



Medio de transporte con y sin la adición de anfotericina B en la viabilidad de las células de la pulpa dental

Angela G Gavidia-Pacheco,* Esperanza R Ayón-Haro*

* Laboratorio de Investigación en Biología Oral y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

RESUMEN

Introducción: El estudio de las células madre es un tema de gran interés en el campo de la investigación y de la medicina regenerativa. Una de las fuentes de obtención de las células madre es la pulpa dental humana, la cual se puede conseguir con procedimientos sencillos y poco invasivos. Para que el aislamiento de células de la pulpa dental sea exitoso, es de vital importancia seguir protocolos estrictos, teniendo en cuenta las técnicas y los cuidados necesarios para evitar la contaminación desde el momento de la extracción de la pieza dental hasta su entrega en el medio de transporte. Debido a ello, en esta investigación el objetivo fue comparar dos medios de transporte y evaluar la viabilidad celular en ambos grupos. **Material y métodos:** Se compararon dos grupos, el grupo 1 fue transportado en un medio con los antibióticos penicilina-estreptomicina; en el grupo 2 se utilizó un medio de transporte con los antibióticos ya mencionados más la adición de anfotericina B. Se recolectaron 33 piezas dentales de pacientes entre 18 y 29 años de edad. Para la evaluación de la viabilidad celular se utilizó el colorante azul de tripán. Luego se realizó el conteo celular en un hemocitómetro en el microscopio. **Resultados:** Al análisis estadístico se obtuvo que el número de células y la viabilidad celular fue mayor en el grupo 2 que en el grupo 1. Existió una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. **Conclusiones:** Se obtuvo mayor cantidad de células viables al utilizar la anfotericina B en el medio de transporte.

Palabras clave: Anfotericina B, viabilidad celular, pulpa dental.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las células madre son un tema de mucho interés para el campo de investigación y para la medicina regenerativa gracias al desarrollo de nuevas técnicas para regenerar tejidos dañados por lesiones o enfermedades.¹ La pulpa dental humana es una de las alternativas como fuente de obtención de una gran variedad de células. Este tejido incluye células madre que poseen un potencial alto de proliferación y una capacidad de diferenciación multilineaje. El acceso al tejido pulpar y la obtención del mismo se realiza con procedimientos sencillos y poco invasivos. Esto es una ventaja en la medicina y en la odontología regenerativa en contraste con los procedimientos para obtener células madre de otras fuentes, por ejemplo, células madre de la médula ósea.²

El éxito del aislamiento de células de la pulpa dental como células madre o fibroblastos, exige seguir protocolos estrictos para su obtención, teniendo en cuenta las técnicas y cuidados necesarios durante todo el procedimiento, el cual comienza desde la extracción del diente. Debido a la presencia de alrededor 600 especies microbianas en boca, es importante realizar la desinfección del diente extraído y transportarlo en un medio lo más aséptico posible. Para evitar la contaminación del cultivo, se añaden fármacos como antibióticos y antifúngicos en el medio de transporte, y medios de cultivo.³⁻⁶ Estudios previos usaron sólo antibióticos como penicilina, estreptomicina, gentamicina; otros también agregaron antifúngicos como anfotericina B.³⁻⁶ Yildirim y colaboradores usaron un medio de transporte salino tamponado con fosfato de Dulbecco (DPBS) con 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina (PE-ST).⁵ Martin-Piedra y su equipo utilizaron en el medio de transporte los antibióticos con anfotericina B y lograron obtener la cantidad de células madre de la pulpa dental viables, necesarias para lograr un cultivo celular exitoso.⁶ No ha sido posible comparar el número promedio de células obtenidas en este estudio con investigaciones previas porque no mencionan el número total de células después del transporte con medio. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad celular comparando dos medios de transporte para piezas dentales, adicionando PE-ST en un grupo, y los mismos antibióticos más anfotericina B en el otro grupo. En consecuencia, esta investigación nos permite elegir el medio de transporte más adecuado para analizar la viabilidad

Recibido: Marzo 2019. Aceptado: Abril 2019.

