

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS
FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12**

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN
ENDODONCIA**

PRESENTA:

C.D. JOSÉ FRANCISCO RAYGOZA LÓPEZ

**PRESIDENTE
DIRECTORA DEL PROYECTO
DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO**

**SINODAL
CO-DIRECTORA DEL PROYECTO
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ**

**SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DR. JULIO CESAR GARCÍA BRIONES**

**SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

JUNIO DEL 2019

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana B.C. a junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12.**

Propuesto por el **C.D. José Francisco Raygoza López**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE

**PRESIDENTE
DIRECTOR DEL PROYECTO
DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO**

Ccp.- Archivo.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana B.C. a junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12.**

Propuesto por el **C.D. José Francisco Raygoza López**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE

SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

Ccp.- Archivo.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana B.C. a junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12.**

Propuesto por el **C.D. José Francisco Raygoza López**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE

SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DR. JULIO CESAR GARCÍA BRIONES

Ccp.- Archivo.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana B.C. a junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12.**

Propuesto por el **C.D. José Francisco Raygoza López**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE

SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

Ccp.- Archivo.

**VIABILIDAD CELULAR DEL COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL EN LÍNEAS
CELULARES FIBROBLÁSTICAS L929 Y C2C12**

PRESENTA

C.D. JOSÉ FRANCISCO RAYGOZA LÓPEZ

**PRESIDENTE
DIRECTOR DEL PROYECTO**

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES ELENA HOFMANN SALCEDO

**SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ**

**SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DR. JULIO CESAR GARCÍA BRIONES**

**SINODAL
CO-DIRECTORA DEL PROYECTO
DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

Tijuana Baja California, Junio del 2019

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo de tesis a mis padres por ser por darme vida, enseñarme y apoyarme en todo.

Agradezco a mi máxima casa de estudios, la Universidad Autónoma de Baja California.

Un especial agradecimiento a mi Directora de tesis Dra. María de los Ángeles Elena Hofmann Salcedo por su esfuerzo, paciencia y dedicación en este trabajo.

A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, Co-directora de esta tesis, por su constante motivación y apoyo.

Al Dr. Julio Cesar García Briones, Co-director de esta tesis por su entusiasmo y sus consejos.

Al Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes, Co-director de esta tesis, por su disponibilidad, empeño y dedicación en este trabajo terminal.

Al C.D.E.E Luis Hernán Carrillo Vázquez, Co-director de esta tesis, por su interés, apoyo, motivación y ejemplo.

También quiero agradecer a todos los docentes que participaron en mi formación académica de pregrado y posgrado.

Quiero agradecer a mis compañeros de posgrado por todos los momentos gratos vividos en este camino.

Al CONACYT por la beca otorgada.

CONTENIDO

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	7
INDICE DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
ENDODONCIA.....	14
PULPA DENTAL Y TEJIDOS PERIRRADICULARES.....	14
PATOLOGÍA PULPAR Y PERIRRADICULAR.....	16
FACTORES ETIOLÓGICOS	16
<i>Bacterias.....</i>	<i>16</i>
<i>Vías de entrada.....</i>	<i>17</i>
<i>Traumatismos</i>	<i>17</i>
<i>latrogenia.....</i>	<i>18</i>
INFLAMACIÓN PULPAR.....	18
<i>Inflamación periapical.....</i>	<i>18</i>
CIRUGÍA PERIAPICAL	19
INDICACIONES DE LA CIRUGÍA PERIAPICAL.....	20
CONTRAINDICACIONES DE UNA CIRUGÍA PERIAPICAL	21
DIAGNÓSTICO.....	22
TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	23
REGENERACIÓN ÓSEA	24
<i>Osteogénesis</i>	<i>25</i>
<i>Osteoinducción</i>	<i>25</i>
<i>Osteoconducción.....</i>	<i>25</i>
INJERTOS ÓSEOS	26
<i>Autoinjertos</i>	<i>26</i>
<i>Aloinjerto.....</i>	<i>26</i>
<i>Xenoinjerto.....</i>	<i>27</i>
<i>Aloplasto.....</i>	<i>27</i>
<i>Membranas.....</i>	<i>27</i>
<i>Membrana no reabsorbible.....</i>	<i>28</i>
<i>Membrana reabsorbible.....</i>	<i>28</i>
<i>Factores de crecimiento</i>	<i>28</i>
COMPLEJO OSEÍNICO MINERAL	28
<i>Indicaciones</i>	<i>29</i>
<i>Contraindicaciones</i>	<i>29</i>
VIABILIDAD CELULAR	31
<i>Ensayo MTT.....</i>	<i>31</i>

JUSTIFICACIÓN	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
HIPÓTESIS.....	34
HIPÓTESIS NULA	34
HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	34
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
VARIABLES	36
VARIABLES INDEPENDIENTES	36
VARIABLES DEPENDIENTES.....	36
OPERACIÓN DE VARIABLES	36
TIPO DE ESTUDIO.....	37
UNIVERSO DE ESTUDIO	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
MATERIALES.....	37
METODOLOGÍA.....	38
PREPARACION DE LAS MUESTRAS	38
CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR.....	38
AGREGADO DEL MATERIAL AL CULTIVO CELULAR.....	39
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	39
VIABILIDAD CELULAR	39
CINÉTICA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL COMPLEJO OSEÍNICO	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
RESULTADOS	42
VIABILIDAD CELULAR DEL OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS L929	42
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	83
DEDICATORIA.....	84
REFERENCIAS	85

INDICE DE FIGURAS

Figura I: Esquematación de la anatomía dental y los tejidos periodontales que rodean el órgano dentario.

Figura II: Esquema de una inflamación periapical provocando un defecto óseo en el área periapical ocasionado por entrada de bacterias, trauma o un procedimiento iatrogénico.

Figura III: Radiografía de una lesión periapical radiolúcida unilocular circunscrita con bordes bien definidos ocasionando un gran defecto óseo en los tejidos periodontales del órgano dentario.

Figura IV: Fotografía clínica de una lesión periapical en región anterior del maxilar.

Figura V: Presentación comercial del complejo oseínico mineral.

FIGURA VI. Se presenta imágenes de la línea celular L929 a las 0,12 y 24 horas a 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de complejo oseínico respectivamente.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection.

BMP: Proteína morfogenética de hueso.

C°: Grados centígrados.

CO₂: Dióxido de carbono.

DFDBA: Aloinjerto óseo liofilizado descalcificado.

DMED: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EMD: Emdogain.

FBS: Suero bovino fetal.

FDDBA: Aloinjerto óseo liofilizado.

g: Gramo.

IL-1: Interleucina 1.

L-glu: L-glutamina.

Mg: Miligramo.

mm: Milímetros.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio

NEAA: Aminoácidos no esenciales.

nm: Nanómetros.

PBS: Solución salina buffer.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

Pen-strep: Penicilina-estreptomicina.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

PTFE: Politetrafluoroetileno.

PTH: Parathormona.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

μL: Microlitros.

μm: Micrómetros.

RESUMEN

La cirugía periapical es el procedimiento de eliminación de una lesión periapical, pero conservando el diente causal; consta de cuatro técnicas básicas: la osteotomía y el legrado apical, la apicectomía, la obturación retrógrada y la regeneración tisular. La regeneración es el proceso de reconstitución de una parte del cuerpo perdida o lesionada de tal manera que la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o dañados se restauran por completo.

La técnica más utilizada para la regeneración es el uso de injertos óseos, éstos pueden promover la regeneración de tejido a través de una variedad de mecanismos. Los compuestos de oseína-hidroxiapatita contienen componentes del hueso orgánico junto con calcio, fósforo y otros minerales en sus proporciones fisiológicas correctas. Los estudios experimentales en ratas, conejos y perros han demostrado que el tratamiento con compuesto de ossein-hidroxiapatita produce una curación de la herida sustancialmente acelerada, caracterizada por una mayor formación de tejido osteoide.

El complejo oseínico mineral (OSSOPAN®) son grageas compuestas por minerales, particularmente de calcio y fósforo. La asociación de minerales de OSSOPAN® en proporción fisiológica, incluye fijadores de calcio en hueso, como flúor y otros aminoácidos, que permiten incrementar la disponibilidad del calcio al organismo, la cual es utilizada originalmente en situaciones de mayor demanda como el embarazo, la lactancia, desnutrición, consolidación ósea en fracturas y osteoporosis. OSSOPAN® estimula la osteogénesis, facilitando la formación y mineralización de la matriz ósea.

Son escasos los estudios que evalúen su citotoxicidad *in vitro*; la evaluación de la viabilidad celular constituye un factor importante dentro de los diferentes materiales regenerativos óseos. En el presente proyecto de tesis se propone evaluar la citocompatibilidad de una nueva alternativa de estimulante óseo utilizando un complejo oseínico mineral.

INTRODUCCIÓN

Endodoncia

Endodoncia es la rama de la odontología encargada del estudio de la morfología de la cavidad pulpar, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención y eliminación de las alteraciones pulpares y sus repercusiones sobre los tejidos perirradiculares. La endodoncia se interrelaciona con las demás ciencias de la salud, tanto básicas como clínicas, además de ciencias como la metalurgia, la física, la química y la estadística (1).

El ámbito clínico de la endodoncia incluye el diagnóstico y el tratamiento del dolor orofacial de origen pulpar y/o periapical; los tratamientos para mantener la vitalidad de la pulpa; los tratamientos de conductos radiculares cuando no es viable conservar su vitalidad o cuando existe necrosis de la misma; los tratamientos quirúrgicos para eliminar los tejidos periapicales inflamados, consecuencia de la patología pulpar; el tratamiento de la afectación pulpar por traumatismos, así como reimplante de dientes avulsionados; y el retratamiento de dientes que presentan un fracaso de un tratamiento endodóntico previo (2).

Pulpa dental y tejidos perirradiculares

La pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo especializado de origen mesenquimatoso localizado en la cámara pulpar y los conductos radiculares de los órganos dentarios. La especialización del tejido conjuntivo de la pulpa se debe a las células dispuestas en su periferia, los odontoblastos, responsables de la formación de la matriz orgánica de la dentina, que se mineraliza y recubre la pulpa. Esa relación de interdependencia de dentina y pulpa hace con que esos tejidos sean integrantes de un mismo sistema, el complejo dentino-pulpar (3).

La pulpa está constituida por un 25% de materia orgánica y un 75% de agua. La materia orgánica está compuesta por odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células mesenquimatosas indiferenciadas, mastocitos, fibras de colágeno, reticulares y de oxitalano; y sustancia fundamental (glucosaminoglucanos, proteoglicanos, colágeno, elastina, interleucina-1, bronectina) (4).

La pulpa contiene nervios sensitivos a lo largo de toda su extensión, estos hacen anastomosis del centro hacia la periferia. Desde la zona subodontoblástica, las fibras sensitivas se insinúan en la capa de odontoblastos y eventualmente penetran en los túbulos dentinarios. Estas terminaciones nerviosas libres provocan la sensación de dolor ante los diversos estímulos aplicados sobre el complejo dentino-pulpar (5). La pulpa está delimitada por dentina, un tejido duro, calcificado y en continua formación que permite a la pulpa reaccionar y protegerse de agentes agresores, aunque provoca la progresiva disminución de su volumen y limita su capacidad para expandirse durante los episodios de vasodilatación y filtración aumentada (5).

La dentina está constituida por una serie de túbulos dentinarios que la atraviesan y por una matriz compuesta por 70% de materia inorgánica, 18% de materia orgánica y 12% de agua. La materia inorgánica está constituida principalmente por cristales de hidroxiapatita de menor tamaño que los del esmalte, mientras que la materia orgánica está compuesta de colágeno tipo I (90% de la matriz) y de proteínas similares a las del hueso (4).

La pulpa dental está en comunicación con el periodonto a través del foramen apical y los conductos laterales. El periodonto es el aparato de sostén del diente en el alveolo y está constituido por los tejidos perirradiculares, que consisten en el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar (3, 4).

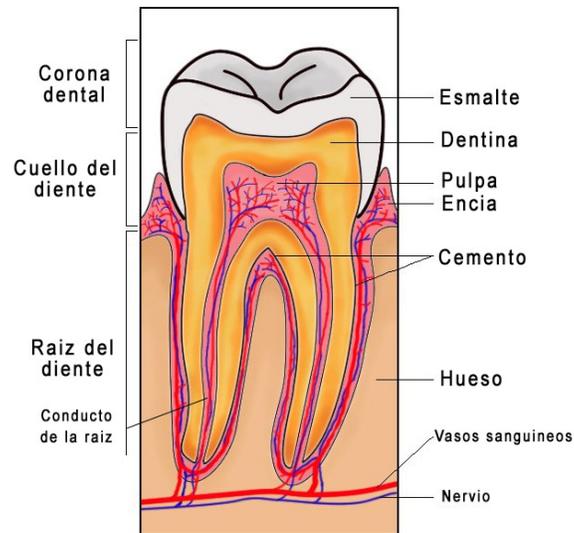


Figura I: Esquematación de la anatomía dental y los tejidos periodontales que rodean el órgano dentario.

