



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

Sara Beatriz Quijano Guauque

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Maestría en Odontología
Bogotá, Colombia

2016

Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

Sara Beatriz Quijano Guauque

Tesis presentada(o) como requisito parcial para optar al título
Magister en Odontología

Director:

Jaime Eduardo Castellanos MSc, PhD

Profesor Asociado. Grupo de investigación Básica y Aplicada en Odontología,
Departamento de Ciencias Básicas y Medicina Oral. Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia

Codirector:

Claudia García-Guerrero, DDS, MSc

Profesor Asociado. Grupo de investigación INVENDO. Departamento de Ciencias
Básicas y Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de
Colombia, Bogotá, Colombia

Línea de Investigación:

Microambiente Seguro para Endodoncia Regenerativa

Grupo de Investigación: INVENDO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología, Maestría en Odontología.

Bogotá, Colombia

2022

Declaración de obra original

Yo Sara Beatriz Quijano Guauque declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Sara Beatriz Quijano Guauque

Fecha 14/02/2022

Resumen

Título en español: Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

Introducción: La regeneración pulpo-dentinal, requiere desinfección y acondicionamiento intraconducto para cumplir los objetivos terapéuticos. Los quelantes modifican la superficie y liberan moléculas bioactivas que estimulan las células madre de la papila apical (SCAPs). El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), quelante capaz de liberar proteínas inmersas en la matriz, ejerce un efecto residual sobre las SCAPs, y altera negativamente la superficie al utilizarse con hipoclorito de sodio. Quitosán (QS) en solución o nano-particulado (QSnP), polímero natural, antimicrobiano y quelante, induce estabilidad biológica, ampliando las alternativas para el acondicionamiento dentinal. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de dos preparaciones de quitosán para liberar proteínas de la matriz dentinal radicular y describir los cambios en la composición química, posterior al efecto quelante. **Materiales y Métodos:** Estudio experimental cuantitativo *in-vitro* para cuantificar sialoproteína dentinal (DSP), factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF β 1), factor de crecimiento del Endotelio Vascular (VEFG) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas Isoforma BB (PDGF-BB) liberadas con agentes quelantes. 24 hemirraíces (n=6) fueron distribuidas en 4 grupos durante 5 minutos en solución tamponada con Tris (TBS), EDTA, QS y QSnP, Posterior incubación a 37°C durante 7 días, se recogieron sobrenadantes y se congelaron hasta su procesamiento. Un ensayo ELISA cuantificó DSP. Para TGF β 1, VEFG y PDGF-BB, un panel de citoquinas fue realizado. Kruskal-Wallis con Wilcoxon identificó diferencias entre los grupos. Espectroscopia Raman permitió el análisis no destructivo de los cambios químicos superficiales. **Resultados:** La liberación de TGF- β 1, VEGF, y DSP dentinal, fue identificable en todos los grupos. La liberación de TGF- β 1, ocurrió con todos los quelantes y mayor la mayor liberación de DSP ocurrió con QSnP. PDGF-BB no superó los límites de detección. **Conclusión:** La utilización de agentes quelantes permitió la solubilización de TGF- β 1, VEGF, y DSP inmersos en la matriz dentinal radicular siendo QSnP quien promovió una liberación significativa de DSP. La espectroscopia Raman identificó la capacidad de quelación para QS y QSnP y su interacción con otros componentes de la matriz.

Palabras Clave: Regeneración, Endodoncia, Quitosano, Péptidos y Proteínas de Señalización Intercelular, Dentina.

Abstract

Título en inglés: Effect of two irrigating solutions of chitosan on the release of bioactive proteins from root dentin

Introduction: Dentin- Pulp regeneration requires disinfection and intracanal conditioning to achieve therapeutic objectives. Chelators modify the surface and release bioactive molecules that stimulate stem cells of the apical papilla (SCAPs). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a chelating agent capable of releasing proteins embedded in the matrix, exerts a residual effect on SCAPs, and negatively alters the surface when is used with sodium hypochlorite. Chitosan solution (QS) or nanoparticulate (QSnp), is a natural, antimicrobial, and chelating polymer, that induces biological stability, broadening the alternatives for dentin conditioning. For this reason, the objective of this work was to determine the capacity of two chitosan preparations to release proteins from the root dentin matrix and to describe the changes in the chemical composition, after the chelating effect. **Materials and Methods:** Quantitative in-vitro experimental study to quantify dentinal sialoprotein (DSP), Transforming Growth Factor Beta (TGF β 1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEFG) and platelet-derived growth factor Isoform BB (PDGF-BB) released with chelating agents. 24 Hemi-roots (n=6) were distributed in 4 groups and immersed for 5 minutes in the chelating solution. Subsequent incubation at 37°C for 7 days, supernatants were collected and frozen until processing. An ELISA assay quantified DSP. For TGF β 1, VEGF, and PDGF-BB, a cytokine bead array was performed. Kruskal-Wallis with Wilcoxon identified differences between groups. Raman spectroscopy allowed a non-destructive analysis of the chemical changes in the dentinal surface. Results: The release of TGF- β 1, VEGF, and dentinal DSP was identifiable in all groups. The release of TGF- β 1 occurred with all the chelators and the greatest release of DSP occurred with QSnp. PDGF-BB did not exceed detection limits. **Conclusion:** The use of chelating agents allowed the solubilization of TGF- β 1, VEGF, and DSP immersed in the radicular dentinal matrix. QSnp promotes a significant release of DSP. Raman spectroscopy identified the chelating ability for QS and QSnp and their interaction with other matrix components.

Key Words: Regeneration, Endodontics, Chitosan, Intercellular Signaling Peptides and Proteins, Dentin.

Contenido

	Pág.
Resumen	IV
Lista de figuras.....	VIIIIII
Lista de tablas	IV
Introducción	¡Error! Marcador no definido.1
Materiales y Métodos	¡Error! Marcador no definido.3
Resultados.....	¡Error! Marcador no definido.7
Discusión.....	2¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones.....	25
Bibliografía	27

Lista de figuras

Pág.

Figura 1

Plantilla para panel de citoquinas específicamente diseñada en el *SoftwareBD Accurri C6*, para la obtención de los tres analitos de interés TGF- β 11, VEGF y PDGF-BB en sobrenadantes de dentina radicular.....16

Figura 2.

Espectro Raman de 500 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} para el tejido dentinal radicular. (a) Material inorgánico (b) Contenido orgánico.....20

Figura 3.