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



celular, lo cual ayudará en la obtención de exitosos cultivos de células de la pulpa dental. En este estudio utilizamos antibióticos con anfotericina B en el medio de transporte y obtuvimos mayor cantidad de células viables que cuando se utilizaron sólo los antibióticos. Además, los estudios sobre las células pulpares dentales pueden aplicarse en la medicina regenerativa para tratar diferentes enfermedades como la regeneración ósea, los problemas congénitos, los tumores y los traumatismos del macizo craneofacial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio tuvo un diseño metodológico de tipo: analítico, experimental, prospectivo y transversal. Se compararon los siguientes grupos de medio de transporte de las piezas dentales: Grupo 1: penicilina + estreptomycin (16 dientes). Grupo 2: penicilina + estreptomycin + anfotericina B (17 dientes).

Obtención de las células de la pulpa dental

Las células de la pulpa dental se obtuvieron de premolares y terceras molares, de pacientes adultos jóvenes entre 18 y 29 años de edad, extraídas quirúrgicamente por indicación profesional, en el Centro Quirúrgico del Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres, previo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. Se obtuvo el tamaño de muestra con base en el estudio previo de viabilidad celular del autor Martín-Piedra.⁶ En esta investigación se utilizaron pulpas dentales de 33 dientes en total, divididos en dos grupos.

Para la obtención de las células de la pulpa dental, primero se realizaron las exodoncias e inmediatamente se almacenaron las piezas dentales en los frascos con medio de cultivo. Los frascos fueron transportados hacia el laboratorio en un *cooler* con geles de hielo, a una temperatura de 4-8 °C. El grupo 1 estuvo conformado por piezas dentales que se transportaron en frascos estériles individualmente con el medio de transporte al cual se le agregó penicilina y estreptomycin. El grupo 2 consistió en piezas dentales transportadas en el medio de transporte al cual se le adicionó penicilina, estreptomycin y anfotericina B. Luego, dentro de la cabina de flujo laminar, se desinfectó la pieza dental con una gasa embebida en alcohol al 70% y se colocó en un tubo con el medio *minimum essential medium* (MEM) más PE-ST al 0.5% durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la extracción del tejido pulpar con el método de fractura mecánica.

En seguida, se colocó la pieza fracturada en una placa Petri con MEM más PE-ST y se extrajo la pulpa cameral. En seguida, se trituró la pulpa con el fin de obtener una suspensión celular. A continuación se centrifugó a 1,100 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular o pellet con MEM. Luego se tomó un volumen de 10 µL de la suspensión y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de exclusión con el colorante de azul de tripán. Se realizó el conteo celular con el hemocitómetro y el microscopio óptico compuesto. Las células vivas se observaron transparentes y las células muertas estaban teñidas de azul. Por último, se obtuvo el valor de porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{N}^\circ \text{ células/Vol. Solución} = \\ & \text{N}^\circ \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \\ & \text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ viabilidad} &= \text{n}^\circ \text{ células vivas} \times 100 \\ & \text{N}^\circ \text{ total de células} \end{aligned}$$

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS en su versión 21. Se tomó un intervalo de confianza al 95% ($p = 0.05$) para aceptar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos. Se usó la prueba t de Student para comparar dos medias de datos paramétricos. Para los datos que no cumplían con la condición mencionada, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Además se emplearon la prueba estadística de χ^2 y las de correlación de Pearson y la de Spearman.

RESULTADOS

Las características de edad, sexo, tipo de pieza y tiempo (horas) transcurrido para el procesamiento de las muestras de ambos grupos son similares, no existen diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Se compararon dos medios de transporte con la finalidad de determinar el medio más eficiente para obtener células viables de la pulpa dental. Para el conteo celular se utilizó el microscopio óptico compuesto. Las células fueron teñidas con el colorante azul de tripán. Se diferenciaron las células vivas por tener forma redonda con un halo definido, mientras que las muertas estaban totalmente teñidas de azul. Los resultados de viabilidad celular se hallaron con la ayuda de las fórmulas descritas con anterioridad.

Tabla 1: Descripción de la muestra.
Sample description.

