

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* DE UN NUEVO CEMENTO A BASE DE
ALUMINATO DE CALCIO**



Investigador Principal

DIEGO ALEJANDRO VELÁSQUEZ PUERTA

Ing, MSc, PhD.

Co-Investigadoras

CAROLINA BERRUECOS

DDs, MSc (candidata)

MARÍA CATALINA CORTES MOTTA

DDs, MSc (candidata)

Asesor:

RAFAEL FERNANDEZ GRISALES

DDs, MSc (candidato)

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-

Área de Endodoncia

Grupo de Investigación:

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA BIOMÉDICA EIA-CES (GIBEC)

Biotecnología en salud

GRUPO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA EN ODONTOLOGÍA (CBO)

Ciencias Básicas Aplicadas a la odontología.

MEDELLÍN, 2017

UNIVERSIDAD CES



Autores

CAROLINA BERRUECOS

DDs, MSc (candidata)

MARÍA CATALINA CORTES MOTTA

DDs, MSc (candidata)

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* DE UN NUEVO CEMENTO A BASE DE
ALUMINATO DE CALCIO**

Informe final de investigación

Presentado al programa de Maestría en Ciencias
Odontológicas de la universidad CES de Medellín, para optar al título de
Magister en Ciencias Odontológicas

Director de Tesis:

DIEGO ALEJANDRO VELÁSQUEZ PUERTA

Ing, MSc, PhD.

Asesor:

RAFAEL FERNANDEZ GRISALES

DDs, MSc (candidato)

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA BIOMÉDICA EIA-CES (GIBEC)

Bioteología en salud

GRUPO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA EN ODONTOLOGÍA (CBO)

Ciencias Básicas Aplicadas a la odontología.

Medellín, 2017

RESUMEN

Introducción: El objetivo de este estudio fue evaluar in vitro la hemocompatibilidad y la genotoxicidad un nuevo material biocerámico a base de aluminato de calcio Endobinder y el MTA Angelus. **Métodos:** Para el test de hemocompatibilidad se evaluó hemólisis y cuantificación de fibrinógeno a partir de muestras de sangre humana que se pusieron en contacto con cada uno de los materiales. La evaluación de genotoxicidad se realizó mediante un ensayo cometa donde cada uno de los cementos fueron inmersos en un medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se obtuvo un sobrenadante de esta inmersión donde una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) y fue cultivada por 24 horas para analizar el DNA para ambos, cabeza y Tail Olive Moment. **Resultados:** Aunque el Endobinder mostró mayor reacción hemolítica en exposición directa de los eritrocitos que el MTA ($P < 0.05$), los valores de fibrinógeno fueron bajos para ambos materiales, siendo mayor la expresión de proteína en el Endobinder que en el MTA. Los valores de genotoxicidad del Endobinder y MTA fueron cercanos al control negativo, con diferencias significativas entre el MTA y el control negativo ($P > 0.05$). **Conclusiones:** Aunque ambos cementos endodónticos mostraron ser hemolíticos y disminuyeron la presencia de fibrinógeno en el plasma, tuvieron un comportamiento no genotóxicos.

Palabras claves: *Biocompatibilidad, cemento de aluminato de calcio, mineral trióxido agregado, compatibilidad sanguínea, citotoxicidad.*

ABSTRACT

Introduction: The aim of this in vitro study was to evaluate the hemocompatibility and genotoxicity of a novel bioceramic calcium aluminate based material (Endobinder) and MTA Angelus. **Methods:** For hemocompatibility test (hemolysis and quantification of fibrinogen) were evaluated from human blood samples that were placed in contact with each of the materials. The genotoxicity test was performed by a comet assay where each material was immersed in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium for 24 hours at 37°C. Subsequently, a supernatant was obtained from this immersion where a Chinese hamster ovary (CHO) cell line was cultured for 24 hours to analyze DNA for both, head and Tail Olive Moment. **Results:** Although Endobinder showed a greater hemolytic reaction in direct erythrocyte exposure than MTA ($P=0.05$), fibrinogen values were low for both materials, with protein expression being greater in the Endobinder than MTA. The genotoxicity values of Endobinder and MTA were close to the negative control, with significant differences between MTA and negative control ($P> 0.05$). **Conclusions:** Although both endodontic cements were hemolytic and decreased the presence of fibrinogen in the plasma, they had non-genotoxic behavior.

Key words: *Biocompatibility, blood compatibility and cytotoxicity, calcium aluminate cement, mineral trioxide aggregate,*

Tabla de contenido

1. Introducción	6
2. Propuesta	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos específicos	7
2.3 Hipótesis	8
3. Materiales y Métodos	8
4. Resultados	20
5. Discusión	25
6. Referencias Bibliográficas	28
Anexos	31

1. INTRODUCCIÓN

Los cementos usados para el selle de la cavidad apical en micro-cirugía endodóntica además de proporcionar un buen selle deben ser altamente biocompatibles con los tejidos periapicales con los que estarán en contacto para favorecer así el resultado exitoso del tratamiento (1,2). Para este propósito, fue desarrollado el Mineral Trióxido Agregado (MTA), el cual es un material bioactivo, osteoconductor, osteoinductor y biocompatible (3). Debido a sus buenas propiedades biológicas y físicas en la actualidad tiene otras aplicaciones clínicas como: material para la apexificación, apexogénesis, recubrimiento pulpar y selle de perforaciones radiculares (4. 6). El MTA es actualmente fabricado en dos formas: MTA gris y MTA blanco (Proroot MTA, Dentsply Tulsa, OK USA) este último se desarrolló para minimizar los problemas de pigmentación del MTA gris, su composición es a base de silicato tricalcico, silicato dicalcio, aluminato tricalcico, oxido de bismuto, aluminoferrito tetracalcico y sulfato de calcio deshidratado(3). Algunas desventajas de este material son el largo tiempo de endurecimiento, su difícil manipulación, potencial de pigmentación de la estructura dental y liberación de arsénico (7. 10). Lo anterior, ha justificado el desarrollo de otros materiales con óptimas propiedades mecánicas y altamente biocompatibles. El MTA Angelus (Londrina, PR, Brasil) fue desarrollado posteriormente y está compuesto por 80% de cemento portland y 20% de óxido de bismuto, a diferencia del Proroot MTA que contiene 75% de cemento portland, 5% de calcio y 20% de óxido de bismuto (3). Sin embargo varios estudios sugieren que algunas de las propiedades físicas (como el pH y la liberación de iones de calcio) del MTA ángelus son similares a las del Proroot MTA. Sólo marcadas diferencias se han establecido para el tiempo de endurecimiento y el tamaño de la partícula de estos materiales (11,12).

Más recientemente, el EndoBinder® (Binderware, Sao Carlos, SP, Brasil- UFSCAR, numero de patente PI0704502-6) es un cemento biocerámico actualmente en fase de experimentación desarrollado en la Universidad de Sao Carlos (Brasil) (10). Su composición principalmente es de Al₂O₃ (68% en peso) y CaO (31% en peso), CaO (máx1.0), SiO₂ (0.3-0.8), MgO (0.4-0.5) y Fe₂O₃ (<0.3). El óxido de bismuto (20% en peso) se añade para garantizar la suficiente radiopacidad según especificación ISO 6876 (13,14). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado propiedades físicas y mecánicas adecuadas para este cemento, y una excelente respuesta celular permitiendo una diferenciación osteoblástica superior a la del MTA (7,15,16). No obstante, su hemocompatibilidad y potencial genotóxico de acuerdo a las recomendaciones de la American Dental Association (ADA) y norma ISO 7405 no han sido evaluadas (18,19). Así, el propósito de este estudio fue evaluar *in vitro* la hemocompatibilidad y genotoxicidad del cemento biocerámico EndoBinder.

2. PROPUESTA

2.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* la hemocompatibilidad y la genotoxicidad del material biocerámico EndoBinder.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la hemólisis *in vitro* del biocerámico EndoBinder a partir de muestras de sangre heparinizadas en contacto con dicho material.
- Cuantificar la presencia de fibrinógeno en una muestra de sangre luego de un contacto con el biocerámico Endobinder.

- Evaluar por medio del ensayo cometa la genotoxicidad a corto plazo *in vitro* del biocerámico Endobinder, luego de contacto celular con sus productos de liberación en solución.

2.3. Hipótesis

Para cada ensayo se plantearon diferentes hipótesis:

- Para el ensayo de hemólisis, la hipótesis nula fue que no había diferencia significativa entre el porcentaje de hemólisis inducido por EndoBinder y el inducido por el MTA.
- Para el ensayo de fibrinógeno, la hipótesis nula fue que no había diferencia significativa entre la concentración de fibrinógeno formado debido a la presencia de EndoBinder o de MTA.
- Para el ensayo de genotoxicidad, la hipótesis nula fue que no había diferencia significativa en el daño de la cadena de ADN de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) producido por el MTA y el EndoBinder.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Este estudio cuantitativo experimental fue desarrollado de acuerdo a las recomendaciones para la investigación biomédica de la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial de 1964 y a las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de Salud de la República de Colombia a través de la resolución N° 008430 de 1993. Cumpliendo con las disposiciones generales reflejadas en sus cuatro artículos bajo el Título I, la Universidad CES fue la unidad investigadora a cargo de este proyecto y dispuso de un Comité de Ética en Investigación, encargado de resolver todos los asuntos relacionados con el tema y siguiendo un manual interno de procedimientos con el objeto de apoyar la aplicación de las normas requeridas.