Proporción mineral a matriz (MMR) de dentina obtenida por mediciones de espectroscopia Raman, (a) Carbonato (1071 cm^{-1}) /Fosfato (960 cm^{-1}), (b) Fosfato/Amida (1071 cm^{-1})/Amida (1665 cm^{-1}) (c) Carbonato (1071 cm^{-1})/Amida (1665 cm^{-1}).....21

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Distribución de la Muestra en grupo experimentales.14

Tabla 2. Valores promedio de liberación de DSP, TGF- β 1, VEGF, PDGF-BB en dentina radicular:.....19

Introducción

La regeneración del complejo pulpo-dentinal requiere de un microambiente apropiado que integre la triada de la ingeniería tisular para restaurar el sistema de conductos radiculares a un estado saludable (1). Los tres elementos pilares para lograr este objetivo clínico incluyen células indiferenciadas provenientes de la papila apical (SCAPS), un andamio proporcionado por el coagulo de fibrina y la dentina radicular previamente acondicionada, que dispone de moléculas de señalización capaces de promover la adhesión, la viabilidad y la diferenciación celular para la consecución de un complejo pulpo - dentinal similar al original (2,3).

Aunque el tratamiento regenerativo para revascularizar dientes que han interrumpido su proceso de formación, estima un 80% de éxito según el cumplimiento de los objetivos clínicos (4); los hallazgos tisulares y moleculares, indican resultados aleatorios entre los que se observan: espacios intraconductos vacíos, espacios mineralizados con formación de tejidos similares a dentina, a hueso, a cemento o la inclusión de un tejido conectivo interradicular, similar al ligamento periodontal (5). Las investigaciones concluyen, que la regeneración o reparación del tejido dependerá del microambiente intraconducto disponible para que las SCAPS puedan diferenciarse mediante señales moleculares disponibles *in situ* en una superficie dentinal previamente acondicionada (6).

Al respecto, la matriz orgánica dentinal secretada por los odontoblastos durante la dentinogénesis, ha sido considerada como reservorio de moléculas no colágenas, que permanecen fosilizadas en unión con glucosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (PG), conservando su papel bioactivo en el tiempo (7). Citocinas, factores de crecimiento, proteínas neurotróficas y moléculas de matriz extracelular dentinal como las proteínas de la familia "***Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins***" (SIBLING), han sido identificadas (8). Una vez liberadas por efectos de desmineralización de la matriz, estas proteínas podrían actuar acorde con su especificidad, modulando la inmuno-respuesta tisular, ejerciendo efectos quimiotácticos, angiogénicos, de proliferación y diferenciación sobre las células SCAPS (9).

Entre las moléculas más estudiadas, el factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β 1), se reconoce como la molécula de señalización, aparentemente más disponible (10). Su identificación en la región superficial de la dentina ha permitido comprender su función como responsable de la actividad proliferativa celular, iniciador de la diferenciación odontoblástica y modulador de la formación de la matriz extracelular dentinal (11).

12 Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

Otras moléculas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas Isoforma BB (PDGF-BB) (12), el factor de crecimiento del Endotelio Vascular (VEFG) (13) y la sialo-proteína Dentina (DSP) (14), han sido asociadas respectivamente a procesos de adhesión celular, a formación de redes vasculares y a un mecanismo preliminar de diferenciación celular hacia un linaje odontogénico, por lo que resultan particularmente relevantes en la regeneración del complejo pulpo-dentina.

Durante el tratamiento de dientes que han interrumpido su formación radicular, un espesor dentinario reducido, impide la instrumentación mecánica. Por lo tanto, toda la acción terapéutica se basa en el acondicionamiento químico (5), que inicia con un esquema de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl), una solución altamente denaturante de proteínas que se complementa con el uso de soluciones quelantes tipo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como irrigante final. La posibilidad de liberación de las moléculas bioactivas y su disponibilidad intraconducto, dependerá en gran medida de la quelación, y aunque el EDTA promueve una elevada liberación proteica dentinal (15), no logra controlar la degradación proteica que promueve el NaOCl aún en bajas concentraciones, generando superficies altamente hidrofílicas, desinfectadas pero proteicamente reducidas para garantizar la adecuada interfaz coágulo-dentina y la disponibilidad de las moléculas de señalización inmersas en la matriz (1). Adicionalmente el efecto residual del EDTA como irrigante final reduce la superficie celular hacia una morfología más redondeada carente de extensiones sobre la superficie dentinal, evento que, sumado al agotamiento de los iones de calcio, impide el contacto célula a célula lo que se traduce en adhesión disminuida al sustrato (16, 17). Esta constante ha sido reportada en la literatura caracterizando el resultado de las terapias regenerativas como reparativo más que regenerativo (18). Por lo tanto, explorar otras alternativas de soluciones quelantes con efectos antimicrobianos reportados, y capaces de mantener la integridad orgánica superficial y disponible en el espacio intraconducto, se hace necesario.

Al respecto, el quitosán un polímero catiónico de origen natural producto de la des-acetilación de la quitina, que es biodegradable, biocompatible, antimicrobiano, quelante y versátil, ha sido propuesto como solución irrigadora alternativa en endodoncia (19). La preparación de quitosán en solución (QS) presenta una limitada capacidad de penetrar la anatomía dentinal radicular dado su alto peso molecular, motivo por el cual la presentación en nanopartículas (QSnP) se justifica en pro de garantizar un mejor desempeño. Aunque estas soluciones, han sido evaluadas como irrigantes bajo los objetivos microbiológicos en endodoncia, y prometen un efecto quelante satisfactorio (19-21), su papel en la liberación de moléculas de señalización y su efecto sobre las características químicas del sustrato, aún no han sido evaluados. Por lo tanto, se pretende con el desarrollo de la presente investigación, determinar la capacidad de dos preparaciones de quitosán para liberar proteínas bioactivas de la MED radicular y describir los cambios en la composición química, posterior al acondicionamiento con diferentes agentes quelantes. La hipótesis nula planteada entonces, es que

la liberación de proteínas matriciales (DSP, TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB) y los efectos químicos en dentina radicular son similares cuando se utilizan tres soluciones quelantes diferentes: EDTA 17%, Solución de QS 0.2 % o Solución de QSnP.

Materiales y Métodos:

Estudio experimental cuantitativo *in-vitro*, aprobado por el Comité de ética e investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia Acta B. CIEFO- 335-19, realizado bajo las consideraciones éticas nacionales con Res.8430-93 y las condiciones señaladas por la norma ISO11405 de 2015, (22) que estandariza el manejo de muestras para pruebas de laboratorio.

Criterios de Elegibilidad

Unidad de estudio y Selección de la Muestra

La unidad de observación incluyó premolares permanentes intactos vitales, con formación radicular completa, sin caries, sin defectos del desarrollo o líneas de fractura. Los dientes incluidos fueron extraídos por razones ortodónticas y bajo firma de consentimiento informado fueron donados de pacientes entre los 18 y 20 años. La integridad dental fue confirmada bajo la observación con estereomicroscopio (SMZ1000, Nikon Corp., Tokyo, Japan). Aquellos dientes que presentaran daño mecánico tisular ocasionado por el uso de fresas de alta o baja velocidad ocasionado durante el procedimiento de exodoncia y que interrumpiera la continuidad original de la superficie radicular fueron excluidos.

