

Universidad CEU Cardenal Herrera
Departamento de Odontología



EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE
MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN
PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Tábata Álvarez Muro

Dirigida por:

Dra. Marta Ribelles Llop

Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano

Valencia, 2017



DRA. MARTA RIBELLES LLOP, DR.FRANCISCO JAVIER RODRÍGUEZ LOZANO

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “Evaluación in vitro de la biocompatibilidad de materiales en base de biosilicato para su uso en pulpotomías en dentición temporal”, de la que es autora Dña. Tábata Álvarez Muro, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Moncada a 27 de Marzo de 2017.

Fdo.: Marta Ribelles Llop.

Fdo.: Francisco Javier Rodríguez Lozano.

A Sebastián, mi marido, mi amigo y compañero.

A Adrián, mi hijo, el que alegra mis días.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Marta Ribelles Llop y el Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano su paciencia, sus correcciones y sus ánimos.

A todos los docentes que durante el transcurso de mi carrera me han enseñado y han hecho de mi la profesional que soy.

Quiero agradecer a todos los investigadores y técnicos del Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) de la Universidad de Murcia, que me acogieron, ayudaron y guiaron en el laboratorio siempre que lo necesité de forma desinteresada. Sois una gran familia. Una mención especial a Maria del Mar Collado González, pilar fundamental de este trabajo. GRACIAS.

Este trabajo, que se engloba en la línea de investigación “Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular” del grupo de Investigación multidisciplinar [GI/IMIB/C061/2011] del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, ha sido realizado con la ayuda de la Red Española de Terapia Celular (RD12/0019/0001) del Instituto de Salud Carlos III.

Índice

1-INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 IMPORTANCIA DEL MANTENIMIENTO DE LA DENTICIÓN EN LA ARCADA DENTARIA.	19
1.2 CONDICIONANTES ANATÓMICOS DE LA DENTICIÓN TEMPORAL Y SU REPERCUSIÓN EN EL TRATAMIENTO PULPAR.....	19
1.3 DIAGNÓSTICO PULPAR EN DENTICIÓN TEMPORAL.	25
1.3.1 Examen clínico extraoral e intraoral.	26
1.3.1.1 Examen extraoral.	26
1.3.1.2 Examen intraoral.	26
1.3.2 Examen radiográfico.	27
1.3.3 Historia del dolor.	27
1.3.4 Test vitalidad.	28
1.3.5 Prueba de percusión.	31
1.3.6 Diagnóstico histopatológico.	31
1. 4 TERAPIA PULPAR VITAL EN DENTICIÓN TEMPORAL.	31
1.4.1 Técnica de pulpotomía para dientes temporales.....	33
1.4.2 Materiales utilizados en pulpotomías de dientes temporales.....	34
1.4.2.1 Desvitalización.	34
1.4.2.1.1 Pulpotomía con formocresol.	34
1.4.2.1.2 Electrocirugía.	36
1.4.2.1.3 Láser.....	38
1.4.2.2 Preservación.....	39
1.4.2.2.1 Óxido de zinc eugenol.....	39
1.4.2.2.2 Glutaraldehído.	40
1.4.2.2.3 Hipoclorito de sodio (NaOCl).	41
1.4.2.2.4 Sulfato férrico.	43
1.4.2.3 Reparativos.....	44
1.4.2.3.1 Hidróxido de calcio.	45
1.4.2.3.2 Agregado de trióxido mineral.	47
1.4.2.3.3 Biodentine™.....	50
1.4.2.3.4 Theracal LC.	51
1.5 REGENERACIÓN DE LA PULPA DENTAL.	52

1.5.1 Células madre.	53
1.5.1.1 Clasificación según su potencial de diferenciación.....	53
1.5.1.2 Clasificación según su origen.	54
1.5.2 Células madre mesenquimales.....	54
1.5.3 Células madre dentales.	56
1.5.3.1 Células madre procedente de la pulpa dental (DPSCs).	57
1.5.3.2 Células madre procedentes de dientes deciduos (SHED).....	60
1.5.3.3 Células madre procedentes de la papila apical (SCAP).....	62
1.5.3.4 Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs).	63
2-JUSTIFICACIÓN.....	65
3-OBJETIVOS.....	69
3.1 OBJETIVO GENERAL.	71
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	71
3.2.1 Evaluar la viabilidad celular de SHED en presencia de extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.	71
3.2.2 Establecer los niveles de apoptosis celular en presencia de los extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.....	71
3.2.3 Describir la capacidad de migración en presencia de los extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.	71
3.2.4 Evaluar la morfología celular sobre los discos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.....	71
3.2.5 Evaluar la capacidad de mineralización y/o formación de depósitos cálcicos de las SHED en presencia de discos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.	71
4-MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
4.1 TIPO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	75
4.1.1 Selección y tamaño de la muestra.	75
4.1.1.1 Criterios de inclusión/exclusión.	75
4.2 MATERIALES.....	75
4.3 METODOLOGÍA.....	77