Característica	Grupo con medio de transporte		p
	Sin anfotericina B	Con anfotericina B	
Edad	21.56 ± 3.09	23.12 ± 3.99	0.223*
Sexo, n (%)			
Masculino	7 (43.8)	4 (23.5)	0.218‡
Femenino	9 (56.3)	13 (76.5)	
Tipo de pieza, n (%)			
Tercera molar	16 (100.0)	15 (88.24)	-----
Premolar		2 (11.76)	
Tiempo transcurrido para procesamiento (horas)	12.06 ± 9.55	12.08 ± 9.06	0.929§

* t de Student; ‡ prueba de χ^2 ; § prueba U de Mann-Whitney.

Al comparar ambos grupos con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney se pudo observar que tanto el número de células como el porcentaje de viabilidad celular es mayor en el grupo 2. Dicho resultado fue estadísticamente significativo, los resultados fueron en el número total de células $p = 0.026$ y en el porcentaje de viabilidad celular $p = 0.0001$ (Figuras 1 y 2).

En el género femenino del grupo 1 se observó un número un poco mayor de células y mejor porcentaje de viabilidad celular comparado con el género masculino ($p = 0.711$ y 0.266 respectivamente); sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2).

En el grupo 2, el número de células promedio fue un poco superior en la pulpa de las personas del sexo masculino, mientras que la viabilidad celular fue muy similar entre varones y mujeres. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de células ni tampoco en la viabilidad celular ($p = 0.174$ y 0.651 respectivamente) entre el sexo masculino y femenino en el grupo con anfotericina B (Tabla 2).

Se observó correlación débil negativa entre la edad y número de células, no significativa estadísticamente en ambos grupos sin y con anfotericina B ($p = 0.445$ y $p = 0.320$ respectivamente). Por otro lado, se detectó correlación moderada positiva entre edad y viabilidad celular; sin embargo, no hubo diferencia significativa en ambos grupos ($p = 0.064$ y $p = 0.103$ respectivamente) (Tabla 3).

Respecto a la correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y el número de células hubo correlación negativa fuerte estadísticamente significativa en ambos grupos, sin y con anfotericina B (p

$= 0.001$ y $p = 0.034$ respectivamente). La correlación entre el tiempo transcurrido y la viabilidad celular también fue negativa de magnitud casi moderada, pero no significativa estadísticamente en ambos grupos ($p = 0.055$ y $p = 0.233$) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En los resultados obtuvimos mayor cantidad de células en el grupo al cual se le adicionó anfotericina B, en comparación con el grupo que tuvo sólo los antibióticos PE-ST. El número promedio de células del grupo 2 fue mayor (2.73×10^6) que el grupo 1 (2.13×10^6). Es probable que la anfotericina B haya contribuido a man-

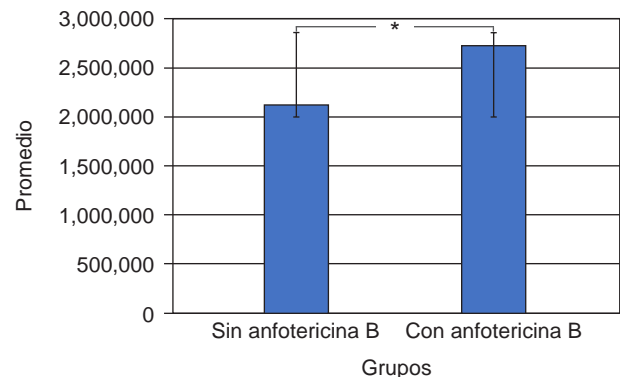


Figura 1: Comparación del promedio del número total de células de ambos grupos.

* Existe diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

Comparison of the average of the total number of cells of both groups.

* There is a statistically significant difference $p < 0.05$.

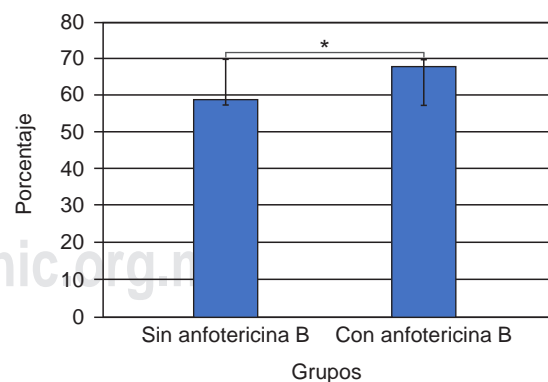


Figura 2: Comparación del porcentaje de viabilidad celular obtenida de ambos grupos.