Preparación de la Muestra

Inmediatamente posterior a la exodoncia, cada muestra fue lavada bajo chorro de agua y limpiada con toallas de papel para la eliminación de tejido sobre la superficie radicular. Los dientes fueron decoronados a nivel de la unión amelocementaria y hemiseccionados con un disco mecánico de diamante a baja velocidad con irrigación constante de agua destilada (Isomet, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EE.UU.) Posteriormente, las raíces fueron divididas longitudinalmente en dirección buco lingual para exponer la extensión del conducto radicular. El tejido pulpar fue removido, con una lima K Flexo File® 10/.02 (Dentsply Maillefer®) para continuar con un lavado ultrasónico de cada hemirraíz durante 8 minutos con solución tamponada con tris (TBS) en Vita Sonic II fur In-Ceram (Vita, Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co.KG) e inmediatamente fueron codificados y llevados a -80°C en seco en un tubo Eppendorff hasta su procesamiento. Posterior a esto, bajo la utilización de la

14 Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

herramienta "Aleatorio" en Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, WA, USA) se realizó la asignación de las muestras a cada grupo de estudio.

Obtención de soluciones experimentales

EDTA

La solución de EDTA al 17% fue adquirida en la presentación comercialmente disponible: EDTA EUFAR (Eufar®, Bogotá, CO) y fue almacenada en un recipiente cerrado, dispuesto en un lugar fresco y protegido de la luz.

Síntesis de QS y QSnP:

Para la preparación del QS se requirieron 2g de quitosán de bajo peso molecular: 50 -190 kDa (Sigma Aldrich, San Luis, MO, USA) soluble en ácidos acuosos, con viscosidad de 20-300 cP, mezclado con 100.0 ml de solución de ácido acético al 1% v/v, bajo agitación magnética (Heidolph, Schwabach, Alemania), por aproximadamente dos horas, hasta obtener una solución homogénea cristalina con un pH aproximado de 3.2(20).

Las nanopartículas de QS (QSnP) fueron elaboradas bajo el método de gelación iónica por goteo (23), añadiendo a QS, tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, E.U), de 1mg/ml y posterior mezcla con homogeneizador UltraTurrax® (IKA, Sataufen, DEU) a 5000 rpm durante 15 minutos (24), obteniendo un tamaño de partícula de $248,1 \pm 4,07$ nm y un pH de 4,58 .

Distribución de la muestra y protocolo de inmersión

Tabla 1. Distribución de la Muestra en grupo experimentales.

Grupo	Irrigante	Concentración	Tiempo de exposición (min)	n
G1	TBS		5	6
G2	EDTA	17%	5	6
G3	QS en dispersión	0.2%	5	6
G4	QSnP	QS 0.2% + solución de 1mg/1ml de TPP	5	6

Un total de 24 hemi-raíces de 12 premolares fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales que contenían un volumen de inmersión estandarizado a 1.5 mL por cada solución irrigante por 5 min, garantizando el cubrimiento total de cada hemiraíz. La tabla 1 incluye el tipo de irrigante, las secuencias, concentraciones y tiempos de irrigación. Una vez cumplido el tiempo de aplicación, con el uso de una micropipeta se retiró la solución irrigante en su totalidad. Inmediatamente se agregaron 1.5mL de (TBS) para evitar un efecto prolongado de los quelantes. Las muestras se incubaron a 37°C durante 7 días.

Cuantificación de proteínas liberadas de matriz dentinal

Los ensayos de cuantificación de proteínas matriciales liberadas de la dentina radicular, posterior al tratamiento con agentes quelantes fueron realizados en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque. Se implementó un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para DSP y un panel de perlas de citoquinas (*cytokine bead array*, CBA) para TGF- β 1, VEGF y PDGF.

ELISA para cuantificación de DSP

Para cuantificar las concentraciones de DSP humana, se utilizó un kit de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (MyBiosource, San Diego, CA, USA). La curva estándar fue creada con la dilución seriada prevista en el kit. La densidad óptica fue determinada inmediatamente usando un espectrofotómetro a 450nm. Los datos se linealizaron trazando el logaritmo de las concentraciones de DSP frente al logaritmo de la densidad óptica teniendo en cuenta que el límite de detección establecido por el fabricante es de 0.781ng/mL. El ensayo fue realizado por duplicado.

Panel de perlas de Citoquinas (CBA) para cuantificación de TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB

Se utilizó un CBA personalizado para TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB humanas (LEGENDPlex, Biolegend, San Diego, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las muestras fue realizada a través del citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) utilizando detector FL-2 a 488nm y FL-4 a 633nm, con un límite de eventos ajustado a 2000. Se diseñó una plantilla específica para la obtención de los datos de los tres analitos estudiados. (Figura 1.)

Los datos obtenidos se llevaron al software de análisis de datos basado en la nube LEGENDplex™ QOGNIT, (<https://legendplex.qognit.com/>) para la estimación de las concentraciones de cada

16 Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

proteína, cuyos límites de detección establecidos por el fabricante son 8.46 pg/mL para TGF- β 1; 11.5 pg/mL para VEGF y 6.90 pg/mL para PDGF-BB. Este ensayo fue realizado por triplicado para cada muestra.