4.3.1 Obtención de las células madre de los dientes temporales.	77
4.3.1.1 Aislamiento celular.	77
4.3.1.2 Extracción de la pulpa dental humana (hDP).	77
4.3.1.2.1 Disgregación enzimática.	77
4.3.1.2.2 Disgregación mecánica.	78
4.3.1.3 Recuento y estimación de la viabilidad celular.	78
4.3.1.4 Cultivo de células de pulpa dental de dientes deciduos (SHED).	80
4.3.2 Ensayo experimental.	82
4.3.2.1 Caracterización o identificación celular.	82
4.3.2.2 Preparación de los extractos.	82
4.3.2.3 Ensayo de viabilidad celular MTT.	83
4.3.2.4 Ensayo de apoptosis celular.	85
4.3.2.5 Ensayo de migración celular.	87
4.3.2.6 Estudio microscópico de la morfología celular.	87
4.3.2.7 Análisis del depósito de calcio en la matriz.	88
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	89
5-RESULTADOS.	91
5.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE DIENTES TEMPORALES EXFOLIADOS (SHED).	93
5.1.1 Aislamiento y caracterización de las SHED.	93
5.2 ENSAYO EXPERIMENTAL.	93
5.2.1 Ensayo de proliferación celular MTT.	93
5.2.2 Análisis del fenotipo mesenquimal y apoptosis/necrosis.	95
5.2.2.1 Análisis del fenotipo.	95
5.2.2.2 Análisis apoptosis/necrosis.	97
5.2.3 Ensayo de migración celular.	98
5.2.4 Fijación de las SHED sobre los discos de materiales de pulpotomía.	99
5.2.5 Análisis del depósito de calcio en la matriz mediante tinción de Alizarin red.	100
6-DISCUSSION.	103
6.1 SOBRE LA METODOLOGÍA.	105
6.1.1 Sobre el aislamiento celular.	106

6.1.2 Sobre los materiales.....	107
6.1.3 Sobre el ensayo para viabilidad celular.....	108
6.1.4 Sobre la identificación celular.....	109
6.1.5 Sobre el ensayo de apoptosis celular.....	110
6.1.6 Sobre el ensayo de migración celular.....	110
6.1.7 Sobre el estudio de la morfología celular.....	111
6.1.8 Sobre el análisis del depósito de calcio en la matriz.....	111
6.2 SOBRE LOS RESULTADOS.....	112
6.2.1 Relacionado con la caracterización y aislamiento celular.....	113
6.2.2 Relacionado con la viabilidad celular y la citotoxicidad.....	114
6.2.3 Relacionado con la migración celular.....	118
6.2.4 Relacionado con la morfología celular.....	119
6.2.5 Relacionado con el depósito de calcio en la matriz.....	120
7-CONCLUSIONES.....	123
8-BIBLIOGRAFÍA.....	127
9-ANEXOS.....	153
ANEXO 1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	155
ANEXO 2.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	156
ANEXO 3.- ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	158
ANEXO 4.- ÍNDICE DE TABLAS.....	159

1-Introducción.

1.1 Importancia del mantenimiento de la dentición en la arcada dentaria.

La conservación de la integridad de la dentición primaria en sus funciones óptimas hasta su periodo de exfoliación normal constituye uno de los objetivos fundamentales de la odontología pediátrica¹. La caries dental en la infancia es todavía una afectación muy común, que causa una severa y rápida destrucción del diente temporal. A pesar de los grandes avances en la prevención de la caries dental, la pérdida prematura de dientes temporales sigue siendo frecuente, pudiendo tener este hecho un efecto perjudicial sobre el posterior desarrollo de la dentición definitiva y del aparato masticatorio en su totalidad^{1,2}. Durante muchos años la extracción constituyó el tratamiento de elección para dientes temporales con lesiones de caries con gran destrucción.

Según *Kopel y cols.*³, la pérdida prematura de los dientes primarios por lesiones de caries dental, trae consigo las siguientes secuelas:

- Pérdida de la longitud del arco.
- Espacio insuficiente para la erupción de los dientes permanentes.
- Erupción ectópica e impactación de premolares.
- Inclinação mesial de dientes adyacentes a la pérdida molar primaria.
- Extrusión de dientes permanentes antagonistas.
- Desviación de la línea media con la posibilidad de desarrollo de mordidas cruzadas.
- Desarrollo de algunas posiciones anormales de la lengua.

Hay autores como Camp que señalaron la importancia de que la dentición temporal se mantenga dentro de la arcada dentaria, siempre que sea restaurada en función y permanezca libre de enfermedad⁴.