Patología Pulpar y Perirradicular

Bajo condiciones normales y fisiológicas, la pulpa dental está bien protegida de las lesiones y elementos dañinos en la cavidad oral por una cubierta de tejido duro externo de los dientes y el periodonto intacto. La exposición de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares a los microorganismos da como resultado el desarrollo de la patología pulpar y perirradicular (6). Como cualquier tejido conectivo, la pulpa responde a esto con inflamación. La inflamación está dirigida a neutralizar y eliminar el agente dañino. Cuando la caries se extiende a la vecindad de la pulpa, la respuesta puede ser destructiva y resultar en necrosis del tejido (7).

Factores etiológicos

Bacterias

La inflamación pulpar y periapical puede iniciarse en respuesta a agentes bacterianos, físicos o químicos, pero los estudios experimentales demuestran que la presencia de bacterias es esencial para la progresión y perpetuación del proceso inflamatorio (8).

Vías de entrada

Caries: La respuesta inflamatoria pulpar frente a la caries se produce antes de que las bacterias alcancen físicamente la pulpa, cuando los antígenos bacterianos, el lipopolisacárido y los subproductos bacterianos difunden a través de los túbulos dentinarios y desencadenan, por un mecanismo inmunopatológico, la pulpitis (6).

Periodonto: En otras ocasiones, las bacterias pueden proceder de una bolsa periodontal, bien a través de conductos laterales, bien desplazándose por los propios túbulos dentinarios cuando existe una reabsorción del cemento (9).

Traumatismos: También es frecuente la contaminación a partir de una fractura de la corona dental, cuando la pulpa queda expuesta o a través de los túbulos dentinario (8).

Filtración marginal: A través de la brecha existente en algunas restauraciones entre el material de obturación y la pared cavitaria pueden penetrar bacterias y llegar a la pulpa desplazándose por los túbulos dentinario (7).

Anomalías de desarrollo: Los defectos acaecidos durante el desarrollo del diente pueden dejar grietas que permitan el paso de las bacterias hacia la pulpa (8).

Circulación sanguínea: A partir de la circulación sanguínea, mediante anacoresis, las bacterias pueden colonizar la pulpa cuando esta se halla lesionada por un traumatismo o por degeneraciones hísticas (8, 9).

Traumatismos

Los traumatismos que producen una exposición pulpar o dentinaria causan la inflamación de la pulpa por posibilitar la llegada de las bacterias a la misma. Cuando el traumatismo no ocasiona una comunicación de la pulpa con la cavidad bucal, pero sí la necrosis pulpar, las bacterias pueden llegar por anacoresis (3).

Isotrofia

La generación de calor y la desecación de los túbulos de la dentina en procedimientos restauradores pueden lesionar el tejido pulpar, produciendo alteraciones vasculares e iniciando una inflamación por liberación de neuropéptidos y citocinas (4, 10).

Inflamación pulpar

La pulpa y el tejido periapical reaccionan ante los componentes bacterianos como cualquier tejido conectivo del organismo. El grado y la extensión de la lesión hística variarán en función de los factores de virulencia de las bacterias presentes y de los mecanismos defensivos del huésped (7).

Inflamación periapical

La inflamación periapical se inicia antes de que se complete la necrosis pulpar, y puede haber lisis ósea en el periápice, visible en las radiografías, sin necesidad de que esté destruido el tejido pulpar en la zona final del conducto (7). Se inicia con la aparición de un infiltrado inflamatorio de tipo crónico en la proximidad del orificio apical, observándose osteoclastos que inician la reabsorción ósea estimulados por diversos mediadores: IL-1, TNF, prostaglandinas. Una vez que se reabsorbe el hueso, como mecanismo defensivo, se produce la formación de tejido granulomatoso, consecuencia de la proliferación de los fibroblastos de la periferia, por lo que se segrega colágeno y se forma una neovascularización regulada por distintos mediadores. Creando así un defecto óseo en el área periapical del órgano dentario afectado (7, 10). Las lesiones inflamatorias periapicales son respuestas óseas locales alrededor del ápice de un diente que ocurre después de la necrosis del tejido de la pulpa causada por caries dental, traumas mecánicos o térmicos y agentes químicos. La cirugía periapical moderna tiene como objetivo eliminar las lesiones periapicales para lograr la curación completa de la herida y ayudar a la regeneración del hueso y el tejido periodontal. La curación natural de los defectos requiere un período de tiempo relativamente largo para que el hueso llene la cavidad residual, se han introducido distintos métodos regenerativos que ayudan a restaurar el tejido perdido y acelerar la regeneración (10).



Figura II: Esquema de una inflamación periapical provocando un defecto óseo en el área periapical ocasionado por entrada de bacterias, trauma o un procedimiento iatrogénico.

Cirugía periapical

La cirugía periapical, cirugía endodóntica o endodoncia quirúrgica es el procedimiento de eliminación de una lesión periapical, pero conservando el diente causal (11).

Es decir, que con esta técnica se consigue:

1. Eliminar el foco infeccioso, el quiste radicular, mediante el legrado o curetaje apical y la apicectomía que lo facilita.
2. Conservar el diente causal mediante la realización del tratamiento de conductos pertinente y el sellado apical mediante la apicectomía y la obturación retrógrada.

La cirugía periapical consta de cuatro técnicas básicas: el legrado apical, la apicectomía, la obturación retrógrada y la regeneración tisular. Este tipo de cirugía precisa de una gran minuciosidad y la observancia de etapas bien regladas, que, junto con la habilidad del profesional, llevarán al éxito de la técnica (12).

Indicaciones de la cirugía periapical

Presencia de instrumentos rotos dentro del conducto radicular: Ante esta eventualidad, cada vez menos frecuente, debe intentarse retirar el instrumento fracturado por vía ortógrada, puede colocarse una obturación en el conducto radicular hasta el fragmento del instrumento roto. Si la calidad de esta obturación es buena y la longitud del instrumento es pequeña, es posible que no aparezcan complicaciones; sin embargo, es preciso realizar controles clínicos y radiológicos periódicos. En otras ocasiones es posible seguir instrumentando lateralmente al material fracturado y terminar el tratamiento endodóntico normalmente (13).

Perforación de la raíz: La perforación de la raíz puede complicar la preparación biomecánica del conducto radicular, y aunque en algunos casos el tratamiento puede resolverse a través de la cámara pulpar, en otros puede precisarse cirugía. Las perforaciones ubicadas en el tercio apical de la raíz se tratan con apicectomía y obturación retrógrada. En otros casos el lugar de la perforación se expone mediante un abordaje quirúrgico y se obtura (10).

Falsa vía: Una desviación en la dirección del conducto, debido a un error en la instrumentación, puede acarrear una dificultad importante para obturar adecuadamente el conducto radicular hasta el lugar correcto (2, 10).

Fracaso endodóntico: En este caso se comprueba radiológicamente que la lesión periapical no se ha reparado o incluso ha aumentado de tamaño. También puede confirmarse porque persiste la clínica y el paciente se queja de dolor o sensibilidad periapical persistente (10, 14).

Obturación radicular incorrecta que no puede eliminarse: El conducto radicular no puede ser reinstrumentado ni reobturado por vía ortógrada, y por tanto se requiere una obturación retrógrada. Cuando hay una punta de plata o de gutapercha que no puede retirarse, la única alternativa es la cirugía periapical (13).

Diente con una gran reconstrucción, con un perno o un muñón colado: Si con posterioridad se desarrolla patología periapical, esta eventualidad imposibilita un nuevo tratamiento de conductos por el peligro de fracturar el diente (13).

Sobreinstrumentación: Si la longitud del conducto radicular se ha calculado mal, es posible que los instrumentos se fuerzen inadvertidamente más allá del ápice, produciendo una grave alteración en la forma del foramen apical (13, 15).

Sobreobturación: Cuando el conducto radicular está excesivamente sobreobturado, este material de obturación sobrante que invade el periápice actúa como irritante, causa dolor persistente e inflamación e impide la reparación, o produce una radiotransparencia apical; en estos casos habrá que considerar seriamente la posibilidad de un abordaje quirúrgico (15).

Patología periapical persistente: En ocasiones es imposible limpiar de forma adecuada y obturar la porción apical de la raíz por vía ortógrada, con lo cual la lesión periapical no remite; entonces está indicada la cirugía endodóntica. Si se producen exacerbaciones recurrentes con episodios repetidos de dolor e inflamación, se procede al relleno del conducto radicular y después se efectúa la intervención quirúrgica (15).

Contraindicaciones de una cirugía periapical

La cirugía periapical puede estar contraindicada o limitada por una serie de factores que implican un riesgo añadido o la necesidad de tomar medidas suplementarias previas o posteriores a la intervención quirúrgica (15).

1. En pacientes con boca séptica.
2. Abscesos o procesos infecciosos en fase aguda.
3. Estomatitis ulcerosa.
4. Enfermedad periodontal grave, con destrucción ósea hasta el tercio apical de la raíz.
5. Lesión periapical extendida a los dos tercios de la raíz o a la bifurcación.

6. Reabsorción ósea importante por lesiones periodontal y apical combinadas.
7. Rizólisis o destrucción de más de un tercio de la raíz.
8. Dificultad en el acceso a la zona periapical.
9. Proximidad peligrosa de estructuras anatómicas, como el seno maxilar, el conducto dentario inferior, el agujero mentoniano, etc. Estas son contraindicaciones relativas, puesto que una buena técnica hace que, aunque con mayor dificultad, pueda implementarse la intervención quirúrgica.
10. Cuando no sea posible la posterior restauración del diente intervenido.
11. Consideraciones estéticas. La posibilidad de producir cicatrices o tatuajes mucosos en la zona anterior del maxilar superior debe valorarse convenientemente, ya que tiene unas implicaciones estéticas importantes.
12. Contraindicaciones por enfermedades sistémicas.

Diagnóstico

Examen radiológico: Se efectúa primero una ortopantomografía, que ofrece una visión general, y después varias placas intrabucales (radiografías periapicales y oclusales), que aportarán más detalles de las estructuras en estudio. En este examen radiológico preoperatorio se debe valorar (14).

Lesión periapical: Tipo y extensión del proceso patológico, relaciones de este con los dientes vecinos y con las distintas estructuras anatómicas con las que puede contactar (seno maxilar, fosas nasales y conductos y orificios óseos). Está claro que se necesita conocer con precisión el diagnóstico del proceso periapical, aunque ya se sabe que no es posible predecir con seguridad el diagnóstico histológico por la radiografía, pero sí puede disponerse de una serie de datos capaces de orientar hacia un diagnóstico de sospecha acertado (14).

Raíz: Es muy importante conocer el estado radicular, para detectar procesos destructivos (rizólisis) o para determinar con precisión el grado de desarrollo apical o la existencia de

alteraciones de la permeabilidad del conducto radicular, instrumentos rotos dentro de él, presencia de conductos o raíces adicionales, reabsorciones externas de la raíz, etc. Para estos estudios se recomienda efectuar múltiples radiografías con distintas angulaciones (16).

Periodonto: La destrucción ósea producida por la enfermedad periodontal, así como una pérdida ósea grande por efecto de la lesión periapical, puede contraindicar este tipo de intervención quirúrgica (15, 16).

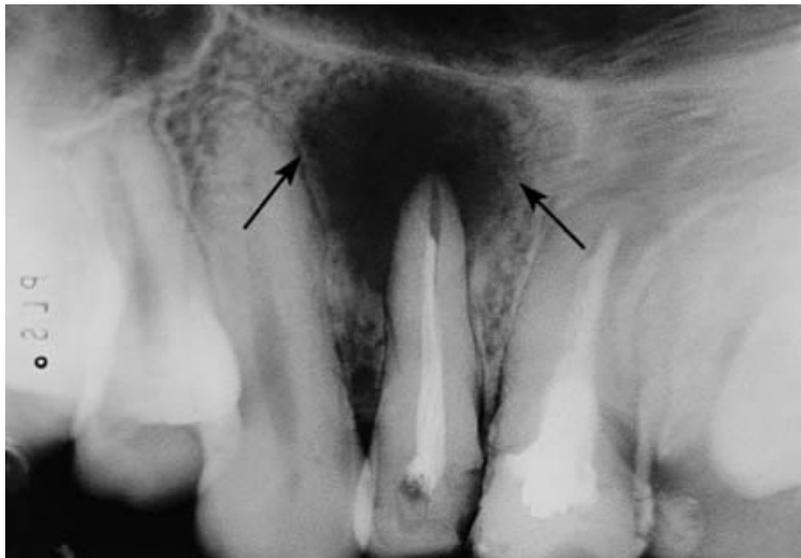


Figura III: Radiografía de una lesión periapical radiolúcida unilocular circunscrita con bordes bien definidos ocasionando un gran defecto óseo en los tejidos periodontales del órgano dentario.