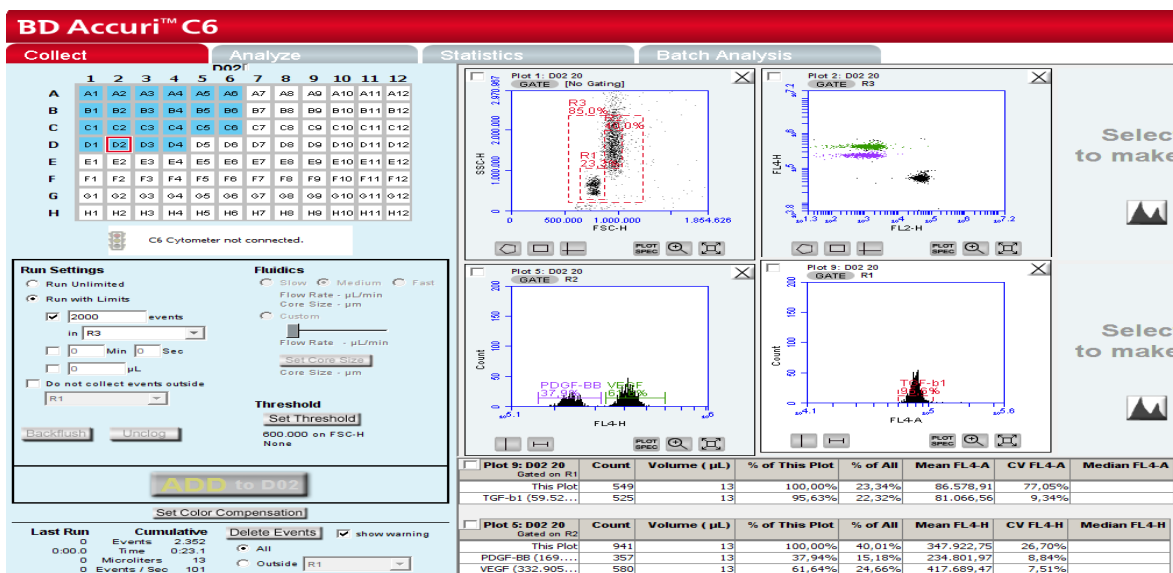


Figura 1. Plantilla para panel de citoquinas específicamente diseñada en el Software BD Accuri C6, para la obtención de los tres analitos de interés TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB en sobrenadantes de dentina radicular.

Análisis químico de los cambios en dentina radicular

Caracterización Raman

Se desarrolló un análisis descriptivo que identificó los cambios químicos de la superficie dental en 12 hemirraíces, seleccionadas de manera aleatoria, incluyendo 3 muestras por cada grupo de tratamiento. El presente análisis se desarrolló en el laboratorio de equipos comunes del departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, en el espectrómetro DXR3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Para medir la señal Raman se definió un rango de 500 a 3200 cm^{-1} . Se realizó calibración de longitud de onda e intensidad. Una potencia de 20 mW en la superficie de la muestra y un láser de diodo infrarrojo $\sim 0,5 \mu\text{m}^2$ a 780 nm fueron utilizados. Por cada muestra analizada, se adquirieron 3 espectros, en un punto aleatorio del tercio medio radicular, con posterior visualización en el software OMINC V8.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Cada lectura fue depurada para

eliminar las ondas cósmicas propias de la aplicación del rayo y el fondo de luminiscencia se eliminó mediante una corrección de la línea base para cada espectro obtenido.

Para la observación de los componentes de la matriz extracelular dentinal se tuvieron en cuenta los picos de observación $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (586 cm^{-1}); $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (960 cm^{-1}); CO_3^{2-} tipo A (1096 cm^{-1}); CO_3^{2-} tipo B (1071 cm^{-1}); amida III (1270 cm^{-1}); amida I (1665 cm^{-1}); uniones C-H (2942 cm^{-1}).

Para producir mapas a partir de las matrices espectrales, se integraron bandas seleccionadas en los espectros que producen matrices de intensidades transferibles e importados posteriormente de forma gráfica a través del software OriginPro Version 2021b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU) para su posterior análisis. Bandas observables en forma gaussiano-lorenziano fueron analizadas bajo normalización y suavizado de 25 puntos.

Para establecer la proporción de las fracciones del tejido dentinal tratado con los quelantes, se estableció una relación mineral/mineral; fosfato/carbonato (960 cm^{-1} - 1070 cm^{-1}) y mineral/matriz; fosfato-carbonato (960 cm^{-1} - 1070 cm^{-1}) / amida I (1665 cm^{-1}) (MMR). Un cálculo de las áreas integradas bajo la curva de cada pico que identifica el espectro definió el valor para cada uno de los tratamientos analizados (OriginPro Version 2021b) (25).

Análisis Estadístico:

Con los valores preliminares se realizó un análisis descriptivo que incluyó los valores promedio de liberación para cada grupo junto con sus desviaciones estándar. Para la interpretación de las concentraciones liberadas de DSP, TGF- β 11, PDGF-BB, VEGF a partir de sobrenadantes de dentina, un análisis preliminar de Levene identificó la no homocedasticidad en la distribución de los datos. Para estimar las diferencias entre grupos un análisis no paramétrico de Kruskal- Wallis y un *post hoc* Mann-Whitney-Wilcoxon rank-sum test con niveles de significancia al 5% ($\alpha < 0.05$). Todos los análisis fueron realizados en los softwares RStudio Team 2020 (RStudio, PBC, Boston, MA, EEUU). <http://www.rstudio.com/> y GraphPad Prism version 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California EEUU). www.graphpad.com.

Resultados

Cuantificación de la liberación de DSP dentinal

La predicción de las concentraciones de DSP liberadas fue realizada según la curva de calibración obtenida, con un R^2 igual a 0,9965. La presencia de DSP fue observable en todos los grupos de experimentación. Es importante resaltar que el acondicionamiento con QSnP, reportó la mayor concentración de DSP liberada (\bar{x} :3,66 ng/mL DE \pm : 2,17). La Tabla 2, incluye todos los valores

promedio de liberación para los grupos restantes. Un valor ($p=0,036$), identificó una diferencia significativa entre los valores de liberación para DSP entre todos los grupos con soluciones quelantes vs. el control negativo. Una comparación inter-grupos identificó una diferencia significativa entre QSnP-EDTA ($p=0.0387$); QSnP-QS ($p=0.0009$); QSnP-TBS ($p=0.0205$), siendo mayor el valor de liberación para QSnP. Un valor no significativo entre QS-EDTA-TBS confirmó similar capacidad de liberación para DSP.

Cuantificación de TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB liberadas de la matriz extracelular dentinal

La estimación de las concentraciones para la liberación de TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB, fue realizada según la curva de calibración. Un valor R^2 de 0,9851, 0,9715 y 0,9726, fue obtenido respectivamente para cada proteína.

Liberación de TGF- β 1

La presencia de TGF- β 1 se detectó en el medio de extracción en todos los cuatro grupos: la media de la concentración en el grupo de EDTA fue de 608,17 pg/mL, mientras que para los grupos QS y QSnP las concentraciones medias fueron de 837,14 pg/mL y 533,3 pg/mL respectivamente. El medio usado como control (TBS) extrajo 413,6 pg/mL. La Tabla 2, incluye los valores promedio y su desviación estándar. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de observación ($p: 0,0120$). Una liberación significativamente mayor para las hemi- raíces tratadas con los grupos quelantes: EDTA ($p= 0.0219$); QS ($p=0,0265$) y QSnP ($p=0.0010$) frente al grupo de TBS, fue estimada. Comparativamente la liberación de TGF- β 1 por EDTA-QS ($p=0,627$); EDTA-QSnP ($p=0,1610$); QS-QSnP ($p=0,8147$) no registró diferencia significativa entre los grupos de quelación, siendo mayor la liberación motivada por el QS.