La investigación se llevó a cabo al obtener la autorización del representante legal de la

Universidad CES, la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación y el consentimiento informado de los participantes. En todo momento se respetó la dignidad del paciente, la protección de sus derechos y su bienestar, velando por su integridad y privacidad.

Se realizó un entrenamiento previo de los investigadores en técnicas de cultivo celular y biocompatibilidad in vitro. Además, se realizaron ensayos preliminares de estandarización de depósitos de fibrina y hemolisis, debido a que era una prueba que no se había realizado antes en el laboratorio. Se respetaron los protocolos de recolección y procesamiento de las muestras.

Para el ensayo de hemocompatibilidad (Fibrinógeno y Hemolisis) se tomaron muestras de sangre por personal experto en pacientes que acudieron al centro de recolección de muestras (ICMT) en Sabaneta y que cumplieran con los requisitos de inclusión que aceptaron y firmaron consentimiento informado autorizándonos para utilizarlo con fines académicos. Se excluyeron pacientes en embarazo, consumidores de drogas, medicados con antiinflamatorios, anticoagulantes, retrovirales y pacientes menores de edad. Para la recolección de las muestras de sangre se usaron tubos tratados con EDTA para el ensayo de hemolisis y con heparina para el ensayo de cuantificación de fibrinógeno. Los materiales a evaluar estuvieron en contacto directo con la muestra de sangre y se siguieron los pasos según protocolo de cada ensayo. El ensayo de Fibrinógeno se realizó con el SimpleStep ELISA® kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Abcam, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El SimpleStep ELISA® kit está diseñado para la medición cuantitativa de la proteína fibrinógeno en plasma humano diluido.

En el ensayo de genotoxicidad (ensayo cometa), se prepararon cultivos celulares de células CHO, de 300.00 células por pozo (en platos de 24 pozos) de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). La viabilidad celular se verificó previo a los cultivos con

un ensayo por exclusión con azul de tripano. Se comprobó una confluencia entre el 70% y un 80% las células en monocapa. Los materiales a evaluar estuvieron en contacto directo con el medio de cultivo celular por 24 horas, posteriormente se utilizó este medio de cultivo para cultivar las células CHO. El ensayo de genotoxicidad se realizó a partir de productos de liberación del material en contacto con el medio de cultivo durante 24 horas. Se desarrolló el ensayo siguiendo cada uno de los pasos del protocolo UTi Comet K. Se tomaron registros fotográficos.

Protocolo de ensayo de hemólisis

- Los cementos fueron manipulados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con la proporción de 1 g de polvo a 0,21 ml de agua destilada para EndoBinder y MTA. Después de la manipulación los cementos se dosificaron en un molde de acrílico con la medida estandarizada y 0,1gr de preparación de cada material. Cada ensayo tuvo 4 muestras de cada material. Para un total de 12 muestras de cada material.
- Para la preparación del tratamiento se tomaron dos muestras de sangre en tubos heparinizados del paciente que cumplía con los criterios de inclusión y había firmado el consentimiento informado. Para mantener una homogeneidad, siempre se tomaban 3mL de la muestra de sangre y era este volumen el que se procesaba a continuación.
- Se centrifugó la muestra de sangre por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto, se observó la separación del plasma, se aspiró y se colocaron 500µl de ficoll. (Fig. 1a)
- Se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto. Se observó la separación de los glóbulos blancos, glóbulos rojos. (Fig. 1b)
- Se aspiró el sobrenadante y se realizó el lavado con 1000 µl de PBS, se centrifugó por 5 mm a 3000 rpm. Se repitió 2 veces este procedimiento, aspirando el sobrenadante en cada repetición. (Fig. 1c-d)
- Al finalizar el lavado, se realizó una dilución de sangre de 300 µl de sangre en 12 ml de

PBS y en el espectrofotómetro se verificó que su absorbancia fuera inferior a 1,5.

- En cada tubo Eppendorf con el material se agregaron 600µl de la dilución de sangre previamente realizada. Se llevó a incubación por 1 Hora a 37°C (Fig. 2). Al pasar la hora de incubación con una micropipeta se tomaron 500 µl de cada muestra y se pasaron a una caja de 24 pozos debidamente marcada. Una caja para cada ensayo. (Fig. 3)
- De esta misma dilución de sangre se realizaron:
 - a. 3 pozos de 500 µl como controles negativos.
 - b. 3 pozos de 500 µl como controles positivos.
- El control positivo se preparó con 5ml de la dilución de la sangre +125 µl de agua grado MiliQ.
- El control negativo consistía de un mismo volumen de sangre diluida en PBS.
- Para el control blanco se utilizarán 3 pozos con 500 µl de PBS y 3 pozos con agua grado MiliQ.

Al tener el plato listo con los tratamientos, se midió la hemoglobina libre con el lector espectrofotométrico a una longitud de onda a 490nm. (Fig. 3d)

Protocolo de ensayo de fibrinógeno

Materiales suministrados por el kit SimpleStep ELISA® kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Abcam, EEUU). (Fig. 4, Tabla 1)

Tabla 1: Materiales Suministrados por el kit SimpleStep ELISA® kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Abcam, EEUU)		
Material	Cantidad	Condición de almacenamiento (Antes de la preparación)
10X Human Fibrinogen Capture Antibody	600 L	+2-8°C
10X Human Fibrinogen Detector Antibody	600 L	+2-8°C

Human Fibrinogen Lyophilized Purified Protein	2 Vials	+2-8°C
Antibody Diluent CPI	6 mL	+2-8°C
10X Wash Buffer PT	20 mL	+2-8°C
TMB Substrate	12 mL	+2-8°C
Stop Solution	12 mL	+2-8°C
Sample Diluent NS	50 mL	+2-8°C
Pre-Coated 96 Well Microplate	(12 x 8 well strips) 96 Wells	+2-8°C
Plate Seal	1	+2-8°C

Preparación de la curva estándar para mediciones por duplicado (Fig. 5)

- Reconstituyó la proteína humana normal de la muestra de fibrinógeno (*Fibrinogen Human Protein Standard*) mediante la adición de 250µl de agua grado MiliQ, homogenizándose cuidadosamente. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. La concentración que se obtenía de esta reconstitución era 200 ng / ml de la solución estándar stock. Se etiquetaron 8 tubos (1-8) y se añadieron 150µl de *NS Diluyente* en cada tubo. El tubo #8 no contenía proteína y fue el control en blanco. (Fig. 5)

Desarrollo del Ensayo

Se realizó la preparación de los reactivos el mismo día del ensayo siguiendo cada uno de los pasos del protocolo. Una "muestra" se refiere simplemente a un solo pocillo de ensayo.

- Los cementos fueron manipulados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con la proporción de 1 g de polvo a 0,21 ml de agua destilada para EndoBinder y MTA.
- Después de la manipulación los cementos se colocaron en un molde de acrílico y se obtuvo 0,1gr de preparación de cada material y se colocaron en tubos Eppendorf marcados A B C para MTA y 1 2 3 para EndoBinder resultando cada ensayo con un total de 6 muestras en total: 3 del material MTA y 3 del material EndoBinder
- Las preparaciones de las soluciones de trabajo se realizaron el mismo día del ensayo:

- WASH BUFFER: Para 24 Pozos: 2,5ml de WB 10x + 22,5ml de Agua MiliQ
- COCTEL DE ANTICUERPOS: Para 12 pozos: 750µl Capture10x + 750µl Detector10x+600 µl Diluent CPI.
- Para la preparación de la muestra se tomaron dos muestras de sangre en tubos con EDTA en un paciente sistémicamente sano con la firma del consentimiento informado.

Se centrifugó la muestra de sangre a 2000rpm por 10 minutos y se realizó una dilución del plasma para un volumen final de 1600µl y concentración final de 1:10000 (Ver tabla 2)

- Se tomaron 160 µl de Plasma y se diluyó en 1440µl WB1X
- De esa dilución se tomó 160µl y se diluye en 1440µl WB1X
- De esa dilución se tomó 160µl y se diluye en 1440µl WB1X
- De esa dilución se tomó 160µl y se diluye en 1440µl NS diluent (plasma final diluido)

Tabla 2. Diluciones Plasma

Tubo No	Muestra de la dilución	Volumen de la muestra (µl)	Volumen de 1xWashBuffer (µl)	Concentración inicial	Concentración final
1	Plasma neto	160	1440	Neta	1:10
2	Tubo #1	160	1440	1:10	1:100
3	Tubo #2	160	1440	1:100	1:1000
4	Tubo #3	160	1440	1:1000	1:10000

- En cada tubo Eppendorf con el material se colocó 100 µl del plasma final diluido y se dejó en vibración a 25rpm x 30 minutos.
- Se añadió 50 µl de toda la muestra a los pocillos apropiados.
- Se añadió 50 µl de la mezcla de anticuerpos a cada pocillo. (Fig 6a-b)
- Se selló la placa con papel aluminio y se llevó a incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas ajustado a 250 rpm. (Labnet International.Inc. Orbit p4)
- Se lavó cada pocillo 3 veces con 350µl 1X wash buffer pt y se realizó aspiración o decantación de los pozos. La eliminación completa del líquido en cada paso fue esencial.
- Después del último lavado se invierte la placa y se seca haciendo leves golpes contra toallas de papel limpias para eliminar el exceso de líquido.