Técnica quirúrgica

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Anestesia
2. Incisión
3. Levantamiento del colgajo
4. Osteotomía
5. Legrado

6. Resección apical
7. Retropreparación
8. Retro-obturación
9. Colocación de injerto
10. Reposicionamiento del colgajo
11. Sutura

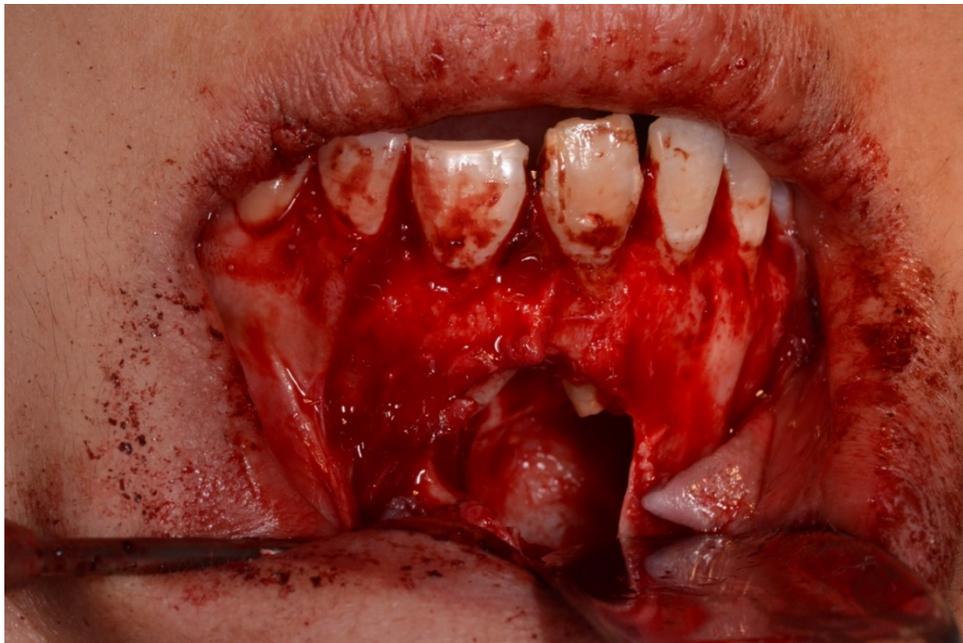


Figura IV: Fotografía clínica de una lesión periapical en región anterior del maxilar.

Regeneración ósea

La regeneración es el proceso de reproducción o reconstitución de una parte del cuerpo perdida o lesionada de tal manera que la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o dañados se restauran por completo, y es un proceso natural de curación de heridas (17, 18). En este sentido, los diferentes biomateriales existentes en el mercado pueden actuar por lo menos en tres mecanismos:

Osteogénesis

Síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.

Osteoinducción

Es un proceso que estimula la osteogénesis, por el que las células madres mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleuquinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos-macrófago. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina. Los materiales osteoinductivos pueden hacer crecer hueso en la zona donde normalmente no se encuentra.

Osteoconducción

Es un proceso por el cual el material provee un ambiente, estructura o material físico apropiado para la aposición de hueso nuevo. Se desencadena un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular, y células madres mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase huésped-injerto (19).

Los biomateriales que atribuyen a la estimulación del tejido óseo se dividen en 3 grandes familias:

- Injertos óseos
- Membranas

- Factores de crecimiento/citoquinas

Injertos óseos

Quizás la técnica más utilizada para la regeneración es el uso de injertos óseos. Los injertos de reemplazo óseo pueden promover la regeneración de tejido / hueso a través de una variedad de mecanismos. Algunos injertos contienen células que depositan matriz ósea, lo que en última instancia da como resultado la formación de hueso nuevo. Estos injertos se conocen como que tienen propiedades osteogénicas. Otros injertos liberan factores de crecimiento y otros mediadores que le indican al huésped que produzca hueso nativo. Estos injertos son considerados osteoinductivos. Además, otros materiales de injerto podrían actuar simplemente como un andamio sobre el cual podría crecer el hueso huésped. Esta propiedad se conoce como osteoconductor (18).

Autoinjertos

Los injertos autógenos son los obtenidos desde una ubicación remota dentro del mismo huésped y se consideran el injerto de reemplazo óseo estándar de oro. Normalmente, estos injertos se obtienen intraoralmente a partir de las cavidades de extracción, las crestas edéntulas, la rama, la sínfisis, la tuberosidad o la placa bucal circundante. Alternativamente, los injertos más grandes pueden obtenerse extraoralmente de áreas como la cresta ilíaca o la tibia. Las ventajas de utilizar injertos autógenos son que estos injertos son osteogénicos, evitan la transmisión de enfermedades y son de bajo costo. Sin embargo, requieren un segundo sitio quirúrgico en el sitio donante (20).

Aloinjerto

Un aloinjerto óseo se refiere a un injerto genéticamente diferente, pero miembros de la misma especie. Los injertos a menudo se obtienen de bancos de tejidos que procesan los tejidos del donante. Dependiendo de la manera en que se procesen estos tejidos, los aloinjertos pueden ser osteoconductores u osteoinductivos. Estos materiales de injerto tienen tasas de éxito relativamente altas y tienen una ventaja adicional en que no se requiere ningún procedimiento quirúrgico adicional para obtener hueso de un sitio donante. Las desventajas pueden incluir una respuesta inmune a un cuerpo extraño, el

costo y la contaminación del injerto durante el procesamiento. Las formas más utilizadas de los aloinjertos son los aloinjertos óseos liofilizados (FDBA) y los aloinjertos óseos liofilizados descalcificados (DFDBA) (20).

Xenoinjerto

Un xenoinjerto se refiere al tejido tomado de una especie y colocado en otra especie. Para los injertos de reemplazo óseo intraoral, las fuentes animales más comunes son bovinos y porcinos. Debido a que la antigenicidad es una preocupación con este tipo de injerto, los tejidos se procesan para eliminar todos los componentes orgánicos, dejando solo una matriz inorgánica. Por lo tanto, los xenoinjertos son osteoconductores por naturaleza. Típicamente, estos materiales de injerto se reabsorben muy lentamente y pueden secuestrar o sufrir encapsulación fibrosa (20).

Aloplasto

Un aloplasto es un cuerpo extraño sintético o inerte que se implanta en el tejido del huésped. Solo son osteoconductores y pueden ser más utilizados como hidroxapatita, fosfato beta-tricálcico, no cerámico, polímero o vidrio bioactivo. Los aloplastos sirven principalmente para mantener el espacio y, por consiguiente, no son ideales para promover la regeneración periodontal. Los injertos de hidroxapatita pueden lograr ganancias de unión de alrededor de 1 a 1,5 mm, y los injertos de polímero pueden promediar 2 mm de relleno óseo (20).

Membranas

Barreras de membrana son utilizadas exclusivamente para impedir la migración de células epiteliales y de tejido conectivo a la herida periodontal. Esto promueve la regeneración de células (osteoblastos, fibroblastos, cementoblastos) y la repoblación del área, promoviendo la regeneración de la herida (19).

Existen 2 tipos de barreras:

Membrana no reabsorbible

Muchos materiales han sido utilizados como barreras no reabsorbibles para GTR. incluyendo filtros bacterianos (Millipore, Billerica, MA) y un dique de goma, pero el material más utilizado es la membrana ePTFE (19).

Membrana reabsorbible

El objetivo final de las técnicas quirúrgicas reconstructivas en el tratamiento de los defectos intraóseos es la regeneración del tejido óseo perdido. Muchas técnicas regenerativas, utilizando injertos óseos y membranas de barrera, se introdujeron para ayudar a la curación óptima de los defectos residuales después de la eliminación de las lesiones intraóseas, especialmente quistes grandes (19).

Factores de crecimiento

Se ha estudiado la aplicación de factores de crecimiento local para mejorar el potencial de curación y regeneración de la cirugía periodontal / endodóntica. PRP, los factores de crecimiento que incluyen BMP, PDGF y EMD son los agentes más utilizados. Otras terapias prometedoras incluyen fragmentos de colágeno unidos a injertos óseos, PTH y factor de crecimiento transformante beta 3 (20).

Complejo Oseínico Mineral

El compuesto de oseína-hidroxiapatita contiene componentes del hueso orgánico junto con calcio, fósforo y otros minerales en sus proporciones fisiológicas correctas. Los estudios experimentales en ratas, conejos y perros han demostrado que el tratamiento con compuesto de ossein-hidroxiapatita produce una curación de la herida sustancialmente acelerada, caracterizada por una mayor formación de tejido osteoide (21, 22). El complejo oseínico mineral es equivalente a: calcio, fósforo, proteína. La relación entre los compuestos minerales, particularmente de calcio y fósforo es fisiológica y asegura una mayor absorción intestinal, a diferencia de otros preparados sintéticos de calcio no orgánico que tienden a precipitarse y formar complejos insolubles eliminados en las heces (23).

La asociación de minerales en proporción fisiológica, incluyendo fijadores de calcio del hueso, como flúor y otros aminoácidos, permiten no solo incrementar la disponibilidad del calcio al organismo en situaciones de mayor demanda como el embarazo, la lactancia, el crecimiento, desnutrición, consolidación ósea en fracturas y osteoporosis, sino que logra un balance positivo de calcio a nivel óseo en enfermedades desmineralizantes. Estimula la osteogénesis, facilitando la formación y mineralización de la matriz ósea. Se satisfacen los requerimientos de calcio diarios establecidos por el Instituto Nacional de la Nutrición tanto en el embarazo, la lactancia y la edad pediátrica, así como el climaterio como profiláctico de la osteoporosis(24).

Indicaciones

Gineco-obstetricia: suplementación profiláctica de la desmineralización debida a la demanda incrementada de calcio durante la gestación y la lactancia y que clínicamente se manifiesta por dorsalgias, caída de cabello, resequedad de la piel, enfermedades dentales y calambres. Profilaxis y coadyuvante en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. *Ortopedia:* coadyuvante en el proceso de consolidación de fracturas. Trastornos del metabolismo mineral y profilaxis y coadyuvante en el tratamiento de los procesos osteoporóticos seniles. *Medicina interna y reumatología:* complemento del tratamiento de la osteoporosis de cualquier tipo(25).

Contraindicaciones

Hipercalcemia, hipersensibilidad a los componentes de la fórmula, hiercalciuria, hiperparatiroidismo, insuficiencia renal, cálculos renales, tumores descalcificantes (plasmocitomas), sarcoidosis, fibrilación ventricular, pacientes con alteraciones cardiacas y tratamiento con digitálicos. Por sus características farmacológicas, se presenta como un producto óptimo que incrementa la biodisponibilidad del calcio al organismo en situaciones de mayor demanda como el embarazo y la lactancia. Usar cuidadosamente en pacientes con inmovilización severa, por ejemplo, paraplejía y en pacientes con historia de formación de cálculos por calcio(24).

Puede interferir en la absorción de tetraciclina, fluoruro, bloqueadores del calcio, fenitoína y etidronato. La absorción de calcio puede ser disminuida si se ingiere simultáneamente con los siguientes alimentos: salvado, ruibarbo, espinacas, leche y productos lácteos. En pacientes digitalizados, altas dosis de calcio pueden aumentar el riesgo de arritmias cardíacas(21).

En múltiples estudios efectuados en animales de experimentación, por tiempo prolongado y a altas dosis, no se presentó ningún tipo de efecto teratogénico, mutagénico, carcinogénico ni sobre la fertilidad (25).



Figura V: Presentación comercial del complejo oseínico mineral.

Viabilidad celular

Dentro de los numerosos ensayos in vitro existen los métodos de viabilidad o citotoxicidad útiles para el registro de ensayos clínicos de una sustancia dada e encuentran los llamados ensayos de viabilidad y/o citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares, los efectos adversos que interfirieran en los mecanismos celulares, proliferación y/o función de las células. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana, citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación de productos celulares, regulación iónica y división celular(26). La citotoxicidad celular se define como la alteración de las funciones celulares que conlleva a que se produzca un daño irreversible provocando muerte celular(27). Diferentes autores han desarrollado a lo largo del tiempo diferentes estudios in vitro que ayudan a predecir efectos tóxicos de las drogas, compuestos, sustancias, utilizando modelos experimentales cuyo modelo son cultivos y órganos aislados como líneas celulares establecidas (28).

