



El efecto del tiempo postexodoncia y la edad en la viabilidad celular total de la pulpa dental

Antuanett N Silva Zambrano,* Esperanza R Ayón-Haro,* Rocío del Pilar González Chávez*

* Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

RESUMEN

Introducción: La pulpa dental humana es considerada una fuente celular, de la que se puede obtener fibroblastos, odontoblastos y células troncales. Actualmente, cultivos de estas células son usados en estudios de biocompatibilidad de materiales dentales, así como en medicina regenerativa e ingeniería tisular. El tiempo postexodoncia conforma un factor importante para la obtención de un elevado porcentaje de viabilidad celular. Reportes sobre la viabilidad celular de cultivos de células troncales de la pulpa dental no incluyen la población celular total de la pulpa. Por este motivo, el objetivo de este estudio fue conocer la influencia del tiempo postexodoncia, la edad y el sexo del paciente en la obtención de células viables de pulpas dentales. **Material y métodos:** Se compararon dos tiempos, antes de las 24 horas y después de las 72 horas postexodoncia. Se recolectaron un total de 42 dientes de pacientes entre 13 y 42 años de edad. Para determinar la viabilidad celular se usó la tinción de azul de tripano y se hizo el recuento celular en el microscopio. Las células vivas fueron observadas de color blanco y las muertas de color azul. **Resultados:** Las pulpas que fueron obtenidas antes de las 24 horas postexodoncia presentaron un mayor porcentaje de viabilidad celular con respecto a las pulpas obtenidas después de las 72 horas postexodoncia. **Conclusiones:** La obtención de las células de la pulpa dental debe realizarse en un tiempo \leq a 24 horas postexodoncia para óptimos resultados. Existe una relación entre la edad del paciente y la viabilidad en las pulpas obtenidas antes de las 24 horas postexodoncia. El sexo del paciente no influye en la viabilidad celular de los tiempos estudiados.

Palabras clave: Viabilidad celular, pulpa dental, azul de tripano, factores de tiempo.

INTRODUCCIÓN

En últimos años, el tejido pulpar ha ganado interés como fuente de células. En este tejido se encuentran

fibroblastos, odontoblastos y células troncales.¹⁻³ En múltiples estudios realizados en odontología se cultivan fibroblastos y células troncales derivadas de la pulpa dental (CTPD).⁴⁻¹⁰ Los cultivos celulares son utilizados para comprobar la citotoxicidad y biocompatibilidad de materiales dentales, como resinas o cementos endodónticos.⁴⁻¹⁰ El tejido pulpar es una excelente fuente de obtención de células, gracias al fácil acceso que se tiene a ellas.¹¹⁻¹³ El tejido es aislado de dientes extraídos por fines ortodónticos como terceras molares y premolares, sin causar mayor perjuicio al paciente.

Constantemente se actualizan nuevos protocolos para poder obtener una mayor cantidad de células viables al aislarlas de la pulpa. Los actuales protocolos toman en consideración la baja temperatura, la condición húmeda y el control de la contaminación bacteriana.¹⁰ El tiempo postexodoncia también es un factor muy importante; sin embargo, existen pocos estudios que contrastan este factor con la viabilidad celular.^{14,15} Se ha reportado similar viabilidad en cultivos de CTPD a diferentes tiempos, 0, 0.5, 1, 2 y 5 horas postexodoncia.¹⁴ También se han comparado cultivos realizados inmediatamente, y a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas postexodoncia.¹⁵ Obteniendo como resultado que a menor tiempo, mayor fue la cantidad de células obtenidas.¹⁵ Los estudios mencionados fueron realizados en CTPD sin tomar en consideración otras células de la pulpa. Esto nos llevó a investigar la población celular total de la pulpa. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue comparar la viabilidad celular de la pulpa dental obtenida antes de las 24 horas y después de las 72 horas postexodoncia. Asimismo, determinar la relación de la viabilidad celular con la edad y el género de los pacientes. Se plantea como hipótesis que a menor tiempo postexodoncia, mayor será la viabilidad celular. También que las pulpas de los pacientes más jóvenes presentan mayor viabilidad celular con respecto a los pacientes adultos, y que el género del paciente no influye en la viabilidad celular. Los resultados de este estudio contribuirán en la optimización de los protocolos de aislamiento celu-

Recibido: Marzo 2019. Aceptado: Julio 2019.

Citar como: Silva ZAN, Ayón-Haro ER, González CRP. El efecto del tiempo postexodoncia y la edad en la viabilidad celular total de la pulpa dental. Rev Odont Mex. 2021; 25 (1): 27-34.