- Se añadió 100 µl de sustrato TMB a cada pocillo y se llevó a incubación durante 10 minutos en la oscuridad en un agitador de placas ajustado a 20 rpmx10. (Labnet International.Inc. Orbit p4) (Fig. 6c-d)
- Se añadió 100 ml de solución stop a cada pocillo.
- Se colocó en agitación la placa durante un minuto para mezclar 20 rpmx1. (Labnet International.Inc. Orbit p4). Finalmente se realizó la lectura en el lector de Elisa a una longitud de onda de 450nm. (Fig 6e)

Protocolo de ensayo de genotoxicidad (ensayo cometa)

Preparación de los medios de cultivo

Se realizó la preparación de los medios de cultivo según los protocolos aprobados del laboratorio de biotecnología de la Universidad CES. Cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO).

Descongelamiento y cultivo de células CHO

Se descongeló el vial de células CHO, 33,35 ml con Ham's F12 de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y el 1500 µl FBS (Suero Bovino Fetal) en baño maría a 37°C.

- Se transfirió el contenido del vial de células a un tubo de 15 ml estéril.
- Se adicionó 10 ml de DMEM.
- Se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min a 25°C.
- Se aspiró el sobrenadante y se re suspendió el botón de células en 10 ml de DMEM.
- Se volvieron a centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos a 25°C.
- Se aspiró el sobrenadante y re suspendió el botón de células en 1ml de DMEM.

- Se procedió a sembrar en frascos de cultivo T-75 a los cuales se agregó 1mL de suero bovino fetal (FBS), 1mL de la suspensión celular y 8mL de medio DMEM. Se rotulo con nombre, fecha y responsable. Se colocó en incubación a 37°C, en atmósfera controlada con 5% de CO₂

Preparación de los materiales

Parte 1

Los cementos fueron manipulados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con la proporción de 1 g de polvo a 0,21 ml de agua destilada para EndoBinder y MTA. Después de la manipulación los cementos se colocaron en un molde de acrílico y se obtuvo 1gr de preparación de cada material y se colocaron en contacto directo con medio de cultivo (280µl de suero y 720µl de DMEM) en tubos Eppendorf marcados ABCD-A´B´C´D para MTA y 1 2 3 4 . 1´2´3´4´ para EndoBinder y se dejaron en incubación a 37°C por 24 horas (Fig. 7)

Parte 2

- Se observaron los cultivos celulares bajo microscopio a 10x y se verificó que no estaban contaminados (Fig. 8)
- Se realizó filtración con acrodiscos del medio de cultivo donde los materiales estuvieron expuestos por 24 horas. (Fig. 9a)
- Se tomaron 450 µl del medio filtrado de cada material y se introdujeron en cada cultivo de células debidamente marcado a una concentración de 1´000.000 cel/ml en un plato de 24 pozos. (Fig. 9b, c, d)
- En los pozos controles. Se realizó cambio de medio con 45 µl de FBS y 405 µl de DMEM.
- Se dejó el plato con los tratamientos y los controles en incubación por 24 horas a 37°C

Desarrollo del ensayo cometa

- Se observaron los cultivos celulares bajo microscopio a 10x y se verificó que no estaban contaminados. (Fig.10)
- Se realizó evaluación de viabilidad y densidad celular para células CHO de la siguiente manera:

Cálculos

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{\# \text{Células}}{4} \times \text{factor de dilución} \times 10000$$

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\# \text{células viables}}{\# \text{células totales}} \times 100\%$$

Procedimiento

- Se lavó la cámara de Neubauer, asegurándose que no quedaran residuos en ella.
- Se re suspendieron las células y se tomaron 10 ul de la suspensión celular y se mezcló con 10 ul de azul de tripano 4% en un tubo de 1,7 ml (Eppendorf).
- Se pipeteó hasta que la muestra quedara homogénea.
- Se tomó 10 ul del Eppendorf y se colocó uno de los cuadros de la cámara Neubauer.
- El conteo se realizó contando las células viables (color brillante) y las no viables (color azul oscuro) como se explica en la Fig. 11. **Nota:** El factor de dilución en este caso fue 2 ya que se utilizaron 2 volúmenes cada uno de 10µl.
- Se realizó el ensayo cometa según protocolo del **UTi Comet Kit** que permite realizar la electroforesis en gel de células individuales. Esta técnica permite valorar el daño de DNA.
- Una hora antes de realizar en ensayo cometa, se elaboró el control positivo según protocolo UTi Comet Kit. Para la elaboración del control positivo (C+) fue necesario

realizar una solución Stock a una concentración de 2000 μM a partir de la solución (C+) [3,6%] contenida en el Kit. Una vez realizada esta solución se preparó una solución de trabajo a 500 μM y a partir de esta solución final se suplementó el tratamiento al 10% en un volumen final de 100 μl . Se llevó a incubación por 1 hora a 4°C. (Ver Tabla 3)

Tabla 3: Solución De Trabajo Para Control Positivo

Solución	Volúmenes	Volumen Final	Concentración final
(C+) (3,6%) Sin Stock	1,34 μl	1000 μl	2000 μM
(C+) Sin de trabajo	250 μl	1000 μl	500 μM
Preparación del control positivo C+ en la suspensión celular			
Solución	Volúmenes	Volumen Final**	Concentración final
(C+)	10 μl	100 μl	50 μM

** En el volumen final se incluye una concentración de células de 1×10^6 cel/ml

Se realizaron las soluciones necesarias según protocolo el mismo día del ensayo.

- Solución de lisis 1: Sobre una placa de agitación se dispuso un beaker con un magneto y se adicionaron las soluciones A (solución de lisis a partir de detergentes), B (DMSO-Dimetil Sulfoxido) y C (tritón) del kit. Se esperó hasta que la mezcla de homogenizo. Se almaceno en la nevera a 4°C hasta su uso.
- Buffer de electroforesis: Sobre una placa de agitación se dispuso un beaker con un magneto, se adiciono 12g NaOH, 0,37g de EDTA y 1000ml de agua destilada. Se ajustó el ph a $13 \pm$ y se almacenó a 4°C una hora antes del corrido de electroforético.
- Se realizó el subcultivo de células para el desarrollo del ensayo de la siguiente forma:
 - Se temperaron el DMEM, la tripsina/EDTA y el PBS en baño maría a 37°C. Se aspiró el medio del frasco de cultivo. Se lavaron las células con 3 ml de PBS estéril.
 - Para despegar las células se adicionó tripsina/EDTA al frasco así:

- 1ml para cajas multipozos (900 μ l de PBS y 100 μ l de tripsina/EDTA). Se incubó a 37°C y 5%CO₂ por 5 minutos. Se observó en el microscopio invertido y se verificó que las células estuvieran despegadas. Se agregó 500 μ l de medio para desactivar la tripsina en cada pozo.
- Se llevó el contenido de células en suspensión a un tubo de 15ml.
- Se lavó la caja de cultivo con medio de crecimiento para recuperar las células que quedaron en ella, y pasar el contenido al tubo de 15 ml (se observó que no quedarán células en el frasco mediante el microscopio)
- Se centrifugó a 1200 RPM por 5 min a temperatura ambiente.
- Se Aspiró el sobrenadante procurando no aspirar el botón de células.
- Se suspendió nuevamente el botón en 100uL de medio.
- Se utilizaron las células para el ensayo cometa
- Después de la hora de incubación del control positivo (C+). Se realizó el montaje de las láminas. Se preparó la SLN1 del kit (compuesta por varios detergentes)
- Para la preparación de cada tratamiento por duplicado incluyendo C+ y C- se tomaron 10 μ l de cada tratamiento y 90 μ l de la SLN 1, se adicionaron en un vial debidamente marcado. Se tomó el volumen completo (100 μ l) y se colocó la gota sobre la lámina base con agarosa debidamente marcada e inmediatamente se colocó un cubreobjetos sobre la muestra. El procedimiento es el mismo para todos los tratamientos.
- Al finalizar el montaje de las placas, se incubaron las láminas base a 4°C por 6 minutos. Se sacaron las láminas de la nevera y se retiró el cubreobjetos cuidadosamente. En la jarra Coplin que contenía la solución de lisis previamente preparada se sumergieron las placas. Se llevó a incubación por 1 h a 4°C.
- Al finalizar el tiempo de incubación se sacaron cuidadosamente las placas. se lavó cada placa por lado y lado con la SLN 2 (buffer) del kit con una pipeta.