Ensayo MTT

Este método se utiliza para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto colorado, debido a una reacción mitocondrial. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células. El producto de la reacción (formazan) queda retenido en las células y es liberado mediante la solubilización de las células. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante el método colorimétrico que va de amarillo al azul (29). La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa(30).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen diferentes tipos de injertos que han demostrado a nivel clínico su eficiencia para inducir la regeneración ósea en maxilares después de intervenciones quirúrgicas, sin embargo son escasos los estudios que evalúen su citotoxicidad in vitro del complejo oseínico mineral; por lo tanto el presente estudio pretende evaluar la viabilidad celular en líneas celulares L929 y C2C12 con complejo oseínico mineral para plantearse como una nueva alternativa de uso en cirugía endodóntica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evaluación de la viabilidad celular constituye un factor importante dentro de los diferentes materiales regenerativos óseos. En el presente proyecto se propone evaluar la citotoxicidad in vitro de un estimulante óseo utilizando el complejo oseínico mineral en líneas celulares L929 y C2C12.

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

La investigación de este trabajo permitirá evaluar la viabilidad celular in vitro del estimulante óseo utilizando un complejo oseínico mineral en líneas celulares L929 y C2C12.

Hipótesis nula

Las células L929 y C2C12 cultivadas en presencia del complejo oseínico mineral en diversas diluciones no cambiara el porcentaje de viabilidad celular.

Hipótesis alternativa

Las células L929 y C2C12 cultivadas en presencia del complejo oseínico mineral en diversas diluciones aumentara el porcentaje de viabilidad celular en comparación con el cultivo de control.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la viabilidad celular del complejo oseínico mineral en dos líneas celulares de fibroblastos de ratón.

Objetivos específicos

Caracterizar la citotoxicidad del complejos oseínico mineral en función de diversas diluciones.

Caracterizar por el método MTT el complejo oseínico mineral en línea celular L929 y C2C12 de fibroblastos de ratón.

VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Tipo de complejo oseínico.
- Porcentaje de dilución en contacto con el cultivo.
- Viabilidad celular de las células L929.
- Viabilidad celular de las células C2C12

VARIABLES DEPENDIENTES

Composición química y elemental del complejo oseínico.

Citotoxicidad del complejo oseínico.

OPERACIÓN DE VARIABLES

Al complejo oseínico objeto de estudio se determinará su citotoxicidad en células L929 y C2C12 cultivadas en presencia del complejo oseínico mineral en diversas diluciones, para su análisis las muestras serán preparadas siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La viabilidad celular será analizada por el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

TIPO DE ESTUDIO

Experimental

UNIVERSO DE ESTUDIO

Complejo oseínico mineral

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Complejo oseínico mineral (OSSOPAN, Clarion Pharmaceutucal Co.), Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-25difeníl tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983), Placas de cultivo celular, Buffer fosfato salino, Lector de placas, Solución de TRITON, Microscopio óptico. Las células L929 y C2C12 fueron adquiridas de los laboratorios American Type Culture Collection (ATCC). Todos los medios y agentes de cultivo celular fueron adquiridos de Invitrogen.

METODOLOGÍA**PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

El complejo oseínico mineral en pequeños sobres de 1g estériles OSSOPAN, proveído por Clarion Pharmaceutical Co. Se utilizaron 8 tubos eppendorf y en cada tubo se colocó 1ml de medio DMED, con las siguientes concentraciones:

Dilución	Concentración
1	0.00001 mg/mL
2	0.0001 mg/mL
3	0.001 mg/mL
4	0.01 mg/mL
5	0.1 mg/mL
6	1 mg/mL
7	10 mg/mL
8	100 mg/mL

Tabla I: Diferentes diluciones y concentraciones del complejo oseínico mineral.

CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR

Las células L929 y C2C12 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0.1 mg de aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mg de L-Glutamina (L-Glu), 1mg piruvato de sodio y 1% de penicilina-estreptomina (pen-strep) e incubadas a condiciones estándar de cultivo (37 °C, 5% CO₂, atmósfera

húmeda). Las células fueron subcultivadas al alcanzar una confluencia óptica del 80–90%. Para su subcultivo, las células confluentes fueron tratadas con una solución 0.25% de tripsina-EDTA e incubadas por 4 min a condiciones estándar de cultivo. Las células fueron desprendidas de los frascos de cultivo, resuspendidas en medio de cultivo fresco y sembradas en las placas de cultivo para su experimentación.

AGREGADO DEL MATERIAL AL CULTIVO CELULAR

Una vez cultivadas y crecidas las células L929 y C2C12, estas fueron colocadas en pocillos de microplacas de 96 pocillos de 50µm. Utilizando pipetas calibradas SoftGrip se colocaron las concentraciones arriba mencionadas, de mayor a menor. Una vez aplicados los materiales, las microplacas se colocaron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda 40% con 5% de CO₂ por 6 horas y 24 horas.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El ensayo de viabilidad celular fue realizado empleando placas de 96 pocillos de fondo plano con las líneas celulares C2C12 y L929 a una densidad de 2X10⁴ células / pozo en un volumen de 100µL, posteriormente, fueron incubados en atmósfera de 5% en CO₂ a 37°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó un cambio de medio, en este caso fueron adicionados 100µL del medio de cultivo, en el cual fueron disueltos previamente el complejo oseínico mineral de manera que se obtuviera la concentración deseada (1x10⁻⁴, 1x10⁻³, 1x10⁻², 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 mg/mL). A continuación las células fueron incubadas en presencia de las diferentes concentraciones del complejo oseínico durante 24 horas. El crecimiento celular fue comparado con células cultivadas en ausencia de producto como controles negativos, las cuales representaron el 100% de crecimiento.

VIABILIDAD CELULAR

Para determinar el efecto del material sobre la viabilidad de las líneas celulares se utilizó el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-25difeníl tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Con este objetivo, al concluir el tiempo de exposición, se adicionaron 5 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en solución salina tamponada (PBS)) a cada pocillo y se

incubaron bajo las mismas condiciones durante 6 horas y 24 horas. Al concluir este intervalo de tiempo, el medio se decantó cuidadosamente y se adicionaron posteriormente 100 µl/pozo de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubar nuevamente a 37°C durante 24 horas, la absorbancia a 560 nm se midió a través de un lector de microplacas MRX Revelation Dynex Technologies. Se utilizó como referencia la lectura a una longitud de onda de 630 nm. Con los valores de absorbancia determinados, se calculó el porcentaje de viabilidad celular, utilizando la siguiente expresión:

$$\% = (\text{abs}_{\text{tratados}} / \text{abs}_{\text{control}}) \times 100.$$

Los experimentos fueron realizados en triplicado.

CINÉTICA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL COMPLEJO OSEÍNICO

Las dos líneas celulares C2C12 (CRL-1772) y L929 (CCL-1) fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC®). Estas líneas celulares se cultivaron con medio DMEM, suero bovino fetal 10%, 1% L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomina. Las células fueron sembradas en frascos de 25 cm² hasta que la monocapa alcanzó una confluencia del 70%, fueron separadas utilizando tripsina y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano a una confluencia de 1X10⁴ células / pozo en un volumen de 100µL. A las 24 horas después de la siembra las células se lavaron por tres veces con medio DMEM sin ningún aditivo para evaluarse las diferentes concentraciones del complejo oseínico a las 0, 6, 12 y 24 horas para caracterizar la morfología de los fibroblastos controles y los expuestos a 0, 25, 50 y 50µg/mL del complejo oseínico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los ensayos biológicos fue llevado a cabo empleando el test ANOVA (análisis de la varianza) de un factor. La diferencia estadística fue considerada como significativa a $p < 0.05$. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células C2C12 y L929 con respecto a los valores del control para cada concentración ensayada de las

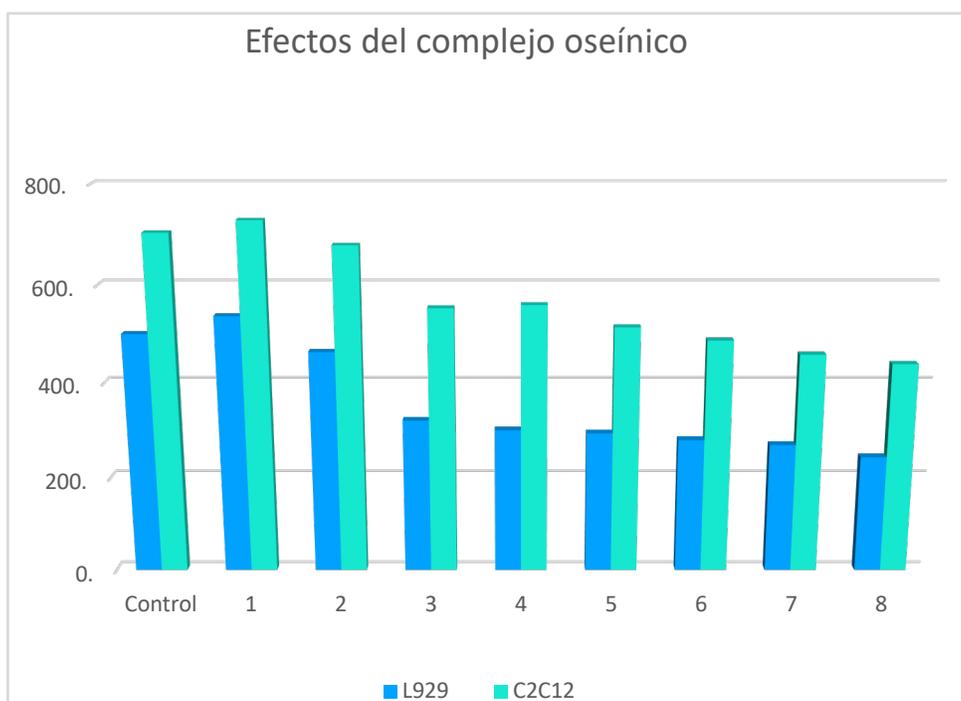
MATERIALES Y METODOS

diferentes concentraciones del complejo oseínico y se construyeron curvas dosis-respuesta. Los datos fueron analizados y graficados con el programa Graph Pad Prism versión 7.

RESULTADOS

VIABILIDAD CELULAR DEL OSEÍNICO MINERAL EN CÉLULAS L929

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones del complejo oseínico sobre la viabilidad celular se utilizó las líneas celulares C2C12 y L929. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del complejo oseínico (1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 mg/mL) durante 24 horas. El crecimiento de las células expuestas fue comparado con células cultivadas en ausencia del producto (control negativo), estas últimas representaron el 100% de crecimiento. En la Grafica 1 se muestran los resultados del porcentaje de viabilidad celular de las células expuestas al complejo oseínico respecto al control no tratado. La exposición del complejo oseínico en las dos líneas celulares empleadas durante 24 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular, en los dos casos la sensibilidad de las diferentes líneas celulares fue relativamente similares. Se observó en las células L929 y las células C2C12 que a partir de 0.001 mg/mL se produjo una disminución de la viabilidad celular significativamente diferente ($p < 0.05$).



Gráfica I. Efectos del complejo oseínico sobre la viabilidad celular a concentraciones entre 1×10^{-4} y 100 mg/mL durante 24 h. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT utilizando el 100% de viabilidad celular las células cultivadas en medio de cultivo en ausencia del complejo oseínico. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad celular para las células C2C12 y L929 que representan los valores Medios \pm de 3 réplicas realizadas en tres experimentos independientes.

En la gráfica se muestra el efecto de la viabilidad celular en dosis crecientes del complejo oseínico sobre la función mitocondrial determinada mediante el ensayo MTT. Los cultivos de células L929 y C2C12 se trataron con diferentes concentraciones del complejo oseínico durante 24 horas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realiza ANOVA de diseño mixto con ayuda del programa SPSS, versión 25.