© 2021 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/>)

www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam

lar, cultivos celulares, pruebas de citotoxicidad, que se ejecutan en medicina regenerativa e ingeniería tisular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Éste fue un estudio experimental, comparativo, transversal y prospectivo. Los dientes fueron extraídos por motivos ortodónticos y profilácticos en el Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres de Lima, Perú. El estudio se llevó a cabo con la aceptación y conformidad del Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. Se obtuvo el consentimiento informado previo de los pacientes para su participación en el estudio. Se recolectaron 42 dientes entre terceros molares y premolares totalmente desarrollados, provenientes de pacientes sanos (16 mujeres y 26 hombres) entre 13 y 42 años de edad. El total de muestra se dividió en dos grupos de 21 dientes cada uno. En el grupo 1 se realizó la obtención pulpar antes de las 24 horas postextracción. En el grupo 2 la obtención pulpar se efectuó después de las 72 horas postextracción, sin superar las 96 horas.

Después de las extracciones dentales, los dientes se colocaron en frascos estériles con suero fisiológico más penicilina y estreptomina (PE-EST) (Gibco, USA®) los cuales fueron cerrados herméticamente y rotulados y enfriados a 4 °C para ser transportados al Laboratorio de Investigación de Biología Oral y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. La muestra se transportó según el Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos del Ministerio de Salud.¹⁶ Los dientes correspondientes al grupo 2 se almacenaron a 4 °C hasta el tiempo correspondiente de su obtención pulpar.

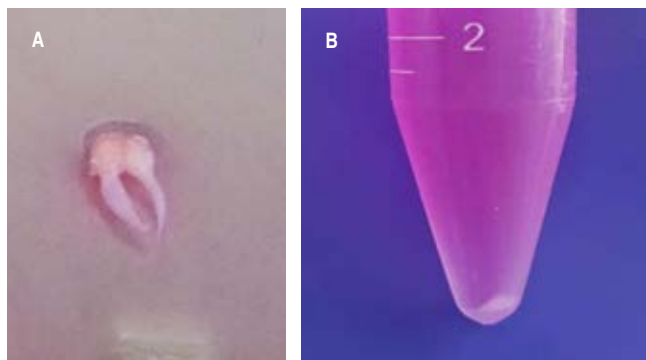


Figura 1: A) La pulpa obtenida de un diente. **B)** El botón celular en un tubo de centrifugado.

A) The pulp obtained from a tooth. **B)** Pellet formed inside a centrifuge tube.

Tabla 1: Análisis descriptivo de la muestra.

Descriptive analysis of the sample.

	Antes de las 24 horas (N = 21)	Después de las 72 horas (N = 21)	p
Edad (años)	21.95 ± 5.23	25.43 ± 7.45	0.191*
Mujeres, n (%)	7 (33.3)	9 (42.9)	0.751†
Hombres, n (%)	14 (66.7)	12 (57.1)	

N = tamaño de muestra; * Prueba U de Mann-Whitney, no diferencia estadísticamente significativa, $p > 0.05$, † Prueba χ^2 , no diferencia estadísticamente significativa, $p > 0.05$.

La obtención pulpar se realizó mediante el método de fractura del diente para exponer la pulpa.¹⁷ La técnica empleada por el investigador principal se realizó con base en un entrenamiento previo, evaluado y medido por un experto en el área. Dentro de la cabina de flujo laminar (BIOBAN™, *Angelantoni Life Science*, Italia), lo primero que se realizó fue el lavado y desinfección del diente. Para ello se sumergió el diente en Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, UK) más PE-EST durante 20 minutos. Completado el tiempo de lavado, se fracturó el diente para exponer la pulpa. El diente fracturado se colocó en una placa Petri con MEM y PE-EST y se procedió a separar el tejido pulpar cameral con la ayuda de un bisturí, pinzas, limas y curetas estériles (*Figura 1A*). El tejido aislado se trituró manualmente y se centrifugó a 1,100 rpm por 10 minutos, obteniéndose el botón celular o *pellet* (*Figura 1B*). Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en MEM y PE-EST. Para determinar la viabilidad celular se usó 10 μ L de suspensión mezclado con 10 μ L de azul de tripano (Gibco, USA). La mezcla se colocó en el hemocitómetro para realizar el recuento celular por cuadrante. Las células vivas fueron observadas de color blanco y las células muertas de color azul (*Figura 2A y 2B*).

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la siguiente fórmula:¹⁸

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

El número de células viables se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{número de células} = \frac{\text{número de células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \times \text{volumen solución}}{\text{número de cuadrantes contados}}$$

Para determinar posible diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos grupos se

Figura 2:

A) Células de la pulpa dental obtenidas a las 24 horas postexodoncia. **B)** Células de la pulpa dental obtenidas a las 72 horas postexodoncia. Observadas a 40x en el microscopio.