- Para el corrido de electroforesis, se ubicaron las láminas de los tratamientos hacia arriba en la cámara y se cubrieron con el buffer de electroforesis hasta cubrir las placas (5mm). Se dejó incubando por 30 minutos.
- Al finalizar los 30 minutos se realizó el corrido de electroforesis a 25V, 300Ma, durante 20 minutos. Al terminar el corrido, se retiraron las láminas base (una a una) y se le adicionaron con una pipeta Pasteur la solución SLN3 (solución neutralizante) del kit cubriendo toda la superficie de la lámina a manera de colchón y se dejó reposar por 15 minutos.
- Pasados los 15 minutos, se fijaron las placas con la solución SLN 4 (solución de fijación) del Kit con una pipeta de Pasteur adicionando de 2 a 3 gotas.
- Se adicionó 40 µl de la solución SLN5 del Kit a cada lámina e inmediatamente se colocó un cubreobjeto. Se observó cada lámina bajo microscopio de fluorescencia para observar los cometas. Se tomaron fotografías con cámara Nikon adaptable a microscopio (Digital Sight DS-L1, Japan). Ver Fotografías 1,2,3,4)

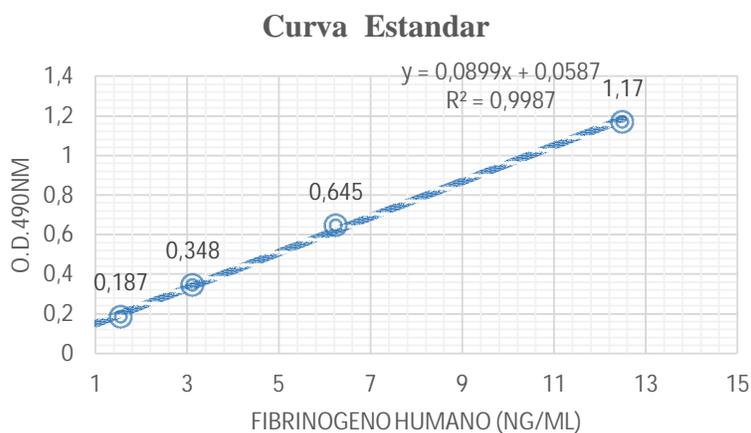
Para hemolisis todos los datos de hemoglobina libre se obtuvieron con el lector espectrofotométrico de ELISA a una onda de 490nm. El grado de hemólisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Hemolisis (\%)} = 100 \times (\text{Abs} - \text{Abs0}) / (\text{Abs100} - \text{Abs0})$$

Donde Abs, Abs0 y Abs100 eran la absorbancia de las muestras del ensayo, la suspensión tratada con solución salina fisiológica isotónica (PBS) y la suspensión de hemólisis completa tratada con agua destilada, respectivamente.

Para fibrinógeno se calcularon los valores de absorbancia en el lector espectrofotométrico a una onda de 490nm. Se creó una curva estándar trazando el valor medio de la absorbancia, restándole el control del blanco para cada concentración estándar (eje y) frente a la concentración de la proteína diana (eje x).

Curva estándar de concentración de fibrinógeno



Para el ensayo de genotoxicidad se obtuvieron imágenes fotográficas de las placas de cada uno de los ensayos y las imágenes se evaluaron con el software CometScore el cual procesa y analiza imágenes de microscopía donde utiliza algoritmos de procesamiento de imágenes para extraer y clasificar cometas, separar la cabeza del cometa y medir los parámetros del cometa. Las variables de estudio seleccionadas fueron el porcentaje de ADN en la cabeza y el Tail Olive Moment. Todos los datos fueron recopilados en una base de datos en Excel.

ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con PASW Statistics 21 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Para garantizar la reproducibilidad de los experimentos cada ensayo se realizó por triplicado.

La distribución de los datos para los ensayos de hemocompatibilidad y genotoxicidad fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La reproducibilidad de los ensayos de hemolisis y cuantificación de fibrinógeno fue evaluada con las pruebas de ANNOVA y TStudent respectivamente. Finalmente, las comparaciones entre los materiales se realizaron con la prueba TStudent para hemolisis y fibrinógeno, mientras que ANNOVA y Post Hoc de Tukey para genotoxicidad. Todos los análisis se realizaron teniendo en cuenta una significancia del 5 % y un Intervalo de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

Hemolisis

Aunque el porcentaje de hemolisis del Endobinder fue superior al del MTA, estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de hemolisis (MTA Æ Endobinder)

Material	n	Media	Desviación estándar	Valor de P
EndoBinder	12	13,22	13,58	0,35
MTA	12	8,64	9,99	

Cuantificación de fibrinógeno

La presencia de fibrinógeno en las muestras de plasma con el Endobinder fue mayor que en las obtenidas con el MTA, diferencias que no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$). (Tabla 5) (Grafico 2).

Genotoxicidad

Ambos materiales mostraron una tendencia cercana al grupo control negativo en cada una de las variables analizadas (DNA de la cabeza y Tail Olive Moment) (Grafico 1 A y B).

Tabla 5: Cuantificación de fibrinógeno* (ng/ml)

	Material	N	Media	Desviación Estándar	Valor de P
Fibrinógeno ng/mL	Endobinder	6	0,30	0,34	0,10
	MTA	6	0,04	0,09	

Para esta última y al realizar múltiples comparaciones entre los grupos, Endobinder vs control negativo y Endobinder vs MTA mostraron ausencia de significancia ($P > 0.05$) (Tabla 6 y 7) (Fotografías 1, 2, 3,4).

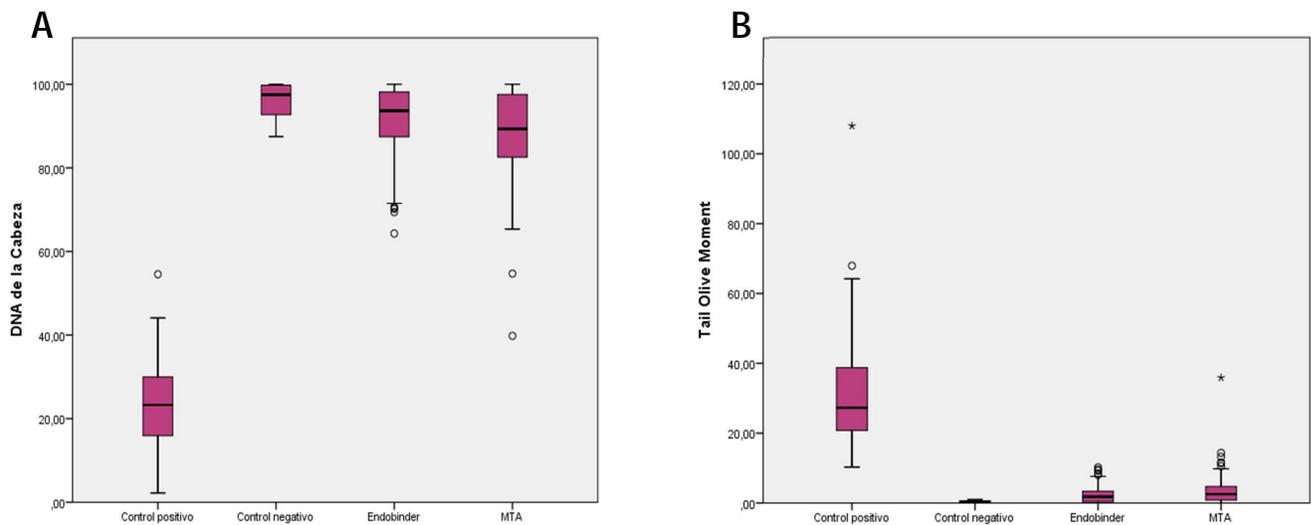


Grafico 1: (A, B) Efectos genotoxicos (Endobinder . MTA) A. Variable ADN de la cabeza B. Variable Tail Olive Moment.