* Existe diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

Comparison of the percentage of cell viability obtained from both groups.

* There is a statistically significant difference $p < 0.05$.

Tabla 2: Número de células y viabilidad celular según sexo en los grupos de medio de transporte con y sin Anfotericina B.
Number of cells and cell viability according to sex in groups of transport medium with and without amphotericin B.

	Masculino	Femenino	p
Sin anfotericina B, n	7	9	
Número total de células*	1,972,142.86 ± 460,415.18	2,248,611.11 ± 1,030,853.04	0.711
Viabilidad celular %*	56.32 ± 6.84	60.88 ± 4.65	0.266
Con anfotericina B, n	4	13	
Número total de células*	3,068,750 ± 553,509.64	2,627,269.23 ± 1,058,617.94	0.174
Viabilidad celular %*	68.59 ± 3.55	67.55 ± 4.26	0.651

* Media ± desviación estándar.

No existe diferencia significativa, p > 0.05 (test U de Mann-Whitney).

Tabla 3: Correlación entre la edad y el tiempo (horas) transcurrido desde la exodoncia con el número de células y la viabilidad celular en los grupos de medio de transporte con y sin anfotericina B.

Correlation between age and time (hours) elapsed from tooth extraction with number of cells and cell viability in groups of transport medium with and without amphotericin B.

	Edad			
	Medio de transporte			
	Sin anfotericina B		Con anfotericina B	
	Correlación	p	Correlación	p
Número total de células	-0.205*	0.445	-0.257*	0.320
Viabilidad celular %	0.473*	0.064	0.409*	0.103
	Tiempo (horas) transcurrido desde la exodoncia			
Número total de células	-0.534‡	0.034§	-0.735‡	0.001§
Viabilidad celular %	-0.489‡	0.055	-0.306‡	0.233

* Correlación de Pearson; ‡ correlación de Spearman; § existe diferencia estadísticamente significativa a p < 0.05.

tener un medio de transporte con menor contaminación para la muestra, pudiendo conservarla mejor hasta el momento de ser procesada en el laboratorio. En investigaciones anteriores se han utilizado diferentes medios de transporte y fármacos (antibióticos y antifúngicos) en distintas concentraciones con el fin de mantener el medio lo menos contaminado posible. Algunos emplean sólo antibióticos como penicilina, estreptomina, gentamicina.³⁻⁶ Yildirim y colaboradores utilizaron un medio de transporte de DPBS con los antibióticos PE-ST al 1%.⁵ Otros investigadores agregan antifúngicos como la anfotericina B.³⁻⁶ Sin embargo, ninguno ha comparado los medios de transporte añadiendo diferentes fármacos. Se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney, y se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa. Con eso concluimos que al agregar la anfotericina B al medio de transporte, se

obtendrá mayor cantidad de células de la pulpa dental. No se ha podido comparar el número promedio de células que se obtuvieron en este estudio con investigaciones anteriores, ya que no mencionan el dato.³⁻⁶

Con respecto al porcentaje de viabilidad, los resultados en el grupo que se transportó en medio con PE-ST más anfotericina B fue de 67.79%, en contraste con el grupo transportado en medio con sólo PE-ST que fue de 58.88%. A la prueba de U de Mann Whitney se obtuvo una diferencia significativa, lo que indica que se obtiene un porcentaje de viabilidad mayor al agregar el antifúngico en el medio de transporte. Esto es debido a que, incluyendo ambos fármacos (PE-ST + anfotericina B) existe un mayor espectro de actividad antibacteriana. En el estudio de Martín-Piedra y colaboradores transportaron las piezas dentales en un medio conformado por DMEM con PE-ST y anfotericina

na B, llegando a obtener un porcentaje de viabilidad > 75%.⁶ El resultado fue mayor que el de este estudio, la razón podría ser porque utilizaron DMEM en su medio de transporte, mientras que en esta investigación se utilizó solución de cloruro de sodio al 0.9%.