A) Dental pulp cells obtained 24 hours post-extraction. **B)** Dental pulp cells obtained 72 hours post-extraction. Observed at 40x under the microscope.

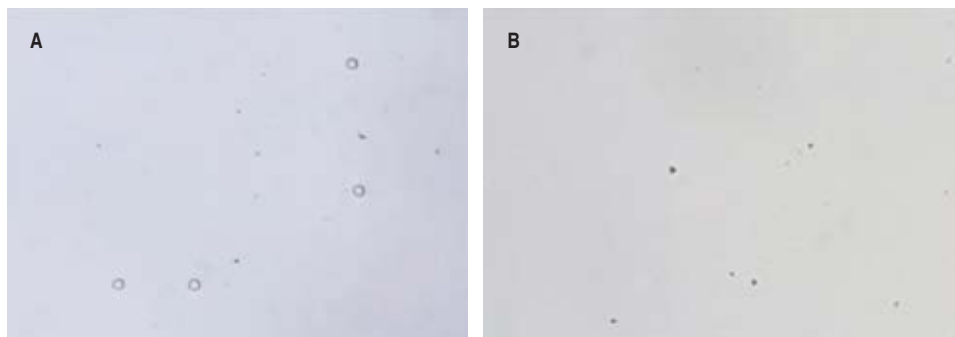


Tabla 2: Número de células y viabilidad celular las pulpas dentales obtenidas antes de las 24 horas post-exodoncia según la edad del paciente. *Number of cells and cell viability of dental pulps obtained before of 24 hours post-extraction regarding patient's age.*

Parámetro de comparación	13 a 27 años (N = 18)		28 a 42 años (N = 3)		p
	Media	DE	Media	DE	
Número de células	4,502E + 06	2,645E + 06	1,467E + 06	8,406E + 05	0.031*
Viabilidad celular	67.18	7.37	56.39	7.24	0.024*

N = tamaño de muestra; E+n = formato científico donde E (exponente) multiplica el número anterior por 10 a la potencia n; * Prueba U de Mann-Whitney, diferencia estadísticamente significativa, p < 0.05.

utilizó el programa SPSS versión 21 (IBM®). El intervalo de confianza fue 95% (p = 0.05) Inicialmente se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para poder elegir la prueba estadística adecuada. En los datos que no tuvieron una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y en los datos que tuvieron distribución normal se usó la prueba paramétrica de t de Student para muestras independientes.

RESULTADOS

Para los dos grupos estudiados se utilizó terceros molares y premolares correspondientes a pacientes cuyo rango de edad estuvo entre 13 y 42 años. Las características de edad y sexo entre ambos grupos fueron similares, no existiendo diferencias significativas (p = 0.191 y p = 0.751, respectivamente) (Tabla 1).

En el grupo de pulpas dentales obtenidas antes de las 24 horas postextracción la cantidad de y la viabilidad celular fueron mayores respecto al grupo de pulpas obtenidas después las 72 horas postextracción. Ambas variables presentaron diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) (Figuras 3 y 4).

En el grupo 1 se puede observar que existe relación entre el número de células y la viabilidad celular

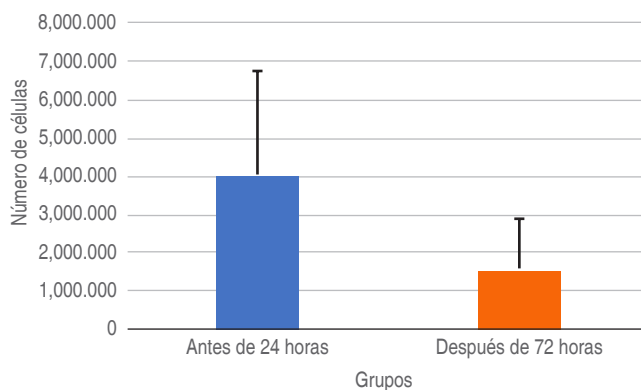


Figura 3: Comparación entre los promedios de número de células obtenidas antes de las 24 horas postexodoncia y a las 72 horas postexodoncia.

Comparison between the average number of cells obtained 24 hours post-extraction and 72 hours post-extraction.

con la edad del paciente. Tanto el número de células como la viabilidad celular son mayores en el grupo de 13 a 27 años en comparación al grupo de 28 a 42 años. La diferencia fue estadísticamente significativa (p = 0.031 y p = 0.024, respectivamente) (Tabla 2).

En el grupo 2 se puede apreciar que no existe relación entre el número de células y la viabilidad celular

con la edad del paciente. No se halló una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.586$ y $p = 0.848$, respectivamente) (Tabla 3).