Tabla 6: Comparaciones Múltiples para la variable DNA de la cabeza

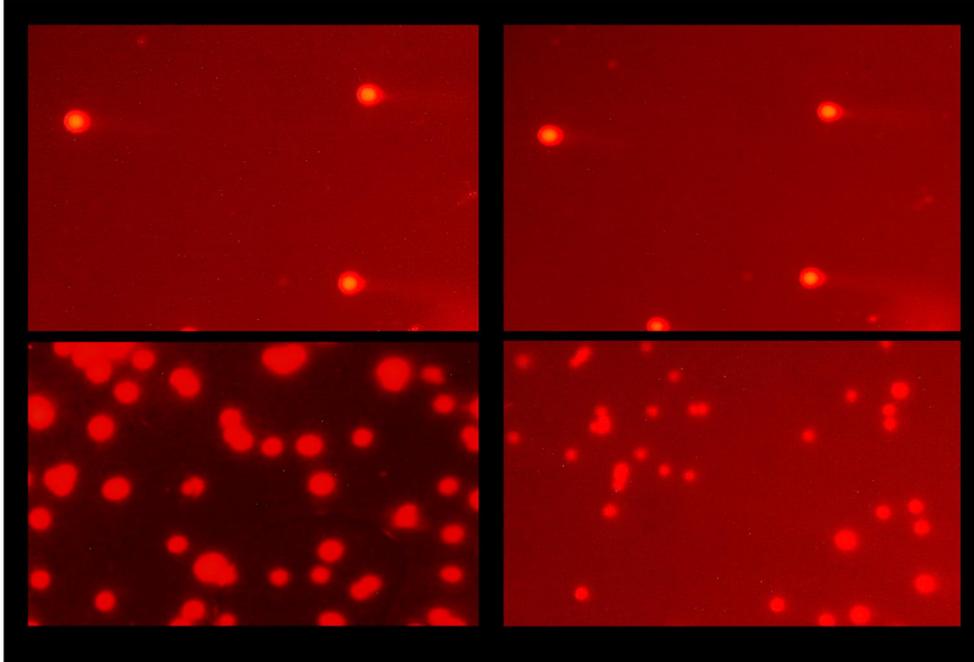
MATERIAL		Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Endobinder	MTA	0,002*	0,82	5,21
	Control negativo	0*	-7,44	-1,61
	Control positivo	0*	65,17	72,04
MTA	Endobinder	0,002*	-5,21	-0,82
	Control negativo	0*	-10,48	-4,61
	Control positivo	0*	62,14	69,04

Prueba Post Hoc de Tuque. * Diferencias estadísticamente significativas. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

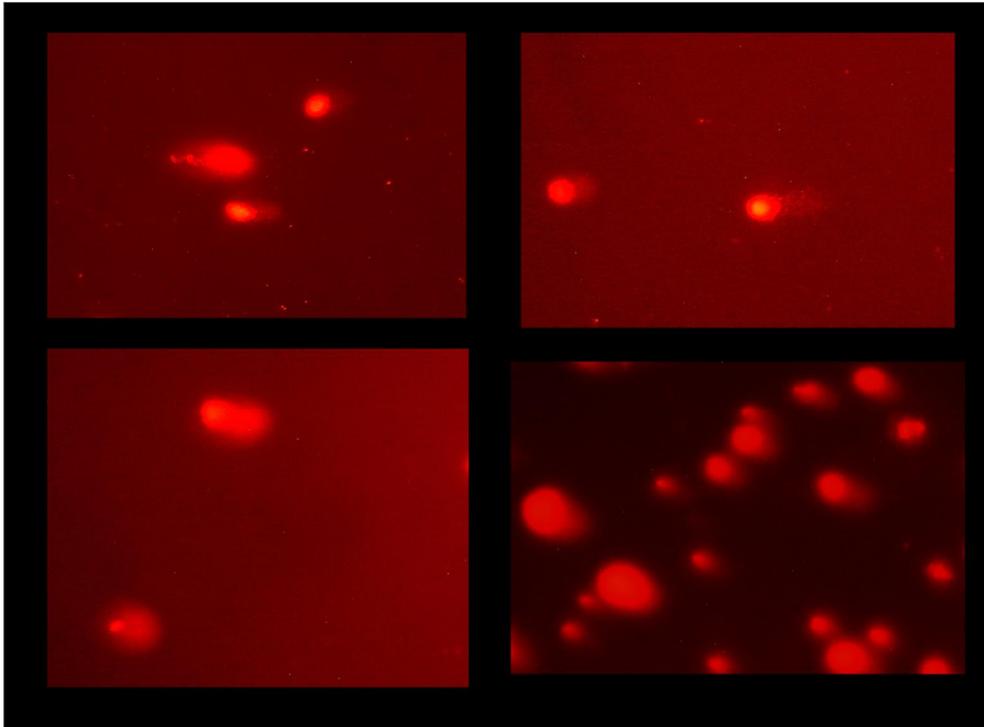
Tabla 7: Comparaciones Múltiples Comparaciones Múltiples para la variable Tail Olive Moment.

MATERIAL	MATERIAL	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Endobinder	MTA	0,231	-2,56	0,39
	Control negativo	0,062	-0,06	3,85
	Control positivo	0*	-32,22	-27,61
MTA	Endobinder	0,231	-0,39	2,56
	Control negativo	0,001*	1,01	4,95
	Control positivo	0*	-31,15	-26,52

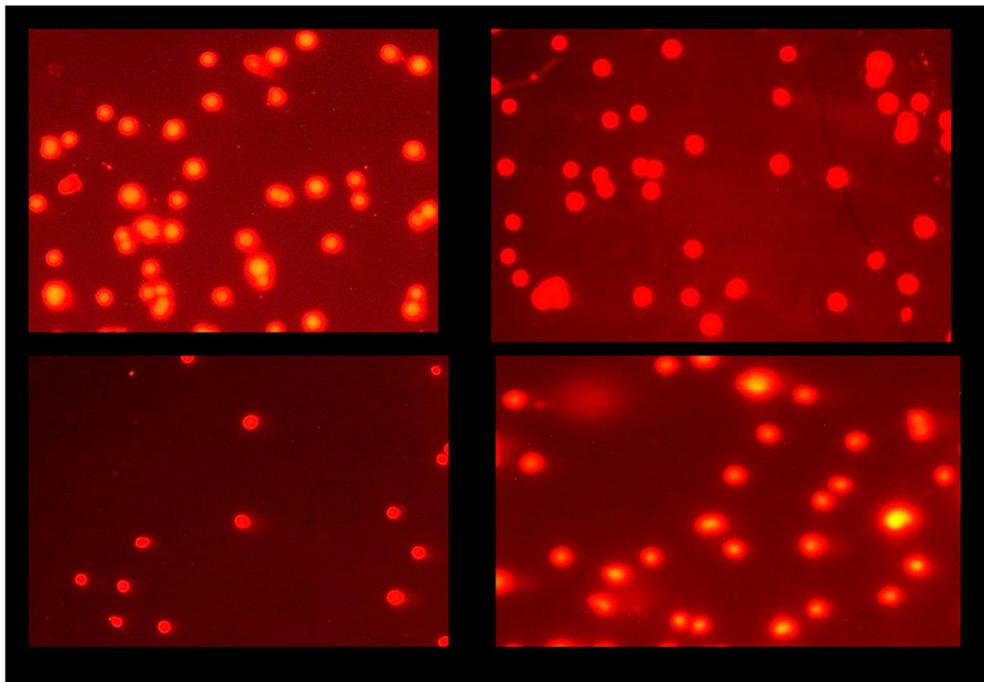
Prueba Post Hoc de Tukey. * Diferencias estadísticamente significativas. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.



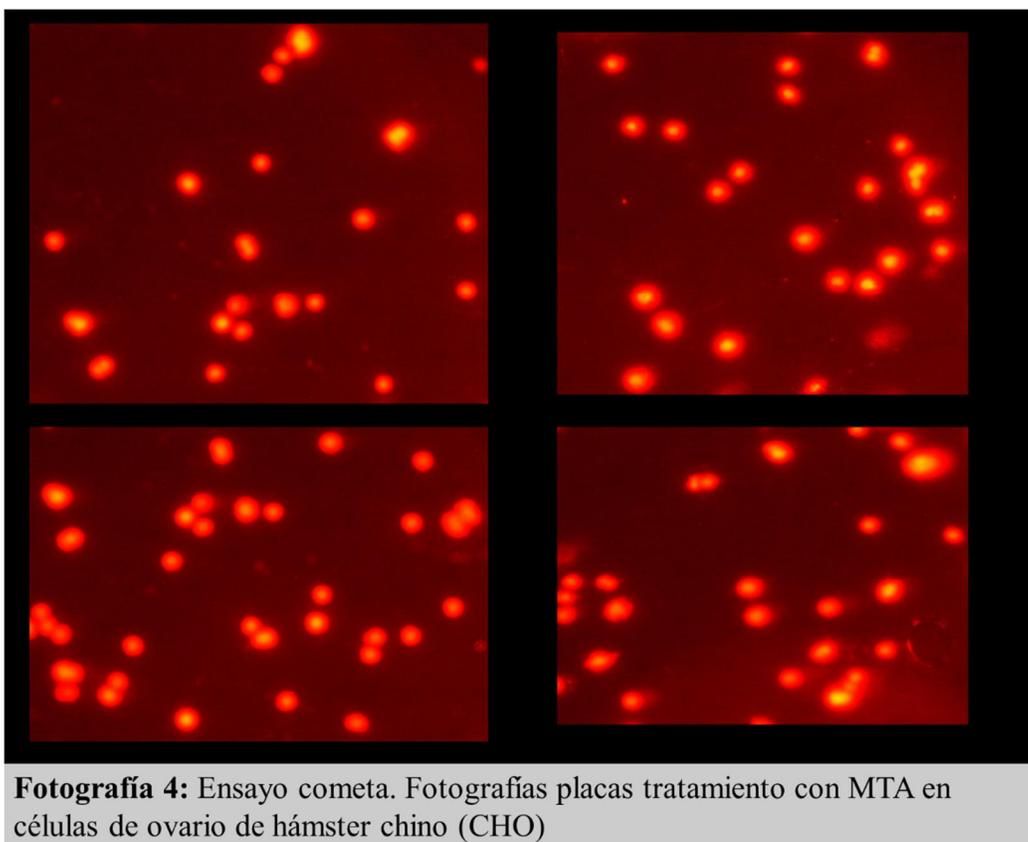
Fotografía 1: Ensayo cometa. Fotografías placas control negativo con células de ovario de hámster chino (CHO)