Factores intra-sujetos

Medida: MEASURE_1

CONCEN- TRACIÓN	Variable depen- diente
1	CONC1
2	CONC2
3	CONC3
4	CONC4
5	CONC5
6	CONC6
7	CONC7
8	CONC8

9	CONC9
---	-------

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
CÉ- LUL A	1.0 0	L929	6
	2.0 0	C2C12	6

Estadísticos descriptivos

	CÉ- LUL A	Media	Desv. Desviación	N
CONC1	L929	500.45472 200	1.544808767	6
	C2C 12	704.61649 933	1.912295479	6
	Total	602.53561 067	106.632892125	12
CONC2	L929	536.96495 567	1.785675528	6
	C2C 12	728.90040 600	1.738033796	6
	Total	632.93268 083	100.249098058	12

RESULTADOS

CONC3	L929	463.62141 067	1.780653542	6
	C2C 12	679.61171 810	1.839772148	6
	Total	571.61656 438	112.810467019	12
CONC4	L929	321.69605 800	1.797210430	6
	C2C 12	553.33891 110	1.478324099	6
	Total	437.51748 455	120.981708315	12
CONC5	L929	300.86366 933	1.805965935	6
	C2C 12	559.74113 200	1.793859986	6
	Total	430.30240 067	135.205237682	12
CONC6	L929	294.46515 500	1.533137623	6
	C2C 12	514.64340 378	1.814593299	6
	Total	404.55427 939	114.995493985	12
CONC7	L929	280.65984 910	1.807123491	6
	C2C 12	487.47734 187	2.041063843	6
	Total	384.06859 548	108.022549888	12

RESULTADOS

CONC8	L929	269.71392 333	1.859502147	6
	C2C 12	458.69215 900	1.874804352	6
	Total	364.20304 117	98.706720719	12
CONC9	L929	243.76529 782	1.738061561	6
	C2C 12	438.81954 533	1.793376354	6
	Total	341.29242 158	101.877673395	12

Pruebas multivariante

Efecto		Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada
CONCENTRACIÓN	Traza de Pillai	1.000 0	2431 8081 .796	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	9727 2327 .182	1.00 0
	Lambda de Wilks	.000	2431 8081 .813	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	9727 2327 .182	1.00 0
	Traza de Hotelling	1389 6046 .750	2431 8081 .813	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	9727 2327 .182	1.00 0

RESULTADOS

	Raíz mayor de Roy	1389 6046 .750	2431 8081 .813	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	9727 2327 .182	1.00 0
CONCEN- TRACIÓN * CÉ- LULA	Traza de Pillai	1.00 0	2808 33.2 04	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	1123 332. 818	1.00 0
	Lambda de Wilks	.000	2808 33.2 04	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	1123 332. 818	1.00 0
	Traza de Hotelling	1604 76.1 17	2808 33.2 04	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	1123 332. 818	1.00 0
	Raíz mayor de Roy	1604 76.1 17	2808 33.2 04	4.00 0	7.0 00	.0 0 0	1.00 0	1123 332. 818	1.00 0

Prueba de esfericidad de Mauchly

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
CONCEN- TRACIÓN	.000	.	35	.	.416	.710	.125

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: MEASURE_1

RESULTADOS

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Si g.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada
CONCENTRACIÓN	Esfericidad asumida	1152 990. 482	8	1441 23.8 10	4226 755. 116	.0 0 0	1.00 0	3381 4040 .925	1.00 0
	Greenhouse-Geisser	1152 990. 482	3. 3 2 6	3466 42.6 26	4226 755. 116	.0 0 0	1.00 0	1405 8883 .860	1.00 0
	Huynh-Feldt	1152 990. 482	5. 6 8 1	2029 55.9 85	4226 755. 116	.0 0 0	1.00 0	2401 2144 .444	1.00 0
	Límite inferior	1152 990. 482	1. 0 0 0	1152 990. 482	4226 755. 116	.0 0 0	1.00 0	4226 755. 116	1.00 0
CONCENTRACIÓN * CÉ-LULA	Esfericidad asumida	1191 1.97 2	8	1488 .997	4366 8.17 5	.0 0 0	1.00 0	3493 45.3 98	1.00 0
	Greenhouse-Geisser	1191 1.97 2	3. 3 2 6	3581 .294	4366 8.17 5	.0 0 0	1.00 0	1452 47.5 44	1.00 0
	Huynh-Feldt	1191 1.97 2	5. 6 8 1	2096 .814	4366 8.17 5	.0 0 0	1.00 0	2480 78.3 70	1.00 0

RESULTADOS

	Límite inferior	1191 1.97 2	1. 0 0 0	1191 1.97 2	4366 8.17 5	.0 0 0	1.00 0	4366 8.17 5	1.00 0
Error(CONCENTRACIÓN)	Esfericidad asumida	2.72 8	8 0	.034					
	Greenhouse-Geisser	2.72 8	3 3. 2 6 2	.082					
	Huynh-Feldt	2.72 8	5 6. 8 1 0	.048					
	Límite inferior	2.72 8	1 0. 0 0 0	.273					

Existe una interacción significativa de los factores concentración x célula en la variable viabilidad celular $F(8, 80) = 43668.175$, $p < 0.05$, $n_2 = 1.00$; es decir, el 100% de la varianza se explica por la interacción de los 2 factores.

SIGNIFICADO: El comportamiento de la viabilidad celular no es el mismo si se realiza con la célula L929 o con la célula C2C12, y además no se comporta de la misma manera a diferentes concentraciones.

Pruebas de contrastes intra-sujetos

RESULTADOS

Medida: MEASURE_1

Origen	CONCEN- TRACION	Tipo III de sum a de cua- dra- dos	gl	Me- dia cua- drá- tica	F	Si g.	Eta par- cial al cua- drad o	Pa- rá- me- tro sin cen- trali- dad	Po- ten- cia ob- ser- vada
CONCEN- TRACION	Lineal	1020 815. 741	1	1020 815. 741	4952 8927 .091	.0 0 0	1.00 0	4952 8927 .091	1.00 0
	Cua- drático	3492 5.50 1	1	3492 5.50 1	3812 718. 532	.0 0 0	1.00 0	3812 718. 532	1.00 0
	Cúbico	1113 5.91 7	1	1113 5.91 7	1665 16.7 52	.0 0 0	1.00 0	1665 16.7 52	1.00 0
	Orden 4	5092 2.12 3	1	5092 2.12 3	2445 213. 104	.0 0 0	1.00 0	2445 213. 104	1.00 0
	Orden 5	1914 9.45 6	1	1914 9.45 6	4265 39.1 80	.0 0 0	1.00 0	4265 39.1 80	1.00 0
	Orden 6	43.8 93	1	43.8 93	2827 .625	.0 0 0	.996	2827 .625	1.00 0
	Orden 7	9245 .505	1	9245 .505	1847 19.6 78	.0 0 0	1.00 0	1847 19.6 78	1.00 0
	Orden 8	6752 .345	1	6752 .345	1505 78.4 06	.0 0 0	1.00 0	1505 78.4 06	1.00 0

RESULTADOS

CONCEN- TRACIÓN * CÉ- LULA	Lineal	282. 091	1	282. 091	1368 6.74 5	.0 0 0	.999	1368 6.74 5	1.00 0
	Cua- drático	6215 .732	1	6215 .732	6785 53.9 39	.0 0 0	1.00 0	6785 53.9 39	1.00 0
	Cúbico	40.5 11	1	40.5 11	605. 769	.0 0 0	.984	605. 769	1.00 0
	Orden 4	4154 .859	1	4154 .859	1995 10.8 40	.0 0 0	1.00 0	1995 10.8 40	1.00 0
	Orden 5	132. 505	1	132. 505	2951 .449	.0 0 0	.997	2951 .449	1.00 0
	Orden 6	138. 761	1	138. 761	8939 .041	.0 0 0	.999	8939 .041	1.00 0
	Orden 7	5.79 8	1	5.79 8	115. 838	.0 0 0	.921	115. 838	1.00 0
	Orden 8	941. 716	1	941. 716	2100 0.42 3	.0 0 0	1.00 0	2100 0.42 3	1.00 0
	Error(CON CENTRA- CIÓN)	Lineal	.206	1 0	.021				
Cua- drático		.092	1 0	.009					
Cúbico		.669	1 0	.067					
Orden 4		.208	1 0	.021					

RESULTADOS

Orden 5	.449	1 0	.045					
Orden 6	.155	1 0	.016					
Orden 7	.501	1 0	.050					
Orden 8	.448	1 0	.045					

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
CON C1	Se basa en la media	.627	1	10	.447
	Se basa en la me- diana	.133	1	10	.723
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.133	1	8.938	.724
	Se basa en la media recortada	.580	1	10	.464
CON C2	Se basa en la media	.002	1	10	.961
	Se basa en la me- diana	.004	1	10	.953
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.004	1	9.994	.953

RESULTADOS

	Se basa en la media recortada	.003	1	10	.961
CON C3	Se basa en la media	.071	1	10	.795
	Se basa en la mediana	.002	1	10	.966
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.002	1	9.860	.966
	Se basa en la media recortada	.064	1	10	.805
CON C4	Se basa en la media	.384	1	10	.549
	Se basa en la mediana	.142	1	10	.714
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.142	1	9.459	.714
	Se basa en la media recortada	.364	1	10	.560
CON C5	Se basa en la media	.002	1	10	.963
	Se basa en la mediana	.000	1	10	.984
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.000	1	9.998	.984
	Se basa en la media recortada	.002	1	10	.966
	Se basa en la media	.316	1	10	.587

RESULTADOS

CON C6	Se basa en la me- diana	.109	1	10	.748
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.109	1	9.482	.748
	Se basa en la media recortada	.300	1	10	.596
CON C7	Se basa en la media	.046	1	10	.835
	Se basa en la me- diana	.077	1	10	.787
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.077	1	9.968	.787
	Se basa en la media recortada	.047	1	10	.832
CON C8	Se basa en la media	.028	1	10	.872
	Se basa en la me- diana	.000	1	10	.986
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.000	1	9.858	.986
	Se basa en la media recortada	.024	1	10	.881
CON C9	Se basa en la media	.000	1	10	.985
	Se basa en la me- diana	.005	1	10	.944
	Se basa en la me- diana y con gl ajus- tado	.005	1	9.994	.944

Se basa en la media recortada	.001	1	10	.983
-------------------------------	------	---	----	------

Pruebas de efectos inter-sujetos

Medida: MEASURE_1

Variable transformada: Promedio

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada
Intersección	231743 37.908	1	231743 37.908	82117 2.433	.00 0	1.000	821172 .433	1.000
CÉLULA	122066 7.677	1	122066 7.677	43253. 820	.00 0	1.000	43253. 820	1.000
Error	282.21 0	10	28.221					

C

Existe un efecto principal significativo de la célula en la viabilidad celular $F(1,10)=821172.433$, $p<0.05$, $n_2=1.00$; es decir, el 100% de las varianzas se explica por la diferencia entre células sin tener en cuenta el resto de las variables.

SIGNIFICADO: Si se ignoran el resto de las variables, hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular según la línea celular.

Medias marginales estimadas

1. CÉLULA

Estimaciones

Medida: MEASURE_1

CÉ- LULA A	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite in- ferior	Límite su- perior
L929	356.91 2	.723	355.301	358.522
C2C 12	569.53 8	.723	567.927	571.149

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

(I) CÉ- LULA	(J) CÉ- LULA	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de con- fianza para diferencia	
					Límite in- ferior	Límite su- perior
L929	C2C12	-212.626	1.022	.000	-214.904	-210.348
C2C12	L929	212.626	1.022	.000	210.348	214.904

Pruebas univariadas

Medida: MEASURE_1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada
Contraste	135629.742	1	135629.742	43253.820	.000	1.000	43253.820	1.000
Error	31.357	10	3.136					

2. CONCENTRACIÓN

Estimaciones

Medida: MEASURE_1

CONCENTRACIÓN	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	602.536	.502	601.418	603.654
2	632.933	.509	631.799	634.066
3	571.617	.523	570.452	572.781
4	437.517	.475	436.459	438.576

RESULTADOS

5	430.30 2	.520	429.145	431.460
6	404.55 4	.485	403.474	405.635
7	384.06 9	.556	382.829	385.308
8	364.20 3	.539	363.002	365.404
9	341.29 2	.510	340.157	342.428

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

(I) CONCEN- TRACIÓN	(J) CONCEN- TRACIÓN	Diferen- cia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza para dife- rencia	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-30.397	.102	.000	-30.842	-29.953
	3	30.919	.066	.000	30.630	31.208
	4	165.018	.113	.000	164.526	165.510
	5	172.233	.087	.000	171.851	172.615
	6	197.981	.038	.000	197.815	198.147
	7	218.467	.095	.000	218.050	218.884
	8	238.333	.067	.000	238.040	238.625
	9	261.243	.100	.000	260.804	261.682
2	1	30.397	.102	.000	29.953	30.842

RESULTADOS

	3	61.316	.051	.000	61.091	61.541
	4	195.415	.085	.000	195.044	195.786
	5	202.630	.021	.000	202.537	202.723
	6	228.378	.073	.000	228.061	228.696
	7	248.864	.079	.000	248.520	249.208
	8	268.730	.073	.000	268.411	269.049
	9	291.640	.020	.000	291.553	291.728
3	1	-30.919	.066	.000	-31.208	-30.630
	2	-61.316	.051	.000	-61.541	-61.091
	4	134.099	.097	.000	133.675	134.523
	5	141.314	.032	.000	141.172	141.456
	6	167.062	.055	.000	166.823	167.301
	7	187.548	.077	.000	187.212	187.884
	8	207.414	.034	.000	207.263	207.564
	9	230.324	.060	.000	230.063	230.585
4	1	-165.018	.113	.000	-165.510	-164.526
	2	-195.415	.085	.000	-195.786	-195.044
	3	-134.099	.097	.000	-134.523	-133.675
	5	7.215	.087	.000	6.836	7.594
	6	32.963	.095	.000	32.546	33.381
	7	53.449	.118	.000	52.932	53.965
	8	73.314	.094	.000	72.905	73.723
	9	96.225	.090	.000	95.830	96.620
5	1	-172.233	.087	.000	-172.615	-171.851
	2	-202.630	.021	.000	-202.723	-202.537