En el grupo 1 no se encontró relación estadísticamente significativa entre el número de células y la viabilidad celular con respecto al género del paciente ($p = 0.232$ y $p = 0.526$, respectivamente). Del mismo modo, en el grupo 2 no hubo relación entre el número de células y la viabilidad celular con el sexo del paciente ($p = 0.915$ y $p = 0.282$, respectivamente).

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar el efecto del tiempo postextracción en relación con la viabilidad de las células de la pulpa dental. En la actualidad existen escasas investigaciones que hayan abordado esta relación.¹¹⁻¹⁴ Parece ser que 24 horas es el tiempo postextracción adecuado para realizar cultivos. Sin embargo, no se ha establecido si se pueden realizar cultivos celulares exitosos de pulpa dental a las 72 horas postexodoncia. Esto nos llevó a realizar este estudio comparando la viabilidad celular antes de las 24 horas y después de las 72 horas postexodoncia.

Woods et al.¹¹ obtuvieron un número de células viables de $0.5-2.0 \times 10^6$ de CTPD (una recuperación celular mayor al 93%) después de seis meses de congelamiento, verificado con el método de tinción de azul de tripano. En cambio, nosotros obtuvimos un mayor número celular en el grupo de la pulpa dental obtenida antes de 24 horas postextracción (un promedio de 4.1×10^6). La diferencia entre ambos resultados se debe a que nosotros evaluamos toda la población celular, no un grupo específico de células como son CTPD. Asimismo no sometimos a las células a un periodo de congelamiento, que puede ser causante de la disminución del número celular.

En el presente estudio, el grupo 1 obtuvo una viabilidad celular de 65.64% y el grupo 2 de 35.43%. Benício et al.¹⁴ establecieron cultivos celulares de piezas a las 0, 0.5, 1, 2 y 5 horas postexodoncia. Aunque no precisan la viabilidad exacta obtenida en cada tiempo, indican que obtuvieron la misma capacidad proliferativa y similar morfología celular en los diferentes tiempos de procesamiento postextracción. En contraste a nuestro estudio, obtuvimos una diferencia significativa al comparar la viabilidad celular de ambos grupos, 24 y 72 horas. La discrepancia en ambos estudios se puede atribuir al tiempo mayor empleado por nosotros. El tiempo de 72 horas postexodoncia de obtención de la pulpa dental posiblemente sea un factor importante para que exista diferencia en la viabilidad celular.

Perry et al.¹⁵ compararon la viabilidad celular de terceros molares almacenados en 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas antes del procesamiento para obtener

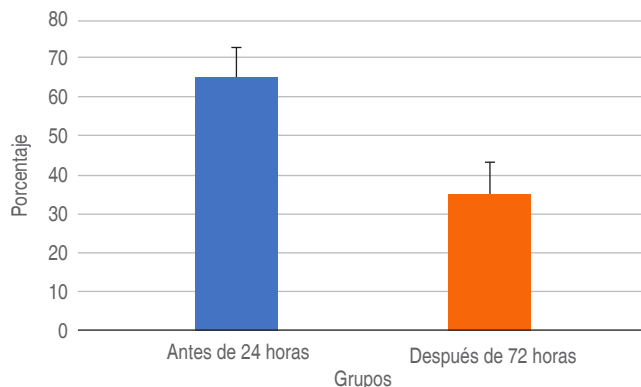


Figura 4: Comparación entre los promedios de porcentaje de viabilidad celular obtenida en ambos grupos.

Comparison between the average percentage of cell viability obtained in both groups.

Tabla 3: Número de células y viabilidad celular de las pulpas dentales obtenidas después de las 72 horas post-exodoncia según la edad del paciente.
Number of cells and cell viability of dental pulps obtained after 24 hours post-extraction regarding patient's age.

Parámetro de comparación	13 a 27 años (N = 15)		28 a 42 años (N = 6)		p
	Media	DE	Media	DE	
Número de células	1.438E + 06	1.072E + 06	1.880E + 06	1.812E + 06	0.586*
Viabilidad celular	35.21	8.32	35.98	7.88	0.848†

N = tamaño de muestra; E+n = formato científico donde E (exponente) multiplica el número anterior por 10 a la potencia n; DE = desviación estándar; * Prueba U de Mann-Whitney, no diferencia estadísticamente significativa, $p > 0.05$; † Prueba t para muestras independientes, no diferencia estadísticamente significativa, $p > 0.05$.

