicas, alergénicas, inflamatorias y carcinogénesis. El objetivo del presente estudio fue realizar un ensayo *in vitro* que permita describir los cambios morfológicos a nivel celular que genera la sal de Cloruro de Níquel ( $\text{NiCl}_2$ ), centrando la atención en las afectaciones del citoesqueleto y organelos responsables de importantes funciones biológicas en células mesenquimales derivadas del hueso alveolar humano (HABMSCs), debido a que este tipo de células pueden estar en contacto *in vivo* con iones de níquel liberados por implantes dentales. Para la realización del estudio, se establecieron cultivos primarios de células mesenquimales derivadas de hueso alveolar humano. La viabilidad de las células se evaluó mediante el ensayo MTT y se realizó la fenotipificación con la detección de marcadores de mesenquimalidad como CD40, CD44 y CD105 a través de ensayos de inmunofluorescencia. El efecto citotóxico se evaluó mediante el ensayo de la liberación de la enzima LDH. Las concentraciones seleccionadas que se utilizaron para la exposición de las células se retomaron de estudios previos y el tiempo de exposición se estableció entre 12 y 24 horas. Los cambios morfológicos se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y ensayos de inmunofluorescencia con microscopio confocal. De los resultados obtenidos, se observó muerte celular la cual se caracterizó por ser dependiente del tiempo y la concentración empleada. Los cambios morfológicos observados a través de SEM reflejaron una afectación de la superficie de las células con la presencia de alteración de las uniones intercelulares y cambio en la forma de los núcleos celulares. Así mismo, se presentaron alteraciones del citoesqueleto de actina y tubulina observadas mediante microscopía confocal. Finalmente, el  $\text{NiCl}_2$  también afectó la integridad de

algunos organelos como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas, sugiriendo que la síntesis y tráfico de proteínas y los procesos de degradación podrían estar alterados.

**Palabras clave:** Biocompatibilidad, células madre mesenquimales del hueso alveolar humano, citotoxicidad, níquel, implantes dentales, corrosión.