1.2 Condicionantes anatómicos de la dentición temporal y su repercusión en el tratamiento pulpar.

El tratamiento pulpar exitoso en la dentición temporal exige el conocimiento de varios aspectos, tales como la morfología de la pulpa dental temporal, el proceso de formación de la

raíz y los problemas locales específicos debidos a la reabsorción de las raíces de los dientes temporales^{5,6}.

Entre las principales características anatómicas de los dientes temporales destacamos⁷:

1. Las cámaras pulpares presentan una reducción de su espacio debido al depósito de dentina secundaria en el techo cameral, influido por el estímulo funcional de la oclusión.
2. El techo de la cámara presenta menor calcificación que los dientes permanentes, ya que su ciclo vital es menor.
3. En las cámaras pulpares los diámetros mesiodistales y bucolinguales son mayores que el tamaño cérvico oclusal, no solo por la morfología externa de sus coronas, sino por la falta de estímulos laterales.
4. Los dientes unirradiculares presentan forma cónica y no demandan desgastes compensatorios del abordaje coronario y de la cámara pulpar.
5. Las divergencias y curvaturas de los dientes multirradiculares son uniformes y poco variables.
6. La relación de las cámaras, amplias en sus planos horizontales, con las resultantes regulares de la dirección de los conductos, facilitan el abordaje y exploración de las cavidades pulpares, como podemos observar en la **Figura 1**.

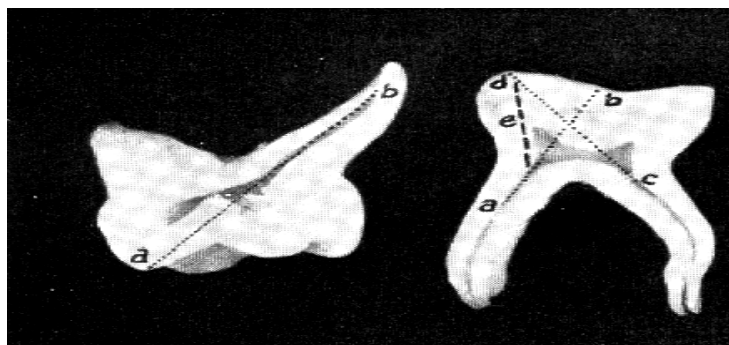


Figura 1. Presenta el corte mesial de un segundo molar superior temporal con la resultante a-b, de un conducto muy divergente; y el corte mesiodistal de un primer molar inferior temporario con las resultantes a-b y c-d, de los conductos mesial y distal, respectivamente. La línea e-d, muestra el ligero desgaste compensatorio⁷.

Los conductos radiculares de los dientes temporales difieren morfológica e histológicamente en gran medida respecto a sus sucesores permanentes y su tratamiento se complica debido a la reabsorción apical que permitirá la erupción del diente sucesor⁶. Contrastando con la topografía regular y constante de la cavidad pulpar, los dientes temporales presentan variaciones de la reabsorción progresiva de sus raíces⁷. La reabsorción radicular se produce principalmente por la estimulación bajo fuerzas de presión por la erupción del germen del diente permanente, ayudado por las fuerzas de la masticación, que son capaces de iniciar la reabsorción fisiológica. Pero también puede ser provocada por pulpitis, necrosis, alteraciones inflamatorias pulpares o periodontales y trauma oclusal o anquilosis, produciéndose en estos casos una reabsorción radicular patológica⁸.

En las raíces recién formadas de los dientes temporales, los orificios apicales se localizan cerca de sus ápices anatómicos. A medida que la reabsorción progresa, el orificio apical puede no corresponderse con el ápice anatómico de la raíz, sino localizarse coronalmente con respecto al mismo. Como consecuencia, la determinación radiológica del ápice radicular puede ser errónea a la hora de realizar el tratamiento pulpar requerido⁵.

La reabsorción también puede extenderse a través de las raíces y hacia el interior de los conductos radiculares, creando unas comunicaciones adicionales con los tejidos periapicales, además de los orificios apicales y los conductos laterales o accesorios. Se ha demostrado que éste fenómeno, ocurre en todos los niveles de la raíz^{5,6}.

Por la relación de los gérmenes permanentes con las raíces de los dientes temporales, los planos de reabsorción presentan características constantes para cada grupo de dientes⁷:

- 1- La reabsorción desde el ápice al tercio medio de los dientes unirradiculares superiores, se realiza a expensas de las superficies biseladas de corta extensión, con perforación parietal del conducto, debido a la posición perpendicular de los ejes de los dientes

temporales y a la ligera inclinación de los gérmenes de los dientes permanentes, como se observa en la **Figura 2**.