Fotografía 2: Ensayo cometa. Fotografías placas control positivo con células de ovario de hámster chino (CHO)



Fotografía 3: Ensayo cometa. Fotografías placas tratamiento con EndoBinder en células de ovario de hámster chino (CHO)



Fotografía 4: Ensayo cometa. Fotografías placas tratamiento con MTA en células de ovario de hámster chino (CHO)

5. DISCUSIÓN

Todos los materiales usados para la obturación retrograda en microcirugía endodóntica entran en contacto directo con los tejidos periapicales, por lo que las características de selle y biocompatibilidad deben ser altas para asegurar el resultado exitoso del tratamiento (2). Este estudio in vitro evaluó la biocompatibilidad expresada como genotoxicidad, hemólisis y cuantificación de fibrinógeno del EndoBinder, un cemento endodóntico a base de aluminato de calcio y el MTA. Basados en los resultados acá reportados, las hipótesis nulas de estos tres aspectos fueron rechazadas.

Evaluación de Genotoxicidad

El ensayo de gel monocelular (cometa) es un método microscópico fluorescente rápido y sensible para examinar el daño del ADN celular individual, cuyas aplicaciones en el campo de la toxicología han sido reportadas (20). Basados en los porcentajes de ADN de la cabeza y *Tail olive moment*, los resultados de este estudio mostraron que ambos materiales, Endobinder y MTA tuvieron un comportamiento similar al grupo control negativo. Esto fue comparable con otros estudios, donde el MTA no mostró daño potencial sobre el ADN de linfocitos y otras células evaluadas en un periodo de tiempo de 1, 4 y 24 horas (20, 22). En relación al Endobinder, aunque la ausencia de evidencia científica sobre su genotoxicidad no nos permitió establecer comparaciones, un hallazgo importante fue que en la variable *Tail Olive moment* no se encontró diferencia estadística significativa con el grupo control negativo, lo que podría sugerir un resultado exitoso de los tratamientos cuyas obturaciones retrogradas contengan éste material.

Evaluación de Hemocompatibilidad

Una vez el material de obturación retrogrado es colocado en la cavidad apical, iniciara un contacto directo con la sangre y los tejidos periapicales, lo cual generara una activación del sistema de coagulación y una respuesta inflamatoria del huésped como mecanismo de defensa (23). Así, la evaluación de hemocompatibilidad por medio de hemólisis y cuantificación de fibrinógeno es importante (24)

Hemólisis

El potencial hemolítico de un material refleja la fragilidad de la membrana de los eritrocitos y su posterior liberación de hemoglobina, cuando entra en contacto con un biomaterial. Consecuentemente, un material con óptima hemocompatibilidad debe tener una baja reacción de hemólisis (25). Sorprendentemente ambos materiales, Endobinder y MTA, tuvieron porcentajes de hemólisis de 13.2% y 8.5% respectivamente, los cuales fueron altos en relación al porcentaje máximo permitido para un biomaterial según la norma ISO 10993 para la evaluación de dispositivos médicos en modelos in vitro (23). Esto fue un

hallazgo importante de este estudio, debido a la ausencia de evidencia científica del potencial hemolítico del Endobinder y MTA. Así, nuestros resultados sólo pudieron ser comparables con otros estudios que evaluaron de manera independiente constituyentes presentes en estos cementos como la alúmina Al_2O_3 y el óxido de calcio CaO , sugiriendo que altas concentraciones alúmina favorecen un comportamiento hemolítico (26,27). Igualmente, cambios en la presión osmótica, valores de pH superiores a 8.5 y la presencia de metales por procesos peroxidativos pueden causar alteración a la membrana en los eritrocitos (28.30). Esto podría justificar adicionalmente los altos niveles de hemólisis del Endobinder y el MTA, considerando que ambos cementos contienen óxidos metálicos y desarrollan in situ valores de pH altamente alcalinos.

Cuantificación de fibrinógeno

En este estudio la presencia de fibrinógeno en las muestras de plasma sanguíneo a los 30 minutos en contacto con EndoBinder y MTA fueron bajas en comparación con el grupo control negativo. Al respecto, cuando un biomaterial entra en contacto con sangre, una capa de proteínas plasmáticas es absorbida en la superficie y establece una respuesta biológica. Dicha adsorción es determinada principalmente por la porosidad del material, que para el caso del MTA es acerca del 40% con un tamaño de poro de $2,5 \mu\text{m}$ (24,31). Ahora bien, aunque no existe evidencia al respecto para el Endobinder, otros cementos con composición de aluminato de calcio, han reportado una porosidad del 18% y un tamaño de poro de $0,37 \mu\text{m}$ (32,33). Basados en lo anterior y considerando que el fibrinógeno tiene un tamaño molecular de $0,005$ a $0,007 \mu\text{m}$ (34), los resultados aquí reportados pueden ser justificados, siendo bajos los niveles de proteína expresada en el medio, ($0,3 \text{ ng/ml}$) en el EndoBinder y ($0,04 \text{ ng/ml}$) en el MTA.

Otros aspectos de la hemocompatibilidad no evaluados en este estudio como la activación y adhesión plaquetaria o las características de la superficie del material, pudieron haber

influenciado nuestros resultados, si consideramos que después de la adhesión inicial tiene lugar un intercambio continuo con pretinas libres, que alcanza su equilibrio en aproximadamente dos horas, los cuales deben ser explorados en futuros estudios (23).

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron desde el punto de vista de la hemocompatibilidad que tanto el Endobinder y el MTA indujeron porcentajes de hemólisis superior a los ideales para un biomaterial y baja presencia de fibrinógeno. Respecto a la genotoxicidad ambos materiales no inducen un daño en la estructura del ADN celular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater*. 2016.
2. Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endod Top*. 2015; 32:3-30.
3. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010; 36:16-27.
4. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010; 36:400-13.
5. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*. 1993; 19:591-5.
6. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993; 19:541-4.
7. Aguilar FG, Roberti Garcia LF, Panzeri Pires-de-Souza FC. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod*. 2012; 38:367-71.
8. Keskin C, Demiryurek EO, Ozyurek T. Color stabilities of calcium silicate-based materials in contact with different irrigation solutions. *J Endod*. 2015; 41:409-11.
9. Duarte MAH, De Oliveira Demarchi ACC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99:648-50.

10. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BPFA. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108:140-4.
11. Oliveira MG de, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro ALB, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18:3-7.
12. Santos AD, Araújo EB, Yukimitu K, Barbosa JC, Moraes JCS. Setting time and thermal expansion of two endodontic cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106 :e77-79.
13. Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J.* 2012; 45:815-20.
14. Aguiar FG, Garcia L da FR, Rossetto HL, Pardini LC, Pires-de-Souza F de CP. Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. *J Endod.* 2011; 37:67-71.
15. Garcia L da FR, Huck C, Menezes de Oliveira L, de Souza PPC, de Souza Costa CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. *J Endod.* 2014; 40:2024-9.
16. Castro-Raucci LMS de, Oliveira IR de, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT de, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J.* 2011; 22:99-104.
17. Larissa Moreira Spinola de C-R, Ivone Regina de O, Lucas Novaes T, Adalberto Luiz R, Paulo Tambasco de O, Marcos J. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J.* 2011; 22:99.
18. ISO B, STANDARD B. Biological evaluation of medical devices. 2009;
19. Polyzois GL, Dahl JE, Hensten-Pettersen A. Biological testing of dental materials: development of national and international standards. *J Biomater Appl.* 1995; 9:355-62.
20. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101:258-61.
21. da Silva GN, Braz MG, de Camargo EA, Salvadori DMF, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102:e50-54.

22. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J*. 2014; 33:64-9.
23. van Oeveren W. Obstacles in haemocompatibility testing. *Scientifica*. 2013:392584.
24. Xu L-C, Bauer JW, Siedlecki CA. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 124:49-68.
25. Wang X, Hu L, Li C, Gan L, He M, He X, et al. Improvement in physical and biological properties of chitosan/soy protein films by surface grafted heparin. *Int J Biol Macromol*. 2016; 83:19-29.
26. Oh S-H, Choi S-Y, Lee Y-K, Kim KN. Preparation of calcium aluminate cement for hard tissue repair: effects of lithium fluoride and maleic acid on setting behavior, compressive strength, and biocompatibility. *J Biomed Mater Res*. 2002; 62:593-9.
27. Tripathi H, Kumar Hira S, Sampath Kumar A, Gupta U, Pratim Manna P, Singh SP. Structural characterization and in vitro bioactivity assessment of SiO₂. CaO. P₂O₅. K₂O. Al₂O₃ glass as bioactive ceramic material. *Ceram Int*. 2015; 41(9, Part B):11756-69.
28. Ionescu-Zanetti C, Wang L-P, Di Carlo D, Hung P, Di Blas A, Hughey R, et al. Alkaline hemolysis fragility is dependent on cell shape: results from a morphology tracker. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2005; 65:116-23.
29. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pognas J-L, Perrin C. Hemolysis by surfactants: A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016; 228:1-16.
30. Ribarov SR, Benov LC. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 640:721-6.
31. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod*. 2014; 40:1632-7.
32. Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int Endod J*. 2010; 43:1069-76.
33. Rosengren A, Pavlovic E, Oscarsson S, Krajewski A, Ravaglioli A, Piancastelli A. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials*. 2002; 23:1237-47.
34. Hall CE, Slayter HS. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959; 5:11-6.

ANEXOS

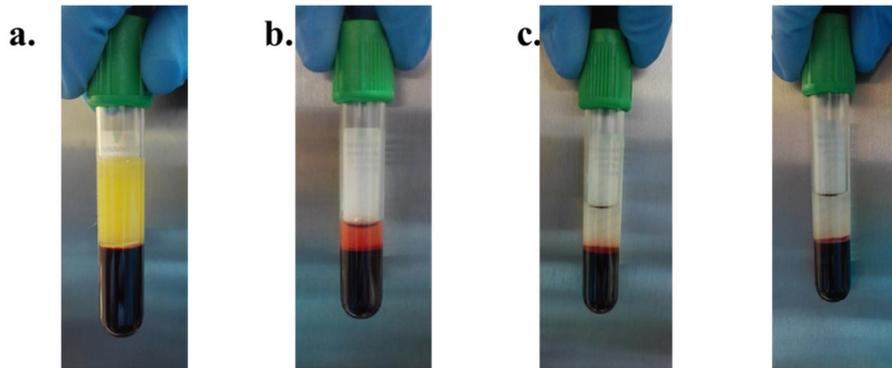


Figura 1: Preparación de la muestra de sangre a 3000rpm en centrifuga. a)se observa separación del plasma b)separación de los glóbulos blancos, glóbulos rojos después de la aplicación de Ficoll(500 μ l) c,d) lavado de la muestra con PBS

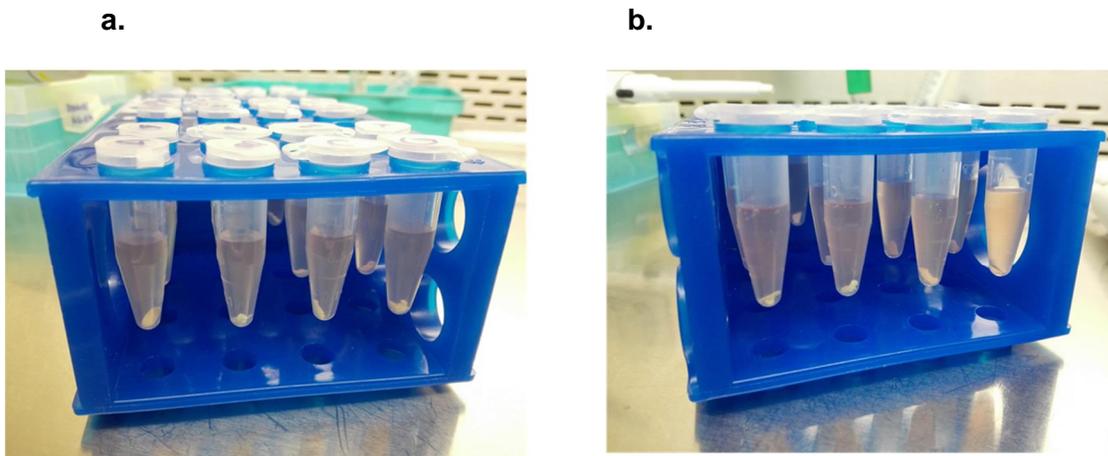


Figura 2: Tubos Eppendorf con los materiales de estudio en contacto con la dilución de sangre. a)MTA b)EndoBinder

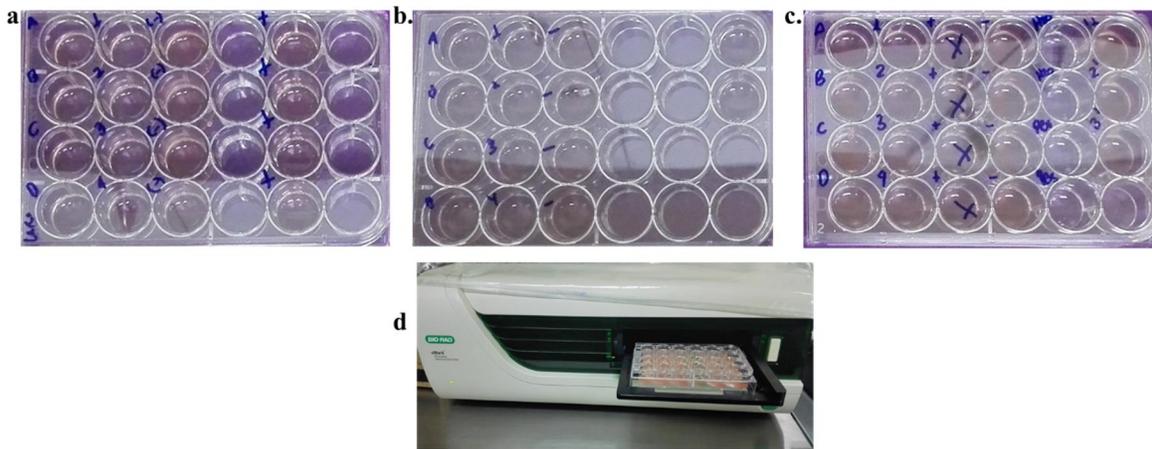


Figura 3: a,b,c) Platos de 24 pozos con la muestra de cada ensayo. d) lector espectrofotométrico a una longitud de onda a 490nm.

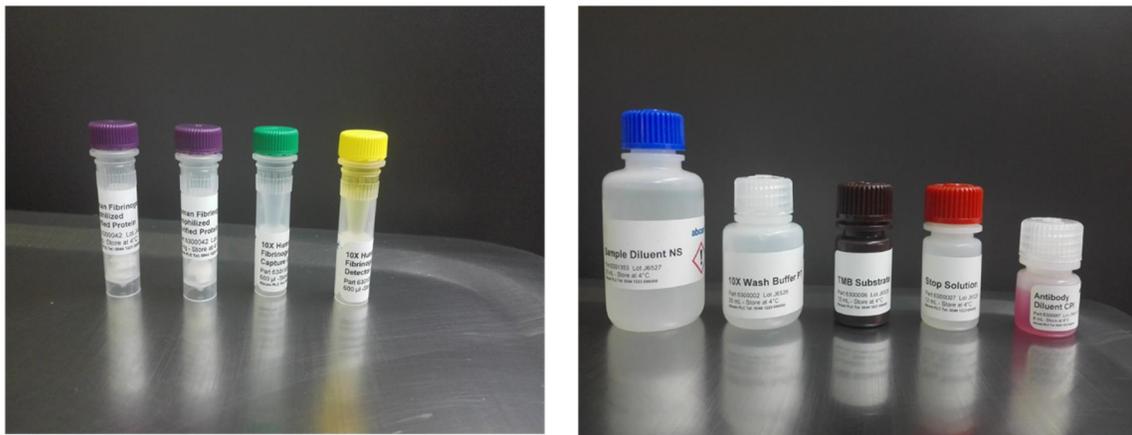
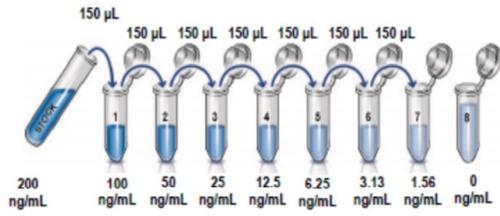


Figura 4: Materiales suministrados por el SimpleStep ELISA® kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Abcam, EEUU).

a.



b.

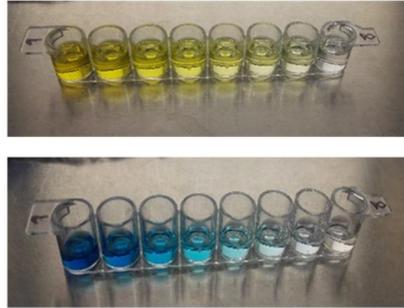
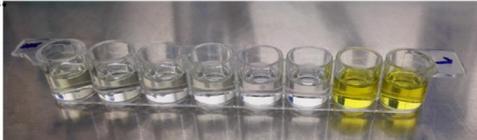
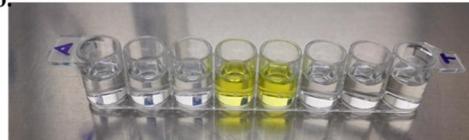


Figura 5: preparación de la curva estándar para mediciones por duplicado con *Fibrinogen Human Protein Standard*)

a.