Tabla 2. Valores promedio de liberación de DSP, TGF- β 1, VEGF, PDGF-BB en dentina radicular:

Tratamiento Proteína	TBS		EDTA		QS		QSnp	
	\bar{x}	DE \pm	\bar{x}	DE \pm	\bar{x}	DE \pm	\bar{x}	DE \pm
DSP(ng/mL) LD:0.781ng/mL	1,713	1,58	2,7	4,01	1,00	0,40	3,66	2,17
TGF-β1(pg/mL) LD:8.46 pg/mL	413,6	175,1	608,17	265,3	837,14	533,3	795.73	396,3
VEGF(pg/mL) LD: 11.5 pg/mL	26,22	1,5	24,12	1,7	24,16	1,7	19,53	7,8
PDGF-BB LD:6.90 pg/mL	4,48	0,8	4,19	0,7	3,76	0,9	3,97	1,5

(\bar{x}) media, (DE) Desviación estándar, (LD) Límite de detección.

Liberación de VEGF:

Se confirma que la matriz extracelular dentinal contiene VEGF potencialmente disponible y que es posible extraerlo mediante el acondicionamiento dentinal. A pesar de que QSnp presentó los menores valores de liberación, no existen diferencias significativas entre los grupos de irrigación analizados (p : 0,0993). Es importante resaltar que la concentración de VEGF liberada es mucho menor al compararse con TGF- β 1 (Tabla 2.).

Liberación de PDGF-BB

Es preciso indicar que, mediante la metodología utilizada, los valores reportados de extracción de PDGF-BB disponible en sobrenadantes de dentina, no superan los límites de detección de la prueba, (Tabla 2.) por lo que los valores obtenidos deben generar una lectura cuidadosa y no se ameritó el análisis cuantitativo.

Análisis físico y químico de los cambios en dentina radicular:

Para la obtención de los rasgos químicos del contenido dentinal se utilizó el mapeo Raman para trazar la distribución relativa de las vibraciones inorgánicas (fosfato y carbonato) $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (586 cm^{-1}); $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (960 cm^{-1}); CO_3^{2-} tipo A (1096 cm^{-1}); CO_3^{2-} tipo B (1071 cm^{-1}), (Fig. 4a). Y la fase orgánica

(Amida I(1665cm⁻¹), Amida III (1270cm⁻¹)y enlaces C-H(2942cm⁻¹). La Figura 2 a y b muestra los espectros del contenido inorgánico y orgánico de la superficie dentinal tratada bajo los diferentes quelantes y su control.

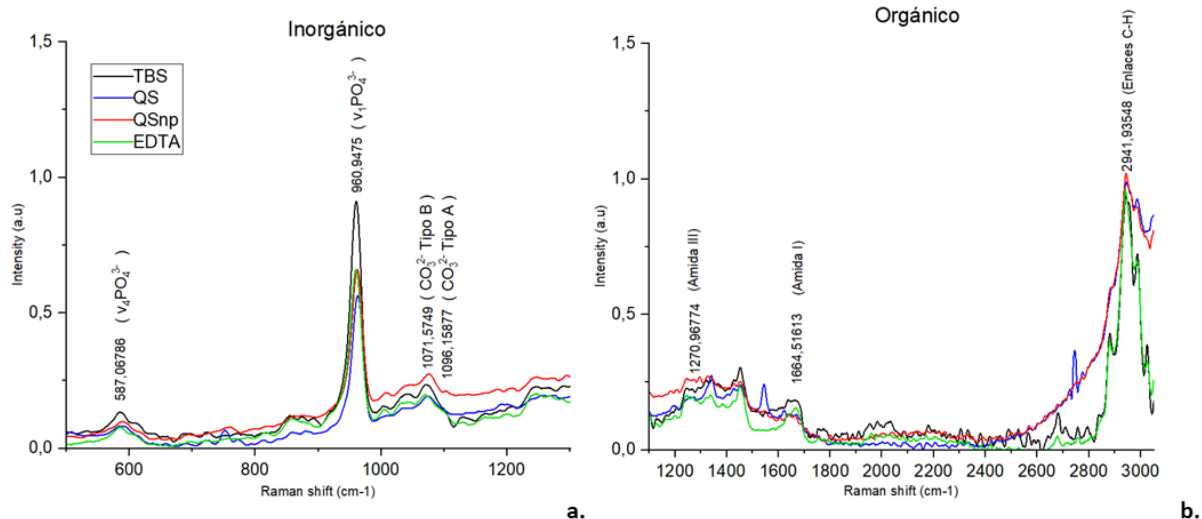


Figura 2. Espectro Raman de 500 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹ para el tejido dentinal radicular. (a) Material inorgánico (b) Contenido orgánico.

Un análisis individual por pico indicó: que para el grupo de fosfatos $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (960cm⁻¹) los tratamientos con QS, QSnp presentaron el área de pico más reducida, en comparación con el control negativo y el EDTA (Figura 2a) Para el grupo de carbonatos CO_3^{2-} tipo B (1071cm⁻¹) los tres quelantes se comportaron de manera similar entre ellos; el vehículo de TBS, representó un área de la curva mayor en comparación con los quelantes experimentales (Figura 2a) Para la fase orgánica, los quelantes, registran una reducción del contenido (Figura 2b), visible en una disminución del área del pico que corresponde a la Amida I (1665cm⁻¹), en comparación con el control negativo, no obstante, la mayor reducción estuvo relacionada con el grupo de QS. (Figura 2b).

El análisis cuantitativo a través de la obtención de la MMR, permitió identificar que la relación carbonato/fosfato 1070/960cm⁻¹ después del tratamiento con EDTA reduce el gradiente del contenido mineral proporcionalmente en comparación con TBS, QS y QSnp (Figura 3a). Ahora bien, la relación fosfato /amida I identificó similar proporción para los grupos QS y QSnp, por lo tanto, el MMR indicó mayor contenido orgánico sobre la superficie dentinal cuando la quelación fue realizada. (Figura 3b). Para la relación carbonato/amida I, el grupo de QSnp, presentó un menor

MMR, refiriendo probable reducción del contenido de carbonato en proporción al contenido orgánico (Figura 3c).