En este estudio se utilizó la pulpa dental de molares y premolares extraídas en pacientes entre 18 y 29 años. Para hallar la correlación entre el número total de células con respecto a la edad del donante se aplicó la prueba de correlación de Pearson. El resultado tuvo una tendencia de correlación negativa, es decir, que a mayor edad del donante, hay una ligera disminución del número de células de la pulpa dental. Sin embargo, el resultado fue estadísticamente no significativo. En el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la edad la correlación fue positiva y el resultado fue estadísticamente no significativo. El resultado puede deberse a que se utilizó un rango de edad corto. Para poder corroborar los datos, el tamaño de la muestra debería ser mayor que el se obtuvo en este estudio y con un rango de edad más amplio. Según investigaciones anteriores que han considerado pacientes con diferentes rangos de edades, han obtenido buenos resultados de viabilidad celular. Por ejemplo, en el estudio que realizaron Horibe y su equipo utilizaron piezas dentales de pacientes de un grupo con un rango de edad de 19 a 30 años y otro grupo entre 40 y 70 años, observando que a mayor edad hay una ligera disminución en las características de viabilidad celular, aunque es muy similar a las características de viabilidad de los donantes jóvenes.⁷ Otros autores como Bressan que consideró donantes de 16 a 66 años y Kellner quien realizó un estudio con pacientes entre 12 y 30 años de edad, también llegaron a demostrar que existe una mínima alteración en las características de viabilidad de las células de la pulpa dental en relación con la edad del donante.^{8,9} Con los resultados de este estudio y las referencias, se concluye que es posible considerar los dientes de pacientes de diferentes edades de gran utilidad para las investigaciones de células de la pulpa dental.

El tiempo que transcurrió desde el momento de la exodoncia de la pieza dental hasta la obtención de la pulpa dental en el laboratorio fue en un intervalo de dos a 24 horas. Según los resultados, con respecto al tiempo transcurrido, se observó que hay una correlación negativa entre el tiempo y el número total de células, es decir, que mientras más tiempo pase, la cantidad de células irá disminuyendo. Con respecto al tiempo transcurrido y el porcentaje de viabilidad celular, también existe una correlación negativa, pero con un resultado estadísticamente no significativo. En forma similar, estos hallazgos fueron observados por Perry y colaboradores.¹⁰

Los resultados de la relación entre el número de células y la viabilidad celular, según el sexo del donante, fueron estadísticamente no significativos. No se encontraron estudios con el número total y viabilidad de células de la pulpa dental según la relación mencionada.

Éste es el primer estudio realizado para comparar la viabilidad celular y el número total de células de la pulpa dental en relación con el medio de transporte con y sin la adición del antifúngico anfotericina B. Los resultados de este estudio demostraron que al utilizar anfotericina B en el medio de transporte se consiguió mayor cantidad de células viables de la pulpa dental, las cuales se pueden emplear para realizar cultivos celulares y otros trabajos de ingeniería tisular. Este estudio contribuye a la optimización de protocolos en el transporte de piezas dentales para el posterior aislamiento de células de la pulpa dental. Por lo tanto, se sugiere emplear la anfotericina B en el medio de transporte.

Original research

Transport medium with and without addition of amphotericin B and viability of dental pulp cells

Angela G Gavidia-Pacheco,*
Esperanza R Ayón-Haro*

* Laboratorio de Investigación en Biología Oral y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

ABSTRACT

Introduction: The study of stem cells is a topic of interest in the field of research and regenerative medicine. One source of stem cells is the human dental pulp, which can be obtained with simple and non-invasive procedures. For successfully isolating dental pulp cells it is vital to follow strict protocols, considering adequate techniques and the necessary care to avoid contamination from the moment of tooth extraction until its delivery in the transport medium. In this investigation, the objective was to compare two transport media and evaluate cell viability in both of them. **Material and methods:** Two groups were compared, the teeth of group 1 were transported in a medium with antibiotics penicillin-streptomycin; in group 2 the transport medium contained the above antibiotics plus amphotericin B. Thirty three teeth were collected from patients aged between 18 to 29 years. For the evaluation of cell viability, trypan blue dye was used; then, the cell count was performed with a hemocytometer using a microscope. **Results:** The mean number of cells and the percentage of cell viability were higher in group 2 than in group 1; there was a statistically significant difference between the groups. **Discussion:** A major quantity of viable cells was obtained using amphotericin B in the transport medium.