CTPD. Los dientes que fueron almacenados en PBS y HTS a las 24 horas (1.5×10^6 y 2.2×10^6 , respectivamente) obtuvieron mayor cantidad de CTPD que a las 72 horas (0.6×10^6 y 0.7×10^6 , respectivamente). Estos hallazgos fueron similares al nuestro al comparar las células obtenidas a las 24 y 72 horas. Sin embargo, nosotros conseguimos mayor número de células a las 24 horas (4.1×10^6) y 72 horas (1.6×10^6) en comparación a lo obtenido por Perry et al.¹⁵ Como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a que nosotros trabajamos con la población celular total.

Este estudio también evaluó la relación entre la viabilidad celular con la edad y el sexo de los pacientes. Suchánek et al.¹⁹ mencionan que usaron para su estudio los dientes de 19 mujeres y tres hombres, en un rango de edad de ocho a 23 años. Viña-Almunia et al.²⁰ usaron las pulpas dentales de 85 mujeres y 35 hombres, en un rango de edad de 14 a 67 años. En ambos estudios lograron aislar cultivos de CTPD satisfactoriamente. Sin embargo, no estudiaron la viabilidad de los cultivos con respecto a la edad y sexo de los pacientes, tampoco mencionan cuál fue el tiempo postexodoncia.

Obtuvimos pulpas de 16 mujeres y 26 hombres; según los resultados, se pudo inferir que el sexo del paciente no influye en la obtención de una mayor viabilidad celular. Los pacientes se dividieron en dos grupos etarios, de 13 a 27 años y de 28 a 42 años. La limitación en este estudio fue que se obtuvieron muy pocas muestras del grupo etario mayor (tres muestras) a diferencia del grupo etario menor. Esto se debió a que la mayor población que acudió a la clínica para la exodoncia de terceras molares fueron pacientes jóvenes.

Es importante evaluar la viabilidad celular en los ensayos de cultivos celulares de la pulpa dental porque cumple la función de control de calidad de los cultivos. Sugerimos utilizar la pulpa dental antes de las 24 horas postexodoncia para obtener un óptimo número celular y viabilidad celular. Sin embargo, se necesitan más investigaciones que puedan corroborar lo manifestado. Se recomienda realizar cultivos de células obtenidas en otros puntos de tiempo (48 horas y más de 72 horas postexodoncia) para evaluar la capacidad de proliferación celular. Asimismo considerar mayor número de muestra en grupos etarios adultos.

Este estudio abre camino a más investigaciones donde se puedan indagar más factores que modifiquen la viabilidad celular. Siendo éstas las que contribuirían a optimizar los protocolos de aislamiento celular, cultivos celulares, pruebas de citotoxicidad,

que se ejecutan en medicina regenerativa e ingeniería tisular.^{4-7,11-14}

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que las pulpas dentales que fueron obtenidas antes de las 24 horas postextracción presentan mayor porcentaje de viabilidad y población celulares con respecto a las pulpas dentales que fueron obtenidas después de las 72 horas postexodoncia. Existe relación inversa entre la edad de los pacientes con la viabilidad celular y el número de células en el grupo de pulpas dentales obtenidas antes las 24 horas postextracción. Tanto la viabilidad celular como el número de células son mayores en pacientes de 13 a 27 años. Asimismo, no existe relación entre el sexo de los pacientes y la viabilidad celular y el número de células, en ambos grupos de tiempo.

Se recomienda usar piezas dentales antes de cumplir las 24 horas postextracción, para la obtención de la pulpa con una mayor viabilidad celular y un mayor número de células.

Original research

The effect of post-exodontia time and age on the total cellular viability of the dental pulp

Antuanett N Silva Zambrano,* Esperanza R Ayón-Haro,* Rocío del Pilar González Chávez*

* Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

ABSTRACT

Introduction: The human dental pulp is considered a cellular source, where fibroblasts, odontoblasts, and stem cells can obtain. Currently, cultures of these cells are used in biocompatibility studies of dental materials, regenerative medicine, and tissue engineering. Post-extraction time is essential in obtaining a high percentage of cell viability. Reports on cell viability of dental pulp stem cell cultures do not include the total pulp cell population. For this reason, this study aimed to assess the influence of post-exodontia time and patients' age and gender in obtaining viable dental pulp cells.

Material and methods: Two periods of time were compared, before 24 hours and after 72 hours post-exodontia. 42 teeth of patients from 13 to 42 years were collected. The cell viability was determined using trypan blue staining, and the cell count was done under the microscope. The living cells were observed white and the dead one blue. **Results:** The pulps obtained before 24 hours post-exodontia had a higher percentage of viable cells than those obtained after 72 hours. **Conclusions:** the extraction of the dental pulp cells should be done in \leq to 24 hours post-exodontia for optimal results. There

is a relationship between the age of the patient and the viability in the pulps before 24 hours post-exodontia. Gender's patients do not influence cell viability.