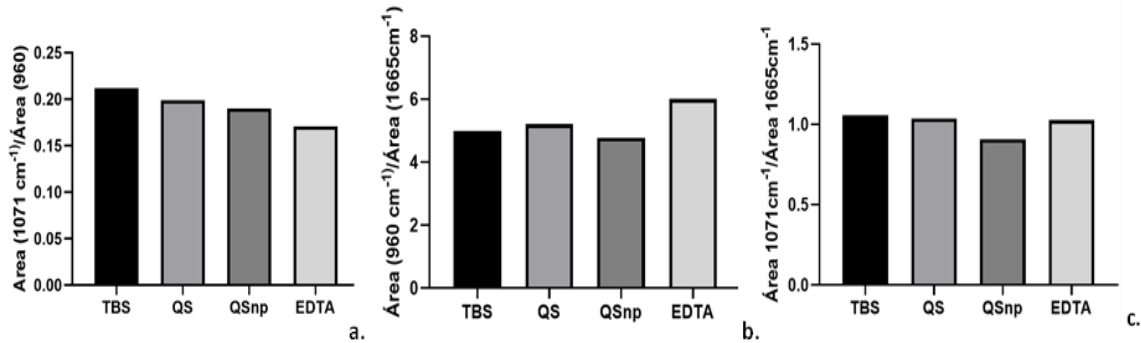


Figura 3. Proporción mineral a matriz (MMR) de dentina obtenida por mediciones de espectroscopia Raman, (a) Carbonato (1071cm^{-1}) /Fosfato (960cm^{-1}), (b) Fosfato/Amida (1071cm^{-1})/Amida (1665cm^{-1}) (c) Carbonato (1071cm^{-1})/Amida (1665cm^{-1})

Discusión:

Un microambiente del conducto radicular adecuadamente tratado bajo desinfección y acondicionamiento es esencial para el éxito del tratamiento endodóntico regenerativo (3). En este contexto, este trabajo fue realizado considerando la importancia de la utilización de agentes quelantes, en la liberación de factores de crecimiento inmersos en la matriz sin alterar en mayor proporción las características químicas de la dentina tratada.

Como principal resultado, la liberación de proteínas tipo TGF- β 1, VEGF, y DSP a partir de la matriz dentinal, fue identificable en todos los grupos analizados. Puntualmente, la liberación de TGF- β 1, estuvo motivada por todos los quelantes y la mayor concentración de DSP, fue liberada a partir de la quelación con QSnp.

Dos inmunoensayos cuantificaron las concentraciones de los analitos de interés; una prueba ELISA para DSP y un CBA para TGF- β 1, VEGF y PDGF-BB, representando el CBA mayor sensibilidad en la detección de múltiples proteínas y menor tiempo de procesamiento, lo que disminuye la posibilidad de error entre ensayos (25). Esta técnica, aplicada en otros campos de la investigación en salud (26), no ha sido comúnmente implementada para la cuantificación de proteínas en matriz dentinal, no obstante, con los resultados obtenidos quedó en evidencia su utilidad para endodoncia.

22 Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

En referencia al umbral de detección, que permite la cuantificación de cada factor por ensayo, las concentraciones liberadas para DSP, TGF- β 1 y VEGF, alcanzaron el umbral técnicamente establecido. Contrario, el PDGF-BB, asociado a la regeneración por su carácter angiogénico en diferenciación y proliferación celular (12), no alcanzó los límites de detección esperados imposibilitando el análisis cuantitativo. Zeng y cols. 2016 (27), sugieren que el PDGF-BB podría no estar disponible en la matriz dentinal o encontrarse en concentraciones insuficientes para ser cuantificado. Un hallazgo preliminar confirmó, que la integración del PDGF-BB a la matriz extracelular depende de la disponibilidad y afinidad con el proteoglicano versican (28), molécula fragmentada con baja inmuno-detección, limitada a la dentina peritubular (29). Por lo tanto, el efecto regenerativo del PDGF-BB se asocia al componente celular que ingresa al conducto radicular posterior a la estimulación de la papila apical (30), confirmando que la regeneración del complejo pulpo dentinal es multifactorial y depende de la integración de la tríada de la ingeniería tisular (1).

La propuesta de un modelo *in-vitro* que utiliza hemirraíz como unidad experimental, permitió identificar la liberación de factores TGF- β 1 y VEGF a expensas del acondicionamiento químico por agentes quelantes. Otras propuestas metodológicas que incluyen discos o polvos de dentina para potenciar la extracción de proteínas de matriz, elevan los valores de detección (15,31-33). No obstante, estos valores se alejan del microambiente intraconducto para endodoncia regenerativa y diseñar un modelo que represente las condiciones clínicas se hace necesario (27).

Un análisis individual por molécula indicó, que el TGF- β 1, representa la mayor proporción de liberación frente a otras proteínas de matriz dentinal (34). Zhao y cols., 2000, relacionan esta disponibilidad con su localización superficial, lo que facilita su liberación incluso por sustancias que no penetran profundamente el enmallado dentinal (11). Adicional a la localización superficial, el TGF- β 1 se une a los dos proteoglicanos más abundantes en la matriz; decorin y biglican (35), los cuales interactúan con las fibrillas de colágeno a expensas de su proteína central y su porción distal que conforma la cadena de condroitin sulfato cuya afinidad para iones Ca^{2+} favorece una unión estable con la hidroxiapatita (35). Este evento aseguró la liberación del TGF- β 1 después de quelar, sin diferencia entre el efecto que producen EDTA, QS o QSnP.

Biológicamente, la presencia de TGF- β 1 en la regeneración del complejo pulpo dentinal representa la regulación multifuncional de la proliferación celular, la cual bajo acción autocrina favorecerá la diferenciación, la apoptosis, la síntesis de matriz y en definitiva el desarrollo de la respuesta inmune (36). Por lo tanto, para garantizar la disponibilidad de TGF- β 1, el acondicionamiento final con soluciones quelantes durante las terapias regenerativas está totalmente justificado.

Múltiples reacciones biológicas y moleculares deben llevarse a cabo durante el proceso de regeneración, por lo que un desequilibrio entre los promotores de mineralización, y los factores pro o anti angiogénicos, podrían generar un perfil tisular diferente al original (5). Por lo tanto, la presencia adicional de factores de crecimiento como el VEGF, promotor de la vascularización pulpar motivó su identificación en el presente trabajo (37). La interacción VEGF/matriz se lleva a cabo a través de las cadenas de heparán sulfato en sidencan y fibronectina (38, 39); con mayor disponibilidad para dientes inmaduros en la vaina epitelial de Hertwig y la predentina como frente de mineralización (40). A pesar, que las concentraciones obtenidas para VEGF a partir de la quelación con EDTA, QS y QSnp en tiempos clínicos aceptados, se encuentran en el rango terapéutico establecido, es posible intuir que un modelo dental a partir de dientes inmaduros podría generar mayores valores de cuantificación (40), esta limitación debe ser tomada en cuenta para futuras investigaciones.