RESULTADOS

	3	-141.314	.032	.000	-141.456	-141.172
	4	-7.215	.087	.000	-7.594	-6.836
	6	25.748	.064	.000	25.467	26.030
	7	46.234	.068	.000	45.937	46.530
	8	66.099	.053	.000	65.869	66.330
	9	89.010	.031	.000	88.875	89.144
6	1	-197.981	.038	.000	-198.147	-197.815
	2	-228.378	.073	.000	-228.696	-228.061
	3	-167.062	.055	.000	-167.301	-166.823
	4	-32.963	.095	.000	-33.381	-32.546
	5	-25.748	.064	.000	-26.030	-25.467
	7	20.486	.087	.000	20.107	20.865
	8	40.351	.070	.000	40.046	40.656
	9	63.262	.070	.000	62.956	63.568
7	1	-218.467	.095	.000	-218.884	-218.050
	2	-248.864	.079	.000	-249.208	-248.520
	3	-187.548	.077	.000	-187.884	-187.212
	4	-53.449	.118	.000	-53.965	-52.932
	5	-46.234	.068	.000	-46.530	-45.937
	6	-20.486	.087	.000	-20.865	-20.107
	8	19.866	.072	.000	19.551	20.180
	9	42.776	.067	.000	42.483	43.070
8	1	-238.333	.067	.000	-238.625	-238.040
	2	-268.730	.073	.000	-269.049	-268.411
	3	-207.414	.034	.000	-207.564	-207.263

RESULTADOS

	4	-73.314	.094	.000	-73.723	-72.905
	5	-66.099	.053	.000	-66.330	-65.869
	6	-40.351	.070	.000	-40.656	-40.046
	7	-19.866	.072	.000	-20.180	-19.551
	9	22.911	.079	.000	22.566	23.256
9	1	-261.243	.100	.000	-261.682	-260.804
	2	-291.640	.020	.000	-291.728	-291.553
	3	-230.324	.060	.000	-230.585	-230.063
	4	-96.225	.090	.000	-96.620	-95.830
	5	-89.010	.031	.000	-89.144	-88.875
	6	-63.262	.070	.000	-63.568	-62.956
	7	-42.776	.067	.000	-43.070	-42.483
	8	-22.911	.079	.000	-23.256	-22.566

Pruebas multivariante

	Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Sig .	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada
Traza de Pillai	1.000	99540 347.9 22	4.000	7.00 0	.00 0	1.000	39816 1391. 687	1.000
Lambda de Wilks	.000	99540 348.0 39	4.000	7.00 0	.00 0	1.000	39816 1391. 687	1.000

RESULTADOS

Traza de Hotelling	56880 198.8 79	99540 348.0 39	4.000	7.00 0	.00 0	1.000	39816 1391. 687	1.000
Raíz mayor de Roy	56880 198.8 79	99540 348.0 39	4.000	7.00 0	.00 0	1.000	39816 1391. 687	1.000

3. CÉLULA * CONCENTRACIÓN

Estimaciones

Medida: MEASURE_1

CÉ- LUL A	CONCEN- TRACIÓN	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite in- ferior	Límite su- perior
L929	1	500.45 5	.710	498.874	502.036
	2	536.96 5	.719	535.362	538.568
	3	463.62 1	.739	461.975	465.268
	4	321.69 6	.672	320.199	323.193
	5	300.86 4	.735	299.226	302.501
	6	294.46 5	.686	292.937	295.993

RESULTADOS

	7	280.66 0	.787	278.906	282.413
	8	269.71 4	.762	268.015	271.412
	9	243.76 5	.721	242.159	245.372
C2C 12	1	704.61 6	.710	703.035	706.198
	2	728.90 0	.719	727.298	730.503
	3	679.61 2	.739	677.965	681.259
	4	553.33 9	.672	551.842	554.836
	5	559.74 1	.735	558.104	561.378
	6	514.64 3	.686	513.115	516.171
	7	487.47 7	.787	485.724	489.231
	8	458.69 2	.762	456.994	460.391
	9	438.82 0	.721	437.213	440.426

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

RESULTADOS

CÉ LU LA	(I) CON- CENTRA- CIÓN	(J) CON- CENTRA- CIÓN	Dife- rencia de me- dias (I- J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza para diferencia	
						Límite inferior	Límite supe- rior
L9 29	1	2	-36.510	.144	.00 0	-37.139	-35.882
		3	36.833	.093	.00 0	36.424	37.242
		4	178.75 9	.159	.00 0	178.06 3	179.45 5
		5	199.59 1	.124	.00 0	199.05 1	200.13 2
		6	205.99 0	.054	.00 0	205.75 5	206.22 4
		7	219.79 5	.135	.00 0	219.20 6	220.38 4
		8	230.74 1	.094	.00 0	230.32 8	231.15 4
		9	256.68 9	.142	.00 0	256.06 9	257.31 0
		2	1	1	36.510	.144	.00 0
3	73.344			.073	.00 0	73.025	73.662
4	215.26 9			.120	.00 0	214.74 4	215.79 4
5	236.10 1			.030	.00 0	235.97 0	236.23 3
6	242.50 0			.103	.00 0	242.05 1	242.94 9

RESULTADOS

	7	256.30 5	.111	.00 0	255.81 9	256.79 1
	8	267.25 1	.103	.00 0	266.80 0	267.70 2
	9	293.20 0	.028	.00 0	293.07 6	293.32 3
3	1	-36.833	.093	.00 0	-37.242	-36.424
	2	-73.344	.073	.00 0	-73.662	-73.025
	4	141.92 5	.137	.00 0	141.32 6	142.52 5
	5	162.75 8	.046	.00 0	162.55 7	162.95 9
	6	169.15 6	.077	.00 0	168.81 9	169.49 4
	7	182.96 2	.109	.00 0	182.48 6	183.43 7
	8	193.90 7	.049	.00 0	193.69 5	194.12 0
	9	219.85 6	.084	.00 0	219.48 7	220.22 6
4	1	- 178.75 9	.159	.00 0	- 179.45 5	- 178.06 3
	2	- 215.26 9	.120	.00 0	- 215.79 4	- 214.74 4
	3	- 141.92 5	.137	.00 0	- 142.52 5	- 141.32 6

RESULTADOS

	5	20.832	.123	.00 0	20.296	21.368
	6	27.231	.135	.00 0	26.640	27.821
	7	41.036	.167	.00 0	40.306	41.767
	8	51.982	.132	.00 0	51.404	52.561
	9	77.931	.128	.00 0	77.372	78.489
5	1	- 199.59 1	.124	.00 0	- 200.13 2	- 199.05 1
	2	- 236.10 1	.030	.00 0	- 236.23 3	- 235.97 0
	3	- 162.75 8	.046	.00 0	- 162.95 9	- 162.55 7
	4	-20.832	.123	.00 0	-21.368	-20.296
	6	6.399	.091	.00 0	6.000	6.797
	7	20.204	.096	.00 0	19.785	20.623
	8	31.150	.075	.00 0	30.824	31.476
	9	57.098	.043	.00 0	56.908	57.289
6	1	- 205.99 0	.054	.00 0	- 206.22 4	- 205.75 5

RESULTADOS

	2	- 242.50 0	.103	.00 0	- 242.94 9	- 242.05 1
	3	- 169.15 6	.077	.00 0	- 169.49 4	- 168.81 9
	4	-27.231	.135	.00 0	-27.821	-26.640
	5	-6.399	.091	.00 0	-6.797	-6.000
	7	13.805	.123	.00 0	13.269	14.341
	8	24.751	.099	.00 0	24.320	25.182
	9	50.700	.099	.00 0	50.267	51.133
7	1	- 219.79 5	.135	.00 0	- 220.38 4	- 219.20 6
	2	- 256.30 5	.111	.00 0	- 256.79 1	- 255.81 9
	3	- 182.96 2	.109	.00 0	- 183.43 7	- 182.48 6
	4	-41.036	.167	.00 0	-41.767	-40.306
	5	-20.204	.096	.00 0	-20.623	-19.785
	6	-13.805	.123	.00 0	-14.341	-13.269

RESULTADOS

	8	10.946	.102	.00 0	10.502	11.390
	9	36.895	.095	.00 0	36.480	37.310
8	1	- 230.74 1	.094	.00 0	- 231.15 4	- 230.32 8
	2	- 267.25 1	.103	.00 0	- 267.70 2	- 266.80 0
	3	- 193.90 7	.049	.00 0	- 194.12 0	- 193.69 5
	4	-51.982	.132	.00 0	-52.561	-51.404
	5	-31.150	.075	.00 0	-31.476	-30.824
	6	-24.751	.099	.00 0	-25.182	-24.320
	7	-10.946	.102	.00 0	-11.390	-10.502
	9	25.949	.112	.00 0	25.461	26.437
9	1	- 256.68 9	.142	.00 0	- 257.31 0	- 256.06 9
	2	- 293.20 0	.028	.00 0	- 293.32 3	- 293.07 6
	3	- 219.85 6	.084	.00 0	- 220.22 6	- 219.48 7

RESULTADOS

		4	-77.931	.128	.00 0	-78.489	-77.372
		5	-57.098	.043	.00 0	-57.289	-56.908
		6	-50.700	.099	.00 0	-51.133	-50.267
		7	-36.895	.095	.00 0	-37.310	-36.480
		8	-25.949	.112	.00 0	-26.437	-25.461
C2	1	2	-24.284	.144	.00 0	-24.912	-23.655
C1		3	25.005	.093	.00 0	24.596	25.414
2		4	151.27 8	.159	.00 0	150.58 2	151.97 4
		5	144.87 5	.124	.00 0	144.33 5	145.41 6
		6	189.97 3	.054	.00 0	189.73 8	190.20 8
		7	217.13 9	.135	.00 0	216.55 0	217.72 8
		8	245.92 4	.094	.00 0	245.51 1	246.33 8
		9	265.79 7	.142	.00 0	265.17 6	266.41 8
	2	1	24.284	.144	.00 0	23.655	24.912
		3	49.289	.073	.00 0	48.970	49.607

RESULTADOS

	4	175.56 1	.120	.00 0	175.03 7	176.08 6
	5	169.15 9	.030	.00 0	169.02 8	169.29 1
	6	214.25 7	.103	.00 0	213.80 8	214.70 6
	7	241.42 3	.111	.00 0	240.93 7	241.90 9
	8	270.20 8	.103	.00 0	269.75 7	270.65 9
	9	290.08 1	.028	.00 0	289.95 7	290.20 4
3	1	-25.005	.093	.00 0	-25.414	-24.596
	2	-49.289	.073	.00 0	-49.607	-48.970
	4	126.27 3	.137	.00 0	125.67 3	126.87 3
	5	119.87 1	.046	.00 0	119.67 0	120.07 1
	6	164.96 8	.077	.00 0	164.63 1	165.30 6
	7	192.13 4	.109	.00 0	191.65 9	192.61 0
	8	220.92 0	.049	.00 0	220.70 7	221.13 2
	9	240.79 2	.084	.00 0	240.42 3	241.16 2
4	1	- 151.27 8	.159	.00 0	- 151.97 4	- 150.58 2

RESULTADOS

	2	- 175.56 1	.120	.00 0	- 176.08 6	- 175.03 7
	3	- 126.27 3	.137	.00 0	- 126.87 3	- 125.67 3
	5	-6.402	.123	.00 0	-6.938	-5.866
	6	38.696	.135	.00 0	38.105	39.286
	7	65.862	.167	.00 0	65.131	66.592
	8	94.647	.132	.00 0	94.068	95.225
	9	114.51 9	.128	.00 0	113.96 1	115.07 8
5	1	- 144.87 5	.124	.00 0	- 145.41 6	- 144.33 5
	2	- 169.15 9	.030	.00 0	- 169.29 1	- 169.02 8
	3	- 119.87 1	.046	.00 0	- 120.07 1	- 119.67 0
	4	6.402	.123	.00 0	5.866	6.938
	6	45.098	.091	.00 0	44.699	45.496
	7	72.264	.096	.00 0	71.844	72.683

RESULTADOS

	8	101.04	.075	.00	100.72	101.37
		9		0	3	5
	9	120.92	.043	.00	120.73	121.11
		2		0	1	2
6	1	-	.054	.00	-	-
		189.97		0	190.20	189.73
		3			8	8
	2	-	.103	.00	-	-
		214.25		0	214.70	213.80
		7			6	8
	3	-	.077	.00	-	-
		164.96		0	165.30	164.63
		8			6	1
	4	-38.696	.135	.00	-39.286	-38.105
				0		
	5	-45.098	.091	.00	-45.496	-44.699
				0		
	7	27.166	.123	.00	26.630	27.702
				0		
	8	55.951	.099	.00	55.520	56.382
				0		
	9	75.824	.099	.00	75.391	76.257
				0		
7	1	-	.135	.00	-	-
		217.13		0	217.72	216.55
		9			8	0
	2	-	.111	.00	-	-
		241.42		0	241.90	240.93
		3			9	7
	3	-	.109	.00	-	-
		192.13		0	192.61	191.65
		4			0	9

RESULTADOS

	4	-65.862	.167	.00 0	-66.592	-65.131
	5	-72.264	.096	.00 0	-72.683	-71.844
	6	-27.166	.123	.00 0	-27.702	-26.630
	8	28.785	.102	.00 0	28.341	29.229
	9	48.658	.095	.00 0	48.243	49.073
8	1	- 245.92 4	.094	.00 0	- 246.33 8	- 245.51 1
	2	- 270.20 8	.103	.00 0	- 270.65 9	- 269.75 7
	3	- 220.92 0	.049	.00 0	- 221.13 2	- 220.70 7
	4	-94.647	.132	.00 0	-95.225	-94.068
	5	- 101.04 9	.075	.00 0	- 101.37 5	- 100.72 3
	6	-55.951	.099	.00 0	-56.382	-55.520
	7	-28.785	.102	.00 0	-29.229	-28.341
	9	19.873	.112	.00 0	19.385	20.361

RESULTADOS

9	1	- 265.79 7	.142	.00 0	- 266.41 8	- 265.17 6
	2	- 290.08 1	.028	.00 0	- 290.20 4	- 289.95 7
	3	- 240.79 2	.084	.00 0	- 241.16 2	- 240.42 3
	4	- 114.51 9	.128	.00 0	- 115.07 8	- 113.96 1
	5	- 120.92 2	.043	.00 0	- 121.11 2	- 120.73 1
	6	-75.824	.099	.00 0	-76.257	-75.391
	7	-48.658	.095	.00 0	-49.073	-48.243
	8	-19.873	.112	.00 0	-20.361	-19.385

Se realiza prueba Bonferroni para comparaciones múltiples con un nivel de significancia del 5%, cuyo resultado sugiere que existe diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones de cada línea celular ($p < 0.05$).