Keywords: Cell viability, dental pulp, trypan blue, time factors.

INTRODUCTION

In recent years, pulp tissue has gained interest as a source of cells. Fibroblasts, odontoblasts, and stem cells are found in this tissue.¹⁻³ Fibroblasts and dental pulp-derived stem cells (DPSCs) are cultured in multiple studies in dentistry.⁴⁻¹⁰ Cell cultures testing the cytotoxicity and biocompatibility of dental materials, such as resins or endodontic types of cement.⁴⁻¹⁰ Pulp tissue is an excellent source for obtaining cells because of its easy access.¹¹⁻¹³ The tissue is isolated from teeth extracted for orthodontic purposes, such as third molars and premolars, without causing significant harm to the patient.

New protocols are constantly updated to obtain more viable cells when isolated from the pulp. Current protocols consider low temperature, moist condition, and control of bacterial contamination.¹⁰ Post-exodontic time is also a crucial factor; however, few studies contrast this factor with cell viability.^{14,15} Similar viability was reported in DPSCs cultures at different times, 0, 0.5, 1, 2, and 5 hours post-exodontia.¹⁴ Cultures performed immediately, and at 24, 48, 72, 96, and 120 hours post-exodontia have also been compared.¹⁵ As a result, the shorter the time, the greater the number of cells obtained.¹⁵ The studies mentioned above were carried out in TCDC without considering other pulp cells. The anterior fact led us to investigate the total cell population of the pulp. Therefore, this study aimed to compare the cell viability of dental pulp obtained before 24 hours and after 72 hours post-exodontia.

Additionally, to determine the relationship of cell viability with the age and gender of the patients. It is hypothesized that a shorter post-extraction time will favor cell viability. Also, the dental pulps coming from younger patients present higher cell viability than adults, and, finally, that the gender of the patient does not influence cell viability. The results of this study will contribute to the optimization of cell isolation protocols, cell cultures, cytotoxicity tests used in regenerative medicine and tissue engineering.

MATERIAL AND METHODS

The present study was experimental, comparative, cross-sectional, and perspective. The teeth used were extracted for orthodontic and prophylactic reasons at the Dental Center of the University of San Martin de Porres.

The study was approved and in the agreement of the Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of the University of San Martin de Porres. Prior informed consent was obtained from the patients to participate in the study. Forty-two teeth, fully developed third molars and premolars, were collected from healthy patients (16 females and 26 males) between 13 and 42 years of age. The total sample was divided into two groups of 21 teeth each. In group 1, pulp extraction was performed 24 hours post-extraction. In group 2, pulp extraction was performed after 72 hours post-extraction, without exceeding 96 hours.

After the dental extractions, the teeth were placed in sterile bottles with physiological saline plus penicillin and streptomycin (PE-EST) (Gibco, USA[®]) and hermetically sealed, labeled, and cooled to 4 °C transported to the Oral and Molecular Biology Research Laboratory of the Faculty of Dentistry of the University of San Martin de Porres, according to the Biosafety Manual for Testing, Biomedical, and Clinical Laboratories of the Ministry of Health.¹⁶ Then, the group 2 teeth were stored at 4 °C until the corresponding time for pulp extraction.

The pulp exposes, and extraction was performed by fracturing the tooth.¹⁷ The technique employed by the principal investigator was performed based on previous training, evaluated, and measured by an expert in the field. Inside the laminar flow cabinet (BIOBAN, Angelantoni Life Science, Italy), the first thing that was performed was the washing and disinfection of the tooth. For this, the tooth was immersed in Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, UK) plus PE-EST for 20 minutes. After the rinsing time was completed, the tooth was fractured to expose the pulp. The fractured tooth was placed in a Petri dish with MEM and PE-EST, and the chambered pulp tissue was separated with the aid of a scalpel, forceps, files, and sterile curettes (*Figure 1A*). The isolated tissue was manually crushed and centrifuged at 1100 rpm for 10 minutes, obtaining the cell button or pellet (*Figure 1B*). The supernatant was then removed and resuspended in MEM and PE-EST. The cell viability was determined using 10 µL of suspension mixed with 10 µL of trypan blue (Gibco, USA). The mixture was placed in the hemocytometer for cell counting per quadrant. Live cells were observed as white and dead cells as blue (*Figure 2A and 2B*).