Durante la formación dental la DSP proteína SIBLING, es secretada por los odontoblastos en el frente de mineralización y su interacción con el colágeno permite su nucleación dentro de los cristales de hidroxiapatita (41). La presencia de DSP en el proceso regenerativo de células mesenquimales, por la vía de señalización ocludina (Ocln)- FAK (Quinasa de adhesión focal)-DSP induce la migración de SCAPS y su posterior diferenciación a células similares a odontoblastos (14). En estas condiciones, la DSP es primordial en el proceso de mineralización dentinal, adicionalmente, regula la expresión de biglycan y decorin, fundamentales para el correcto ensamblaje de la matriz dentinal (42). Como resultado del presente trabajo, fue posible confirmar la liberación de DSP a expensas de la quelación, siendo el QSnp, la solución que logra la mayor concentración de liberación, no obstante, al momento de presentar este documento, no fue posible identificar otro reporte de DSP humana liberada por soluciones quelantes de matriz dentinal. Por lo tanto, la falta de evidencia en referencia a los valores funcionales de DSP liberada *in situ*, sugiere comprobar su efecto sobre las SCAPS.

Ahora bien, si la liberación de proteínas inmersas en la matriz dentinal se promueve a partir de las soluciones quelantes, la composición química y el mecanismo de quelación que caracteriza cada sustancia, establecerá las diferencias.

El EDTA, un ligando hexadentado, forma un complejo estable entre los iones carboxilo y el calcio dentinal (43), facilitando la liberación de DSP, inmersa en los cristales de apatita, adicionalmente, la disminución del pH bajo el mecanismo de protonación podría tener un impacto sobre los proteoglicanos, evento que explica su eficiencia en la liberación de TGF- β 1 y VEGF (7). No obstante,

24 Efecto de dos soluciones irrigadoras de quitosán sobre la liberación de proteínas bioactivas de la dentina radicular.

su potente fijación sobre el ion calcio, puede producir lesiones de desmineralización después de un contacto prolongado con la dentina (44).

Por su parte el QS, una base débil, soluble en ácido acético, promovió la protonación de los residuos de glucosamina hacia $R-NH_3$ (19), resultando en un polímero altamente catiónico, capaz de interactuar con los PO_4 y CO_3 de la fracción inorgánica. Esta interacción iónica, desestabiliza el cristal de hidroxiapatita, facilitando la liberación de proteínas inmersas en los cristales o unidas a los proteoglicanos desde la dentinogénesis. Una presentación del QS a nano escala bajo gelación iónica (QSnP), podría aumentar su biodisponibilidad y su interacción durante la quelación (45), efecto que probablemente incrementó la liberación de DSP frente a los otros quelantes.

Acorde con su mecanismo de acción, los tres quelantes cumplieron con el proyecto de liberación de proteínas de matriz. El impacto que cada solución generó sobre la estructura química de la dentina se identificó por espectroscopia Raman.

Al respecto, el proceso de quelación dental se confirmó a expensas de la disminución de los picos que representan los grupos fosfatos y carbonatos como constituyentes de la fase inorgánica dental de manera similar para todos los agentes quelantes. Para establecer la proporción que representan los valores anteriormente expuestos, se construyen razones entre los diferentes componentes previamente identificados. Una proporción Carbonato/fosfato, indicó diferencias graficas evidenciables entre los grupos. Una representación del área bajo la curva indicó un mecanismo de quelación por QS y QSnP que redujo en mayor proporción el contenido de fosfatos, efecto que no representa una diferencia visiblemente significativa, pero se relaciona con la fuerte afinidad de la molécula por el grupo fosfato de la matriz (46); Contrario, el EDTA demostró su capacidad de quelación mediante su afinidad por el Calcio presente en los carbonatos. Una pérdida desproporcionada del Ca^{++} en dentina, podría modificar características físicas del tejido (47) e interferir en eventos regenerativos que requieren concentraciones de Calcio adecuadas para la proliferación, la adaptación y la diferenciación de las SCAPS (48).

Al observar la relación Fosfato/Amida, podríamos indicar que el efecto quelante de QSnP observable como la menor proporción gráfica identificada, mantiene la integridad de las Amidas tipo I representativas del colágeno dental. Kishen et al en 2008, identificaron en esta interacción CSnP (+) - matriz dental (-) un fenómeno electrostático con una fuerza de atracción que podría actuar como barrera de protección para la Amida I, otorgando a las nanopartículas, un beneficio clínico adicional (49). La relación Carbonato/Amida, resulta similar para los tres quelantes, siendo el grupo de QSnP, el que representó mayor reducción del contenido de carbonato, exponiendo en mayor proporción las fibras colágenas. Este aumento en la fase Amida I sugiere un beneficio del QSnP sobre el colágeno dental.

Conclusiones

Con los resultados de este trabajo, se logró confirmar la capacidad de los agentes quelantes para liberar las proteínas DSP, TGF- β 1 y VEGF presentes en MED radicular, a concentraciones reportadas en el rango necesario para que las SCAPS sean estimuladas. El modelo in-vitro propuesto, permitió la liberación de DSP, a través de la quelación, siendo el QSnP, la solución que generó una liberación significativa. La cuantificación de las concentraciones de PDGF-BB no alcanzó el límite de detección esperado. Mediante espectroscopia Raman fue posible identificar la capacidad de quelación para QS y QSnP y su interacción con otros componentes de la matriz Carbonatos, y Amida I.

Agradecimientos

El grupo de investigadores agradece al Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto, especialmente a los profesores Lilia Bernal y Félix G. Delgado.

Los autores niegan cualquier conflicto de interés relacionado con este estudio.

Financiamiento

El desarrollo del presente trabajo fue posible, gracias a la Convocatoria para el fortalecimiento de alianzas interdisciplinarias de investigación y creación artística de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional De Colombia 2018, por la cual fue favorecido. Código del proyecto: 41999

Productos

Presentación Oral: VII Congreso de la Región Latinoamericana de la IADR, LIV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, 10,11,12,13 de noviembre de 2021.

Título de la ponencia: Estructura Química de la dentina radicular tratada con irrigantes experimentales de quitosán y quitosán nano particulado.

Presentación Oral: VII Congreso de la Región Latinoamericana de la IADR, LIV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, 10,11,12,13 de noviembre de 2021.

Título de la ponencia: Effect of chelating agents on the solubilization of dentin sialoprotein.

Presentación Oral: XXXI Encuentro Nacional de Investigación Odontológica, Asociación Colombiana de Facultades de Odontología, noviembre 3- 5 de 2021. **Título:** Humectabilidad en dentina radicular por soluciones de Quitosán y Nano-quitosán: Modelo In vitro para endodoncia Regenerativa.