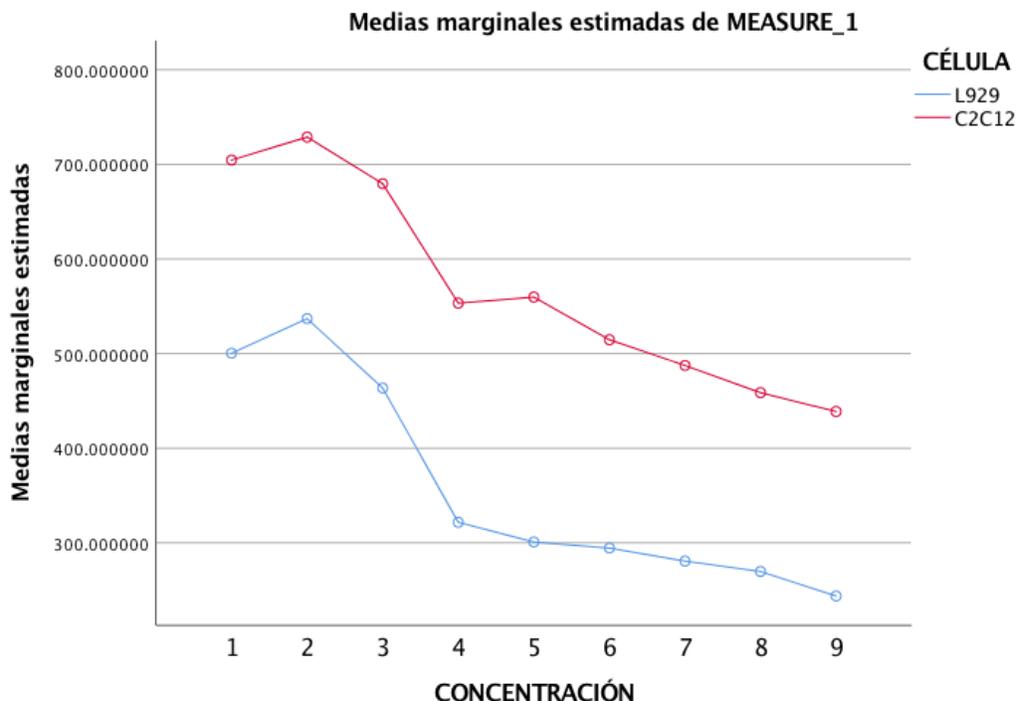
Pruebas multivariante

CÉLULA	Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Si g.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada

RESULTADOS

L 9 2 9	Traza de Pillai	1.000	6704 2865. 503	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	2681 7146 2.011	1.000
	Lambda de Wilks	.000	6704 2865. 560	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	2681 7146 2.011	1.000
	Traza de Hotelling	3831 0208. 891	6704 2865. 560	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	2681 7146 2.011	1.000
	Raíz mayor de Roy	3831 0208. 891	6704 2865. 560	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	2681 7146 2.011	1.000
C 2 C 1 2	Traza de Pillai	1.000	3506 8886. 221	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	1402 7554 4.883	1.000
	Lambda de Wilks	.000	3506 8886. 246	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	1402 7554 4.883	1.000
	Traza de Hotelling	2003 9363. 569	3506 8886. 246	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	1402 7554 4.883	1.000
	Raíz mayor de Roy	2003 9363. 569	3506 8886. 246	4.000	7.00 0	.0 00	1.000	1402 7554 4.883	1.000

Gráficos de perfil



RESÚMEN DE RESULTADOS

1. Existe una interacción significativa de los factores concentración x célula en la variable viabilidad celular $F(8, 80) = 43668.175$, $p < 0.05$, $n^2 = 1.00$; es decir, el 100% de la varianza se explica por la interacción de los 2 factores.
2. Existe un efecto principal significativo de la célula en la viabilidad celular $F(1,10) = 821172.433$, $p < 0.05$, $n^2 = 1.00$; es decir, el 100% de las varianzas se explica por la diferencia entre células sin tener en cuenta el resto de las variables.
3. Se realiza prueba Bonferroni para comparaciones múltiples con un nivel de significancia del 5%, cuyo resultado sugiere que existe diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones de cada línea celular ($p < 0.05$).

L929

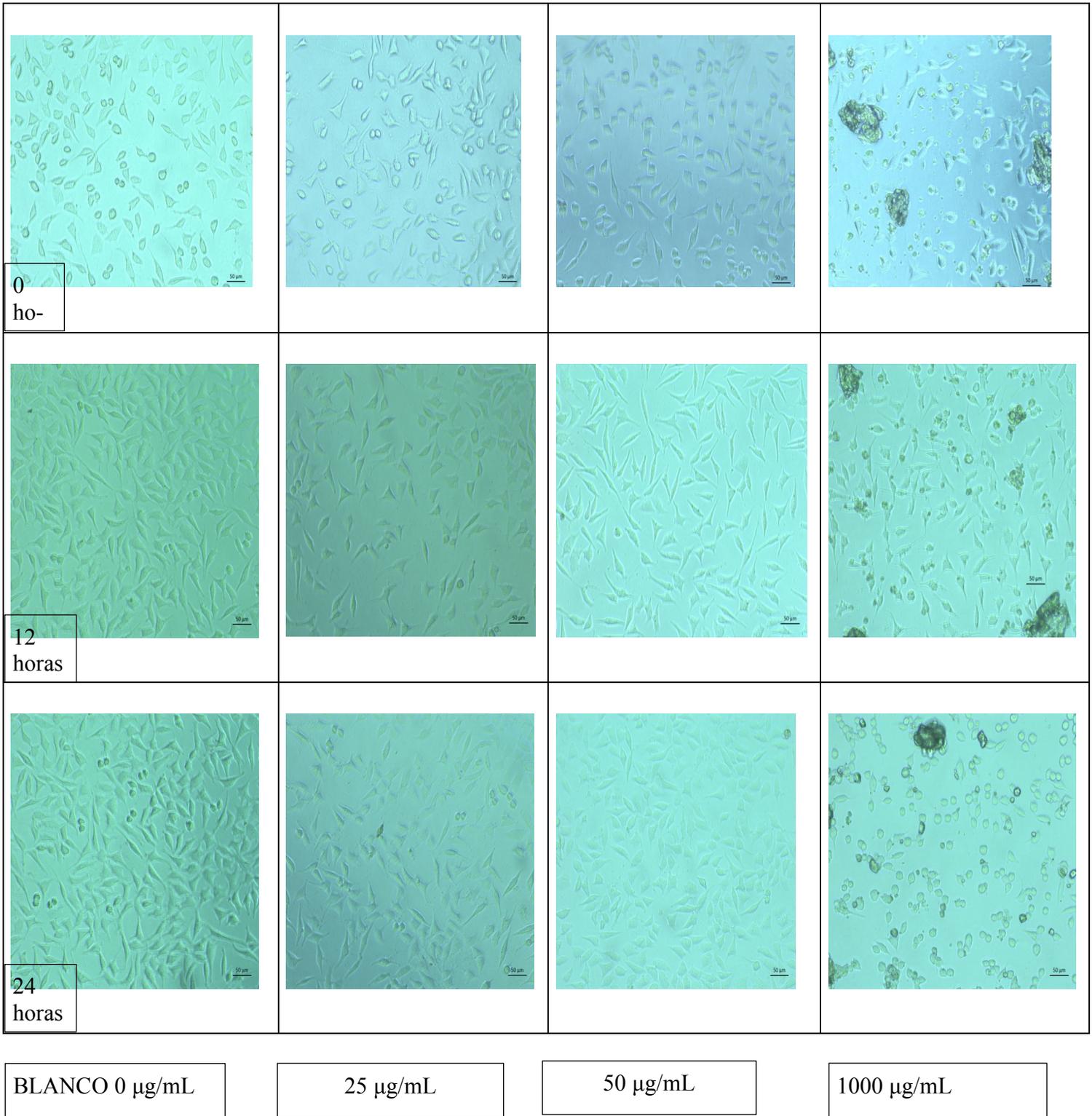
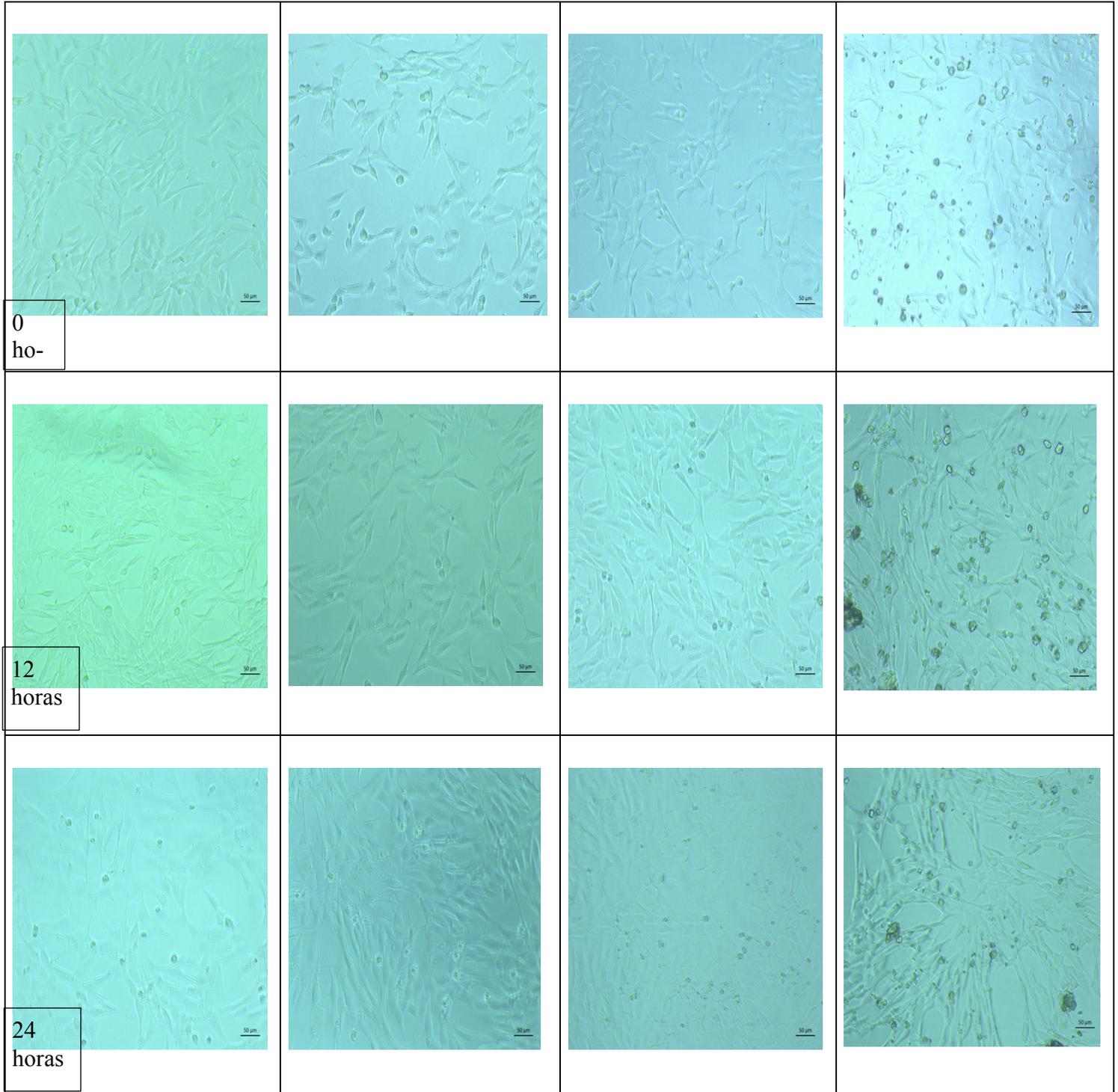


FIGURA VI. Se presenta imágenes de la línea celular L929 a las 0,12 y 24 horas a 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de complejo oseínico respectivamente.