Keywords: Amphotericin B, cell survival, dental pulp.

INTRODUCTION

Today, stem cells are a topic of great interest in the field of research and for regenerative medicine thanks to the development of new techniques to regenerate tissues damaged by injuries or diseases.¹ Human dental pulp is one of the alternatives as a source of a wide variety of cells. This tissue contains stem cells that possess high proliferation potential and multi-line differentiation capability. Access and extraction of pulp tissue are performed with simple and non-invasive procedures. This is an advantage in regenerative medicine and dentistry in contrast to procedures for obtaining stem cells from other sources, such as bone marrow stem cells.²

The success of the isolation of dental pulp cells, such as stem cells or fibroblasts, depends on following strict protocols, techniques and care throughout the whole procedure, which starts from tooth extraction. The presence of about 600 microbial species in the mouth makes it necessary to disinfect the extracted tooth and transport it in a media as aseptic as possible. To avoid culture contamination, drugs such as antibiotics and antifungals are added to the transport and culture media.³⁻⁶ Previous studies used only antibiotics such as penicillin, streptomycin, and gentamicin; others also added antifungals such as amphotericin B.³⁻⁶ Yildirim et al. used a saline buffered transport medium capped with Dulbecco phosphate (DPBS) with 1% penicillin-streptomycin (PE-ST) antibiotics.⁵ Martin-Piedra et al. used in the transport medium antibiotics with amphotericin B and managed to obtain the amount of viable stem cells from the dental pulp necessary to achieve a successful cell culture.⁶ Yet, it has not been possible to compare the mean number of cells obtained in this study with previous research, because those investigators did not mention the total number of cells obtained after transportation.

The goal of this study was to evaluate cell viability comparing two transport media for extracted teeth: one with antibiotics (PE-ST) and the other with the same antibiotics plus amphotericin B. This research will help choose the most suitable transport medium for cell viability in order to obtain successful cultures of dental pulp cells. In this study we used antibiotics with amphotericin B in the transport medium and obtained more viable cells than when antibiotics alone were used. In addition, studies on dental pulp cells can be applied in regenerative medicine to treat various diseases, such as bone regeneration, congenital problems, tumors, and trauma to the craniofacial massif.

MATERIAL AND METHODS

This study had an experimental, analytical, prospective cross-sectional design. The following groups of transport medium of extracted teeth were compared: group 1: penicillin + streptomycin (16 teeth); group 2: penicillin + streptomycin + amphotericin B (17 teeth).

Obtaining of dental pulp cells

The cells of dental pulp were obtained from premolars and third molars from young adult patients aged 18 to 29 years. Teeth were surgically extracted by professional indication at the Surgical Center of the University of San Martín de Porres Dental Center. Informed consent was previously obtained and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry at the University of San Martín de Porres. The sample size was calculated on the basis of the cell viability study by Martin-Piedra et al.⁶ For this research the dental pulp of 33 teeth divided into two groups were used.

To obtain the cells of the dental pulp, first teeth were extracted and immediately stored in flasks with culture medium. The flasks were transported to the laboratory in a cooler with ice packs, at 4-8 °C temperature. Group 1 consisted of teeth transported individually in sterile flasks with the transport medium including PE-ST. Group 2 consisted of teeth transported in the same way but with transport medium including PE-ST plus amphotericin B. Then, inside the laminar flow cabinet, each tooth was disinfected with gauze soaked in 70% alcohol and placed in a tube with minimum essential medium (MEM) plus PE-ST at 0.5% for 20 minutes. Subsequently, the pulp tissue was removed using the mechanical fracture method. The fractured tooth was placed on a Petri dish with MEM plus PE-ST and the cameral pulp was removed. The pulp was crushed to obtain a cell suspension; it was centrifuged at 1100 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded and the cell sediment or pellet was resuspended with MEM. Next, a volume of 10 µL of the suspension was taken to determined cell viability by trypan blue dye exclusion test. Cell count was performed using a hemocytometer and a compound optical microscope. The viable cells were transparent and the dead cells were stained blue. Finally, the viability percentage value was obtained using the following formula:

$$\text{No. cells/vol. solution} = \frac{\text{no. viable cells} \times \text{dilution factor} \times 10,000}{\text{No. of counted quadrants}}$$

$$\text{Viability \%} = \frac{\text{no. viable cells} \times 100}{\text{Total no. of cells}}$$

Statistical analysis

The IBM SPSS program, version 21, was used for statistical analysis. A 95% confidence interval ($p = 0.05$) was considered as statistically significant for differences between the means of the groups. Student's t-test was used to compare two means of parametric data. For data that did not meet the above condition, Mann Whitney's nonparametric U test was used. In addition, χ^2 test and Pearson and Spearman correlation tests were used.

RESULTS

The characteristics of age, sex, tooth type, and elapsed time (hours) for sample processing in both groups were similar; there were no significant differences ($p > 0.05$) (Table 1).

Two transport media were compared in order to determine the most efficient medium to obtain viable cells from dental pulp. The compound optical microscope was used for cell count, and the cells were dyed with trypan blue dye. The viable cells had a round shape with a defined halo, whereas the dead ones were completely dyed blue. Cell viability was determined with the help of the formulas described above.

The comparison between groups with Mann Whitney's nonparametric U test showed that both the number of cells and the percentage of cell viability were higher in group 2 (total number of cells $p = 0.026$ and percentage of cell viability $p = 0.0001$; Figures 1 and 2). This result was statistically significant.

In group 1, a slightly higher number of cells and better percentage of cell viability was observed in women compared with men ($p = 0.711$ and $p = 0.266$, respectively); however, this difference was not statistically significant (Table 2).

In group 2, the mean number of cells was slightly higher in the pulp of men, whereas cell viability was very similar between men and women. No statistically significant difference in number of cells or cell viability ($p = 0.174$ and $p = 0.651$, respectively) was observed between men and women in this group (Table 2).

A weak negative correlation was noted between age and number of cells, but it was not statistically significant between groups ($p = 0.445$ and $p = 0.320$, respectively). On the other hand, a moderate positive correlation between age and cell viability was observed, but again there was no significant difference between groups ($p = 0.064$ and $p = 0.103$, respectively) (Table 3).

Regarding the correlation between time elapsed from tooth extraction and number of cells, there was

a statistically significant strong negative correlation in both groups ($p = 0.001$ and $p = 0.034$, respectively). The correlation between elapsed time and cell viability was also negative of near-moderate magnitude but not statistically significant in both groups ($p = 0.055$ and $p = 0.233$, respectively) (Table 3).

DISCUSSION

We obtained the largest number of viable cells in the study group to which amphotericin B was added, compared with the group that had only PE-ST antibiotics. The mean number of cells in group 2 was higher (2.73×10^6) than that in group 1 (2.13×10^6). Amphotericin B may have helped maintain a transport medium with less contamination and a better preservation for the sample until the time of processing in the laboratory. Previous research has used different transport media and drugs (antibiotics and antifungals) at different concentrations in order to keep the medium as uncontaminated as possible. Some investigators have used only antibiotics such as penicillin, streptomycin, and gentamicin.³⁻⁶ Yildirim et al. used a DPBS transport solution with PE-ST antibiotics at 1%.⁵

Other researchers have added antifungals such as amphotericin B.³⁻⁶ Yet, none have made a comparison between transport media with different drugs. In our study, we found a statistically significant difference by use of amphotericin B vs. use of antibiotics only and we can conclude that by adding amphotericin B to the transport medium more cells are obtained from dental pulp. On the other hand, the mean number of viable cells obtained in this study could not be compared with that of previous research because we found no mention of such data.³⁻⁶