Bibliografía

1. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, Chen L, Lin Z. Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 20;22(16):8991
2. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR. Dental Pulp Cell Behavior in Biomimetic Environments. *J Dent Res.* 2015 Nov;94(11):1552-9.
3. Huang X, Li Z, Liu A, Liu X, Guo H, Wu M, Yang X, Han B, Xuan K. Microenvironment Influences Odontogenic Mesenchymal Stem Cells Mediated Dental Pulp Regeneration. *Front Physiol.* 2021 Apr 22;12:656588.
4. Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod.* 2012 Oct;38(10):1330-6.
5. Jung C, Kim S, Sun T, Cho YB, Song M. Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges. *J Tissue Eng.* 2019; 10:2041731418819263.
6. Zhang X, Li H, Sun J, Luo X, Yang H, Xie L, Yang B, Guo W, Tian W. Cell-derived micro-environment helps dental pulp stem cells promote dental pulp regeneration. *Cell Prolif.* 2017 Oct;50(5):e12361.
7. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res.* 1995;29(6):483-9.
8. Widbillier M, Schweikl H, Bruckmann A, Rosendahl A, Hochmuth E, Lindner SR, Buchalla W, Galler KM. Shotgun Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. *Sci Rep.* 2019 Mar 14;9(1):4457.
9. Kim JY, Xin X, Molioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Fu SY, Koch PD, Mao JJ. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A.* 2010 Oct;16(10):3023-31.
10. Srisuwan T, Wattanapakkavong K. Direct effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) on human apical papilla cell proliferation and mineralisation. *Aust Endod J.* 2021 Oct 1. doi: 10.1111/aej.12572. Epub ahead of print.
11. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J.* 2000 Aug;32(8):489-94.
12. Zhang M, Jiang F, Zhang X, Wang S, Jin Y, Zhang W, Jiang X. The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Human Dental Pulp Stem Cells Mediated Dentin-Pulp Complex Regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Dec;6(12):2126-2134.
13. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res.* 2000 Aug;79(8):1596-603.

14. Yuan GH, Yang GB, Wu LA, Chen Z, Chen S. Potential Role of Dentin Sialoprotein by Inducing Dental Pulp Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Mineralization for Dental Tissue Repair. *Dent Hypotheses*. 2010 Jan 1;1(2):69-75.
15. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod*. 2015 Mar;41(3):363-8.
16. Aksel H, Albanyan H, Bosaid F, Azim AA. Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. *J Endod*. 2020 Aug;46(8):1099-1104.
17. Fong D, Duceppe N, Hoemann CD. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar 11;484(3):656-661.
18. widbilller M, Schmalz G. Endodontic regeneration: hard shell, soft core. *Odontology*. 2021 Apr;109(2):303-312.
19. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod*. 2015 Aug;40(3):195-201.
20. Silva PV, Guedes DF, Nakadi FV, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*. 2013 Apr;46(4):332-8.
21. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod*. 2016 Oct;42(10):1417-26.
22. (ISO) ISO/TS 11405:2015(en) Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure. ISO/TC 106/SC 12015.
23. de Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J Food Eng* 2009; (92) 448–53
24. Kassaei M, Hosseini S, Elahi SH. A New Nano-Chitosan Irrigant with Superior Smear Layer Removal and Penetration. *Nanochem Res* 2016; 1: 150-56. doi 10.7508/NCR.2016.02.002.
25. Martinho FC, Leite FRM, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Darveau RP, Gomes BPFA. Influence of Bacterial Profiles in Cytokine and Clinical Features of Endodontic Disease. *J Endod*. 2021 Aug;47(8):1265-1271
26. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol*. 2004 Mar;110(3):252-66.
27. Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA, Kim JR, Ling J, Yang M. Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2016 Dec;42(12):1760-1766.
28. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*. 1998 Feb;152(2):533-46.
29. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:711-35.
30. Diao S, Lin X, Wang L, Dong R, Du J, Yang D, Fan Z. Analysis of gene expression profiles between apical papilla tissues, stem cells from apical papilla and cell sheet to identify the key modulators in MSCs niche. *Cell Prolif*. 2017 Jun;50(3):e12337.

31. Sadaghiani L, Gleeson HB, Youde S, Waddington RJ, Lynch CD, Sloan AJ. Growth Factor Liberation and DPSC Response Following Dentine Conditioning. *J Dent Res*. 2016 Oct;95(11):1298-307.
32. Ivica A, Zehnder M, Mateos JM, Ghayor C, Weber FE. Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid. *J Endod*. 2019 Jan;45(1):45-50.
33. Ferreira LN, Puppini-Rontani RM, Pascon FM. Effect of Intracanal Medicaments and Irrigants on the Release of Transforming Growth Factor Beta 1 and Vascular Endothelial Growth Factor from Cervical Root Dentin. *J Endod*. 2020 Nov;46(11):1616-1622
34. Tavares S, Pintor A, Mourão CFAB, Magno M, Montemezzi P, Sacco R, Alves G, Scelza MZ. Effect of Different Root Canal Irrigant Solutions on the Release of Dentin-Growth Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Materials (Basel)*. 2021 Oct 5;14(19):5829
35. Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR, Sloan AJ. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcif Tissue Int*. 2009 Jul;85(1):66-74.
36. He H, Yu J, Liu Y, et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2008;32:827
37. Khan JA, Hasan A, Dossa S, Ali B. Effect of Natural and Artificial Dentin Conditioners on the Release of Vascular Endothelial Growth Factor. *J Endod*. 2021 May;47(5):800-805
38. Usuelli M, Meyer T, Mezzenga R, Mitsi M. VEGF and VEGFR2 bind to similar pH-sensitive sites on fibronectin, exposed by heparin-mediated conformational changes. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100584.
39. Mochizuki M, Güç E, Park AJ, Julier Z, Briquez PS, Kuhn GA, Müller R, Swartz MA, Hubbell JA, Martino MM. Growth factors with enhanced syndecan binding generate tonic signalling and promote tissue healing. *Nat Biomed Eng*. 2020 Apr;4(4):463-475.
40. Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res*. 1996 Aug;75(8):1590-7. doi: 10.1177/00220345960750081101.
41. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol*. 2009 May;28(4):221-9.
42. Ritchie H. The functional significance of dentin sialoprotein-phosphoryn and dentin sialoprotein. *Int J Oral Sci*. 2018 Nov 5;10(4):31.
43. Mohammadi Z, Shalavi S, Jafarzadeh H. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics. *Eur J Dent*. 2013 Sep;7(Suppl 1):S135-S142.
44. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Kalayci S. Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. *J Endod*. 2007 May;33(5):581-4.
45. Vold IMN, Vårum KM, Guibal E, Smidsrød O. Binding of ions to chitosan—selectivity studies. *Carbohydr Polym*. 2003;54(4):471-7
46. Webster A, Halling MD, Grant DM. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. *Carbohydr Res*. 2007 Jul 2;342(9):1189-201.

47. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996;22:23– 6.
48. Aquino-Martínez R, Monroe DG, Ventura F. Calcium mimics the chemotactic effect of conditioned media and is an effective inducer of bone regeneration. *PLoS One*. 2019 Jan 4;14(1):e0210301.
49. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod*. 2008;34(12):1515-20.