La línea celular L929 corresponde a fibroblastos de ratón de la cepa L, derivada de tejido areolar subcutáneo normal y tejido adiposo de un ratón C34/An, macho de 100 días. Comúnmente utilizada para estudios de viabilidad celular. Como se muestra en la imagen 1 se exponen la cinética celular a las 0, 12 y 24 horas que muestra la morfología de los fibroblastos controles y las células expuestas al complejo oseínico a 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Como se observa en la primera columna del control los fibroblastos mantienen la división celular esperada para el medio de cultivo donde se encuentran, a medida que aumenta la concentración del complejo oseínico se observa aglomeración del material con modificación de la morfología celular, presentando reducción del citoplasma y pérdida de adhesión celular entre los fibroblastos. Las imágenes se presentan a escala de 50 μm .

C2C12



0
ho-

12
horas

24
horas

BLANCO 0 µg/mL

25 µg/mL

50 µg/mL

100 µg/mL

FIGURA VII. Se presenta imágenes de la línea celular C2C12 a las 0, 12 y 24 horas a 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de complejo oseínico respectivamente.

La línea celular C212 corresponde a mioblastos (células de músculo) de ratón con modo de crecimiento adherente. Comúnmente utilizada para estudios de citotoxicidad. Como se muestra en la figura VII se exponen la cinética celular a las 0, 12 y 24 horas que muestra la morfología de los mioblastos controles y los expuestos al complejo oseínico a 0, 25, 50 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Como se observa en la primer columna del control los mioblastos mantienen la división celular esperada para el medio de cultivo donde se encuentran, a medida que aumenta la concentración del complejo oseínico se observa aglomeración del material con modificación de la morfología celular. Reducción del citoplasma y pérdida de adhesión celular entre los fibroblastos. Las imágenes se presentan a escala de 50 μm .

DISCUSIÓN

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se utilizan como una evaluación de primera instancia cuando se trabaja con nuevos biomateriales, o en el caso del complejo oseínico (ossopan), para considerar la posibilidad de un nuevo uso de manera local en defectos óseos maxilares. Existe una gran variedad de pruebas de laboratorio que reflejan resultados equivalentes cuando se usan para determinar la respuesta tisular (28). La mayoría de las pruebas actuales determinan el nivel de supervivencia celular después de la exposición a un compuesto frente a la misma cantidad de células de control no expuestas.

Se han utilizado diversas técnicas para cuantificar el número de células viables en el área de la odontología (31). En el presente estudio, se eligió el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de dimetiltiazoldifeniltetrazol; azul de tiazolilo) con fibroblastos L929 y mioblastos C2C12, elegidos para demostrar citotoxicidad, ya que son líneas bien establecidas y genéticamente idénticas entre sí (32). Así, el experimento es reproducible y estandarizado. Los fibroblastos u osteoblastos gingivales primarios que se han utilizado en otros experimentos *in vitro* (33), que poseen estas propiedades y se esperan resultados variables, ya que el linaje es inconsistente (33). El comportamiento de las células L929 se ha comparado con los fibroblastos gingivales; su fisiología y propiedades adhesivas han sido similares (34). El presente estudio demostró que aunque el comportamiento fue diferente entre una línea celulares C2C12 y L929 a las 24 horas de exposición, presentaron una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular entre las células L929 y las C2C12. Los resultados mostraron la citotoxicidad dependiente de la dosis, en concentraciones bajas del complejo oseínico (ossopan) provocaron un aumento significativo de la viabilidad celular en comparación con las células controles del complejo oseínico; Sin embargo pueden ser consideradas efectivas para mantener la viabilidad celular *in vitro*, cuando se presentaron concentraciones altas, ya que los grupos de dilución demostraron una morfología fibroblástica y una respuesta apoptótica similares al grupo control positivo con DMSO.

Los resultados del ensayo MTT demostraron que el complejo oseínico (ossopan) disminuye la capacidad de la viabilidad celular de una manera dosis dependiente en las dos líneas células probadas. Los resultados obtenidos demuestran diferencias significativas entre las dos tipos de líneas celulares (C2C12 y L929) en las diferentes dosis (0 y 10 mg/mL) del complejo oseínico (ossopan). La reducción del MTT fue más alta en las concentraciones del complejo oseínico entre 10 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente. El ensayo MTT correlaciona la funcionabilidad mitocondrial y la supervivencia de células, en donde diferentes mecanismos se han señalado sobre efectos tóxicos como el estrés oxidativo, efectos de coordinación y efectos no homeostáticos, ya que el complejo oseínico puede ser internalizada a través de la membrana de las células animales, los canales iónicos y las proteínas transportadoras para que crucen la membrana plasmática y puedan interactuar directamente con orgánulos oxidativos como las mitocondrias, las proteínas redox activas estimulan la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células y los iones Zn^{2+} generado reacciones químicas en la célula.

Las ROS pueden inducir daños en el ADN, y afectar la expresión génica. Además, los iones Zn^{2+} tienen la capacidad de formar quelatos con biomoléculas o desplazar a los iones metálicos en metaloproteínas específicas que podría resultar en la inactivación funcional de la proteína. Además el aumento de ROS inducido por el complejo oseínico puede inducir roturas de cadena simple o doble del ADN. Otra respuesta importante al estrés oxidativo es la liberación del Ca^{2+} intracelular, que conduce a la perturbación mitocondrial y la muerte celular. (34). Además, debido a la interacción compleja con otras vías de señalización, un canal de iones dado puede desempeñar un doble papel tanto en la proliferación celular como en la apoptosis. Se necesita investigación adicional para explicar los efectos beneficiosos potenciales del Ossopan y para cuantificar su concentración óptima para la preservación de la viabilidad celular.

CONCLUSIONES

Después de estandarizar los diferentes procesos en cultivo celular para mantener las líneas celulares C2C12 y L929 para la experimentación de viabilidad celular con el complejo oseínico mineral, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La citotoxicidad dependiente de la dosis y proporción al tiempo de exposición en las dos líneas celulares.
- Existen diferencias significativas entre las dos tipos de líneas celulares (C2C12 y L929) en las diferentes concentraciones de exposición (0 y 100 mg/mL) del complejo oseínico (ossopan).
- La reducción del MTT fue más alta en las concentraciones del complejo oseínico entre 0.0001 mg/mL y 0.001 mg/mL respectivamente con ambas líneas celulares.

DEDICATORIA

“A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos”

REFERENCIAS

1. Stephen Cohen KH. Vías de la Pulpa. 10ma Edici. Berman LH, editor. Elsevier Mosby; 2011.
2. Carlos Canalda Sahli EBA. Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas. 3era Edici. Elsevier Mosby; 2014.
3. Dedicated SC, Velayutham S, Krishna G. Grossman’s Endodontic Practice 12th Edition. Grossman’s Endodontic Practice. 342–60 p.
4. Soaresilson jose. Endodoncia, Técnica y Fundamentos. 2002. p. 325.
5. Hargraves, K., and Goodis H. Seltzer and Bender’s dental pulp, second edition. Vol. 213, Bdj. 2002. 141–141 p.
6. Villasana A. Patología pulpar y su diagnóstico. Salud Dent para Todos. 2002;1–35.
7. Márquez DQ. Patologías pulpares y periapicales más frecuentes en urgencias en 2 clínicas estomatológicas. Rev Cubana Estomatol. 2000;37(2):84–8.
8. López J. Etiología , clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2004;9(1):52–62.
9. Regalado GFA. Diagnóstico pulpar. Rev Mex Odontol Clínica. 2009;XI:10–6.
10. Beer R, Baumann MA, Kim S. Atlas de Endodoncia.
11. Carlos Estrela. Ciencia Endodontica. 1era Edici. Latinoamericana; 2005.
12. Kim S, Kratchman S. Modern Endodontic Surgery Concepts and Practice: A Review. J Endod. 2006;32(7):601–23.
13. Strbac GD, Schnappauf A, Giannis K, Moritz A, Ulm C. Guided Modern Endodontic Surgery: A Novel Approach for Guided Osteotomy and Root Resection. J Endod [Internet]. 2017;43(3):496–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.001>
14. Tsesis I, Faivishevsky V, Kfir A, Rosen E. Outcome of Surgical Endodontic Treatment Performed by a Modern Technique: A Meta-analysis of Literature. J Endod [Internet]. 2009;35(11):1505–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.07.025>
15. Tsesis I, Rosen E, Schwartz-Arad D, Fuss Z. Retrospective Evaluation of Surgical Endodontic Treatment: Traditional versus Modern Technique. J Endod. 2006;32(5):412–6.
16. Wang N, Knight K, Dao T, Friedman S. Treatment Outcome in Endodontics — The Toronto Study . Phases I and II : Apical Surgery come of apical surgery performed by graduate stu- and symptoms , Periapical Index score < 2 or scar), persistence for teeth with larger preoperative lesions. J Endod. 2004;30(11):751–61.
17. Simon S, Goldberg M. Regenerative endodontics: Regeneration or repair? Dent Pulp Biol Pathol Regen Ther. 2014;40(4):267–76.
18. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and Endodontic Regeneration. J Endod [Internet]. 2009;35(3):321–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.023>
19. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Av en Periodoncia e Implantol Oral. 2012;24(3):133–8.
20. Sesman-bernal AL, Le A, Fern G. Artículo de revisión Actualidades en regeneración y remodelación ósea craneal. Revisión de la literatura. Library (Lond). 2007;28(5):183–92.
21. M. Annefeld, Ph.D., R. Caviezel, M.D., E. Schacht, Ph.D., and K. H. Schicketanz MD. The influence of ossein- hydroxyapatite compound (‘Ossopan’) on the healing of a bone

- defect. 1986;10(4).
22. Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, Delmas PD, Chapuy MC, Meunier PJ. Effects of ossein-hydroxyapatite compound on ewe bone remodeling: Biochemical and histomorphometric study. *Clin Rheumatol.* 1991;10(3):269–73.
 23. Support CB. Ossopan.
 24. Clinical trial of microcrystalline hydroxyapatite compound in the prevention of osteoporosis due to corticosteroid therapy. 1984;8(10):734–42.
 25. Epstein OS, Kato FY, Dick R. Vitamin D, hydroxyapatite, and calcium gluconate in treatment of cortical bone in postmenopausal women with primary thinning biliary. 2018;(April):426–30.
 26. Francisco, D., Fernandez, L. Cirwan G. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel [Internet]. 2003;13. Available from: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
 27. Castro C De, Murcia TR De. Efectos citotoxicos in vitro de extractos y fracciones de *Espeletia killipii*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(1):12–6.
 28. León CJ, Gómez SM, Morantes SJ, Cordero CP, Aristizábal FA. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica.* 2014;26(1):161.
 29. Vicente, Rodriguez; Vicente, Ortega; Canteras J. Valor Del Ensayo Colorimétrico Con Mtt En El Estudio Del Crecimiento Y Citotoxicidad in Vitro De Lineas De Melanoma [Internet]. Vols. 30, Nº 1:, Patología. 1997. p. 10. Available from: <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/3.pdf>
 30. Escobar M. L, Rivera A, Aristizábal G. FA. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae.* 2010;17(1):67–74.
 31. Telli C, Serper A, Dogan AL, Guc D. Evaluation of the Cytotoxicity of Calcium Phosphate Root Canal Sealers by MTT Assay. 1999;25(12):811–3.
 32. Ninkov P, Kojic V. Cytotoxicity and Fibroblast Properties During In Vitro Test of Biphasic Calcium Phosphate / Poly-dl-lactide-co-glycolide Biocomposites and Different Phosphate Materials. 2006;982(March 2005):976–82.
 33. Olkowski R, Kaszczewski P, Czechowska J. Cytocompatibility of the selected calcium phosphate based bone cements : comparative study in human cell culture. 2015;
 34. Cehreli SB, Aylin O. In vitro evaluation of casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate as a potential tooth transport medium : viability and apoptosis in L929 fibroblasts. 2008;314–9.