Regarding the percentage of viability, the results in the group of teeth transported in the medium with PE-ST plus amphotericin B was 67.79%, in contrast to the percentage in the group of teeth transported in the medium with PE-ST alone, which was 58.88%. The difference was significant, indicating that a higher viability percentage is obtained by adding the antifungal to the transport medium. The reason is that by including both types of drugs (PE-ST + amphotericin B) there is a higher spectrum of antibacterial activity. In the study of Martin-Piedra et al., they transported the teeth in a medium consisting of DMEM with PE-ST and amphotericin B, achieving a viability percentage $> 75\%$.⁶ The result was higher than that obtained in this study, perhaps because of the use of DMEM, while in this research we used a 0.9% sodium chloride solution.

In this study, we used the pulp of molars and premolars extracted from patients aged 18 to 29 years. The correlation between total number of cells and donor age showed a negative trend; i.e., the number of cells in the dental pulp decreased slightly with age. However, the result was not statistically significant. The correlation between percentage of cell viability and age was positive but the result was not statistically significant either. This may be due to the short age range of our donors. In order to corroborate the data, the sample size should be larger than that used in this study and with a wider age range. Previous research that has included patients with different age ranges has obtained good cell viability results. For example, Horibe et al. formed two groups of patients, one with an age range between 19 and 30 years and the other with ages between 40 and 70 years. The researchers observed only a slight decrease in cell viability at older ages in comparison with young donors.⁷ Other authors such as Bressan, who included donors aged 16 to 66 years, and Kellner, who conducted a study with patients between 12 and 30 years of age, also found a minimal difference in the viability of dental pulp cells in relation to the donor's age.^{8,9} Thus, the results of this study and the above mentioned research confirm that the teeth of patients of different ages are useful for dental pulp stem cell culture.

The time elapsed from tooth extraction to the obtaining of dental pulp in the laboratory was between 2 and 24 hours. There was a negative correlation between elapsed time and total number of cells; that is, the longer the time the less the number of cells we obtained. With regard to the elapsed time and the percentage of cellular viability, there was also a negative correlation, but with a statistically not significant result. Similarly findings were observed by Perry et al.¹⁰

The results of the relationship between cell count and cell viability according to donor sex were not statistically significant. No studies were found that indicated the total number and viability of dental pulp cells according to the above relationship.

This is the first study comparing cell viability and total number of cells obtained from dental pulp in relation to transport media with and without the addition of antifungal amphotericin B. Our study showed that the use of amphotericin B in the transport medium resulted in a greater number of viable cells from dental pulp, which can be used for cell cultures and other

tissue engineering work. This investigation contributes to the optimization of protocols in the transport of teeth for isolation of dental pulp cells. Therefore, we recommend including amphotericin B in the transport medium for a better preservation of samples.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L et al. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol.* 2015; 15: 14.
2. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* 2012; 24 (69): 4372.
3. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PLoS One.* 2012; 7 (11): 489-495.
4. Derakhshani A, Raouf M, Dabiri S, Farsinejad AR, Gorjestani H, Yaghoobi MM et al. Isolation and evaluation of dental pulp stem cells from teeth with advanced periodontal disease. *Arch Iran Med.* 2015; 18 (4): 211-217.
5. Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T. The comparison of the immunologic properties of stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and dental follicles. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 4682875.
6. Martin-Piedra M, Garzon I, Oliveira A, Alfonso-Rodríguez C, Carriel V, Scionti G et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cells cultures. *Cytotherapy.* 2014; 16 (2): 266-277.
7. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y et al. Isolation of a stable subpopulation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e98553.
8. Kellner M, Steindorff M, Stempel J, Winkel A, Kühnel M, Stiesch M. Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement. *Arch Oral Biol.* 2014; 59 (6): 559-567.
9. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D et al. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS One.* 2012; 7 (11): e49146.
10. Perry B, Zhou D, Wu X, Yang F, Byers M, Chu G et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14 (2): 149-156.

Dirección para correspondencia /
Mailing address:
Esperanza R Ayón-Haro
E-mail: eayonh@usmp.pe