The percentage of viability was found by the following formula:¹⁸

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{number viable cells} \times 100}{\text{Total number of cells}}$$

The number of viable cells was found by the following formula:

$$\text{Number of cells} = \frac{\text{number viable cells} \times \text{dilution factor} \times 10^4 \times \text{volumen of solution}}{\text{Number of quadrants}}$$

The software SPSS version 21 (IBM®) was used to determine possible statistically significant differences between the mean of the two groups. The confidence interval was 95% ($p = 0.05$). Initially, the Shapiro-Wilk normality test was used to choose the appropriate statistical test. The nonparametric Mann-Whitney U test was used for data that did not have a normal distribution, and the parametric Student's t-test for independent samples was used for data that had a normal distribution.

RESULTS

The two groups studied used third molars and premolars corresponding to patients whose age range was between 13 and 42 years. Both groups' age and sex characteristics were similar, with no significant differences ($p = 0.191$ and $p = 0.751$, respectively) (Table 1).

In the group of dental pulps obtained before 24 hours post-extraction, the quantity and cell viability were higher than in the group of pulps obtained after 72 hours post-extraction. Both variables presented statistically significant differences ($p < 0.05$) (Figures 3 and 4).

In group 1, there is a relationship between the number of cells and cell viability with the patient's age. Both cell number and cell viability are higher in the group aged 13 to 27 years than those aged 28 to 42 years. The difference was statistically significant ($p = 0.031$ and $p = 0.024$, respectively) (Table 2).

In group 2, there is no relationship between the number of cells and cell viability with the patient's age. In addition, no statistically significant difference was found ($p = 0.586$ and $p = 0.848$ respectively) (Table 3).

In group 1, no relationship was found between the number of cells and cell viability with the gender of the patient. No statistically significant difference was found ($p = 0.232$ and $p = 0.526$, respectively). Similarly, in group 2, there was no relationship between the number of cells and cell viability with the sex of the patient. Again, there is no statistically significant difference ($p = 0.915$ and $p = 0.282$, respectively).

DISCUSSION

One of the objectives of the present study was to determine the effect of post-extraction time on the viability of dental pulp cells. At present, little research

has addressed this relationship.¹¹⁻¹⁴ It appears that 24 hours is the appropriate post-extraction time for culturing. However, it has not been established whether successful cell culture of the dental pulp can be performed at 72 hours post-extraction. The afore data led us to perform this study comparing cell viability before 24 hours and after 72 hours post-exodontia.

Woods et al¹¹ obtained several viable cells of $0.5-2.0 \times 10^6$ of TCDC (a cellular recovery higher than 93%) after six months of freezing, verified with the trypanum blue staining method. On the other hand, we obtained a higher cell number in the group of dental pulp obtained before 24 hours post-extraction (an average of 4.1×10^6). The difference between the two results is because we evaluate the entire cell population, not a specific group of cells such as TCDC. We also did not subject the cells to a period of freezing, which can cause a decrease in cell numbers.

In the present study, group 1 obtained a cell viability of 65.64% and group 2 35.43%. Benício et al.¹⁴ established cell cultures of teeth at 0, 0.5, 1, 1, 2, and 5 hours post-exodontia. Although they did not specify the exact viability obtained at each time, they indicated that they obtained the same proliferative capacity and similar cell morphology at the different post-extraction processing times. In contrast to our study, we obtained a significant difference when comparing the cell viability of both groups, 24 and 72 hours. The discrepancy in both studies can be attributed to the longer time. The 72-hour post-exodontic time to obtain dental pulp may be an important factor in cell viability difference.

Perry et al.¹⁵ compared the cell viability of third molars stored at 0, 24, 48, 72, 96, and 120 hours before processing to obtain TCDC. Teeth that were stored in PBS and HTS at 24 hours (1.5×10^6 and 2.2×10^6 respectively) obtained higher amounts of TCDC than at 72 hours (0.6×10^6 and 0.7×10^6 respectively). These findings were similar to ours when comparing cells obtained at 24 and 72 hours. However, we obtained higher numbers of cells at 24 hours (4.1×10^6) and 72 hours (1.6×10^6) compared to that obtained by Perry et al.¹⁵ As mentioned above, this may be because we worked with the total cell population.

This study also evaluated the relationship between cell viability with the age and gender of the patients. Suchánek et al.¹⁹ mention that they used for their study the teeth of 19 women and three men, in an age range of 8 to 23 years. Viña-Almunia et al.²⁰ used the dental pulps of 85 women and 35 men, ranging from 14 to 67 years. In both studies, they were able to isolate TCDC cultures satisfactorily. However, they did not study the viability of the cultures concerning the age and sex of the patients, nor did they mention the post-exodontic time.