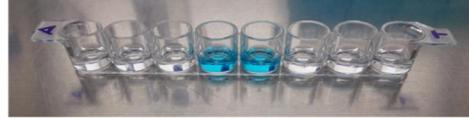
b.



c.



d.

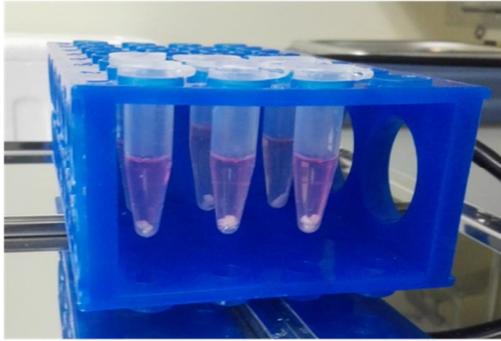


e.



Figura 6: a) ensayo #1 y b) ensayo #2 preparación de la muestra con la mezcla de anticuerpos. c) ensayo #1 y d) ensayo #2 muestras con sustrato TMB. e) lectura en el lector de Elisa a una longitud de onda de 450nm.

a.

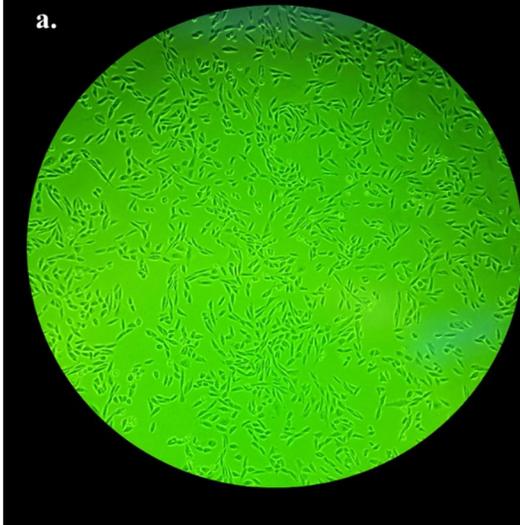


b.



Figura 7: a) Materiales de estudio en tubos Eppendorf en contacto directo con el medio de cultivo (DMEM). b) incubación a 37°C por 24 horas de los materiales en contacto directo con el medio de cultivo (DMEM).

a.



b.

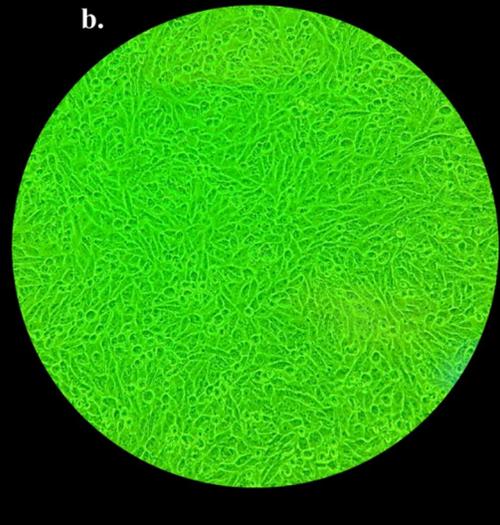


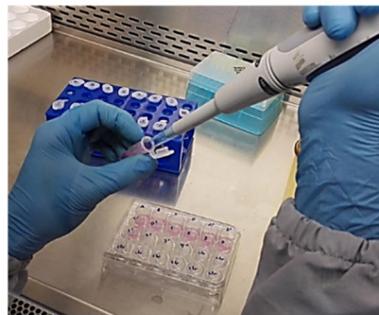
Figura 8: Cultivos celulares de células de ovario de hamster chino (CHO) bajo microscopio 10X.

Figura 9: a) filtración del medio de cultivo (DMEM) después de 24 horas de contacto con el material; b, c, d) 450 μ l del medio filtrado de cada maerial y se introdujeron en cada cultivo de células debidamente marcado a una concentración de 1'000.000 cel/ml en un plato de 24 pozos

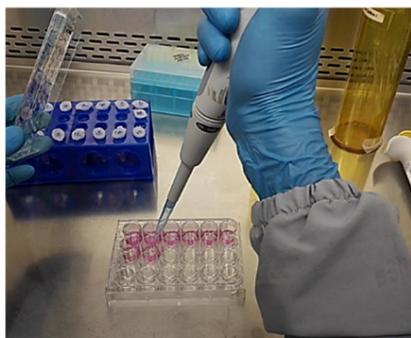
a.



b.



c.



c.



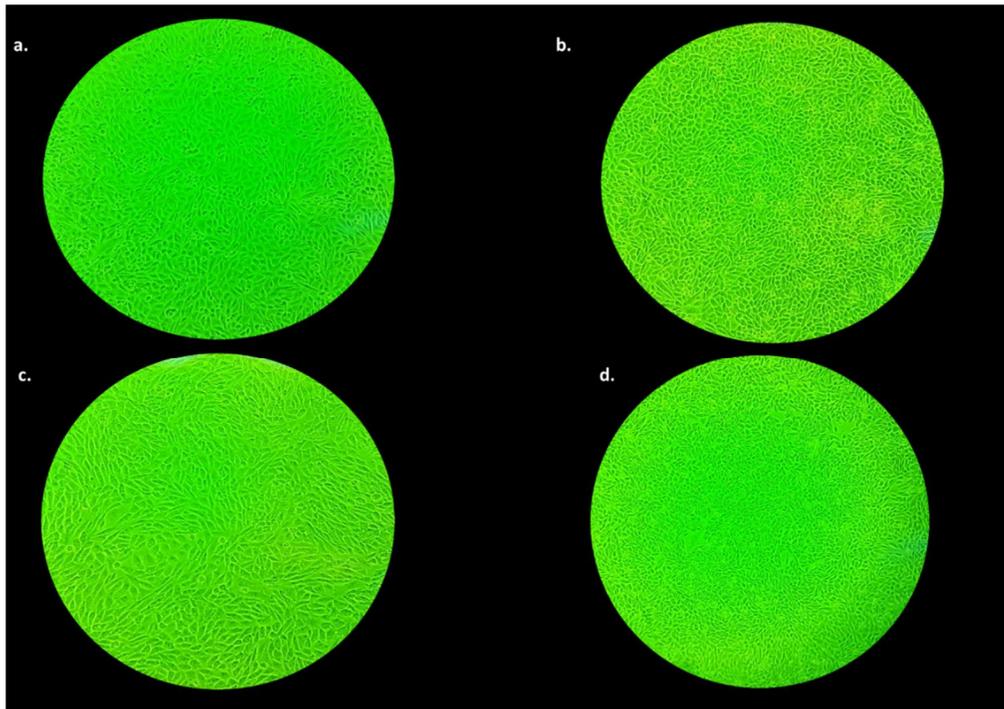


Figura 10: Cultivos celulares bajo microscopio a) cultivo celular en contacto con MTA, b) cultivo celular en contacto con Endobinder, c) cultivo celular para el control positivo.

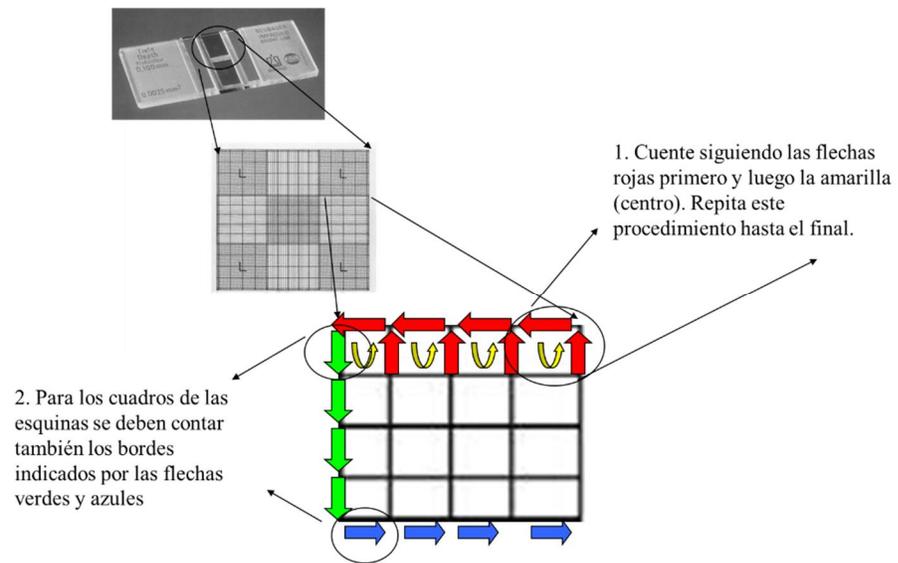


Figura 11: Técnica de conteo y viabilidad celular en la cámara de Neubauer