We obtained pulps from 16 women and 26 men. According to the results, it could be inferred that the sex of the patient does not influence obtaining higher cell viability. The patients were divided into two age groups, from 13 to 27 years old and 28 to 42 years old. The limitation in this study was that very few samples were obtained from the older age group (3 samples) instead of the younger age group, because the most common population attending the clinic for third molar exodontia were young patients.

It is vital to assess cell viability in dental pulp cell culture assays because it serves the function of culture quality control. Therefore, we suggest using dental pulp 24 hours post-exodontia to obtain optimal cell number and cell viability. However, further research is needed to corroborate the above. Therefore, it is recommended to culture cells obtained at other time points (48 hours and more than 72 hours post-exodontia) to evaluate cell proliferation capacity. It is also recommended to consider more samples in adult age groups.

This study opens the way for further research to investigate more factors that modify cell viability. These would contribute to optimizing the protocols of cell isolation, cell culture, and cytotoxicity tests performed in regenerative medicine and tissue engineering.^{4-7,11-14}

CONCLUSIONS

According to the results obtained in this study, it was concluded that the dental pulps that were obtained before 24 hours post-exodontia present a higher percentage of cell viability and cell population concerning the dental pulps that were obtained after 72 hours post-exodontia. Furthermore, there is an inverse relationship between the age of the patients with the cell viability and the number of cells in the group of dental pulps obtained before 24 hours post-exodontia. Cell viability and cell number are higher in patients aged 13 to 27 years, and there is no relationship between the sex of the patients and cell viability and cell number in both time groups.

It is recommended to use dental pieces before 24 hours post-extraction to obtain pulp with higher cell viability and a higher number of cells.

REFERENCIAS/REFERENCES

1. Trujillo E, Morales R, Roa I. Pulpa dentaria sana vs pulpitis reversible: caracterización estereológica de fibroblastos. *Int J Morphol.* 2016; 34 (3): 945-949.
2. Morales R, Trujillo E, Cantín M. Caracterización estereológica de odontoblastos en pulpas dentarias humanas sanas y con pulpitis reversible. *Int J Morphol.* 2014; 32 (1): 154-160.
3. Brizuela C, Galleguillos S, Carrión F, Cabrera C, Luz P, Inostroza C. Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *Int J Morphol.* 2013; 31 (2): 739-746.
4. Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V et al. Interaction of dental pulp stem cells with Biodentine and MTA after exposure to different environments. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24 (5): 481-486.
5. Widbillier M, Lindner SR, Buchalla W et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig.* 2016; 20 (2): 237-246.
6. Mandrol PS, Bhat K, Prabhakar AR. An *in vitro* evaluation of cytotoxicity of curcumin against human dental pulp fibroblasts. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2016; 34 (3): 269-272.
7. Noorani TY, Luddin N, Rahman IA, Masudi SM. *In vitro* cytotoxicity evaluation of novel nano-hydroxyapatite-silica incorporated glass ionomer cement. *J ClinDiagn Res.* 2017; 11 (4): ZC105-ZC109.
8. Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Rev Rep.* 2016; 12 (5): 511-523.
9. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7 (5): 839-851.
10. Romero S, Córdoba K, Martínez Valbuena CA, Gutiérrez Quintero JG, Durán Riveros JY, Munévar Niño JC. Marcadores cándidos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología. *RevOdont Mex.* 2014; 18 (2): 156-163.
11. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology.* 2009; 59 (2): 150-157.
12. Martín-Piedra M, Garzon Bello IJ, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos Mingorance M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. *Actualidad Médica.* 2012; 97 (786): 6-12.
13. Carrillo-Mendigaño N, García-Robayo DA, Otero-Mendoza LM. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *CES Odontología.* 2015; 28 (2): 20-34.
14. Daniela Ferreira Araújo B, Luciana Oliveira P, Izabel Cristina Rodrigues da S, Ricardo Bentes A, Ana Cristina Barreto B. Culture of human dental pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Braz Oral Res.* 2018; 32: e003.
15. Perry BC, Zhou D, Wu X 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.
16. *Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos.* 3° Ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud [en línea]. 2005 [Acceso febrero 2018]; 108 páginas. Disponible en: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/18.pdf
17. Syed-Picard FN, Ray HL Jr, Kumta PN, Sfeir C. Scaffoldless tissue-engineered dental pulp cell constructs for endodontic therapy. *J Dent Res.* 2014; 93 (3): 250-255.
18. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 7-12.
19. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *ActaMedica (Hradec Kralove).* 2007; 50 (3): 195-201.
20. Viña-Almunia J, Borrás C, Gambini J, El Alamy M, Peñarrocha M, Viña J. Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016; 21 (3): e374-379.

Correspondencia/Correspondence:
Esperanza R Ayón-Haro
E-mail: eayonh@usmp.pe