Figura 2. Características de reabsorción en un incisivo central y canino superior temporal⁷.

2- La reabsorción en el tercio apical y tercio medio de los dientes unirradiculares inferiores se produce a expensas de la cara lingual en forma de bisel, o con perforaciones parietales en la zona media de la raíz, como se ve en la **Figura 3**. Esto se debe a la perpendicularidad de los dientes temporales y a la inclinación acentuada de los gérmenes de los permanentes.

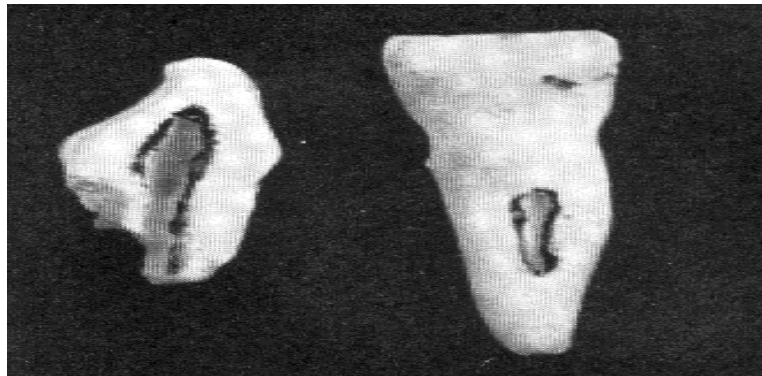


Figura 3. Aspectos de la reabsorción de la cara lingual de las raíces de los dientes unirradiculares inferiores⁷.

3- En los molares superiores la reabsorción se produce, en general, y en primer término a expensas de la raíz distal y palatina como se representa en las **Figuras 4 y 5** y en los inferiores a expensas de la raíz distal como se observa en las **Figuras 6 y 7**.

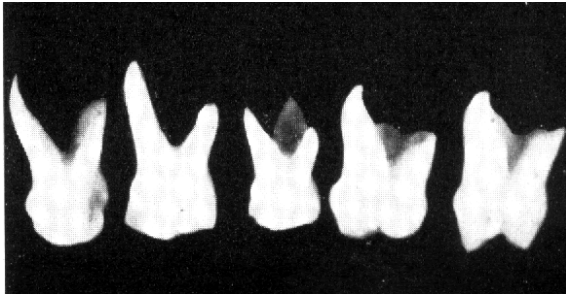


Figura 4. Reabsorción preponderante de las raíces distal y palatina del primer molar superior temporal⁷.

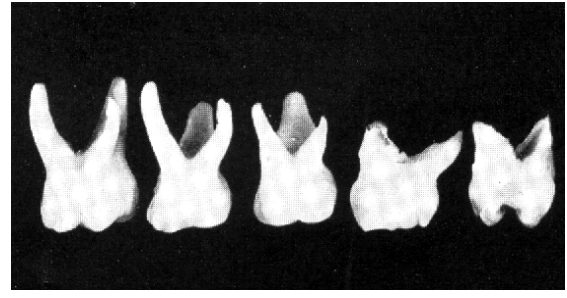


Figura 5. Segundos molares superiores temporales que muestran la misma característica de reabsorción de los primeros molares superiores⁷.

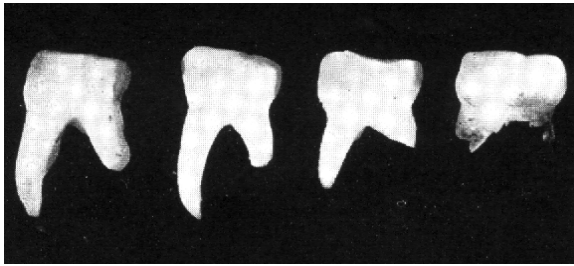


Figura 6. Reabsorción preponderante de la raíz distal de los primeros molares inferiores⁷.

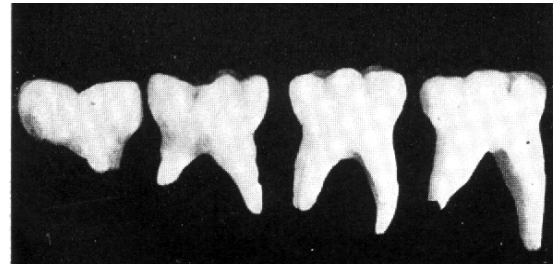


Figura 7. Segundos molares inferiores mostrando la reabsorción semejante a la de los primeros molares inferiores⁷.

Este patrón de reabsorción se debe a la inclinación hacia mesial de los gérmenes permanentes. En los maxilares de gran desarrollo, los gérmenes permanentes logran una dirección perpendicular produciendo la reabsorción de sus raíces en un mismo plano como se observa en la **Figura 8**.

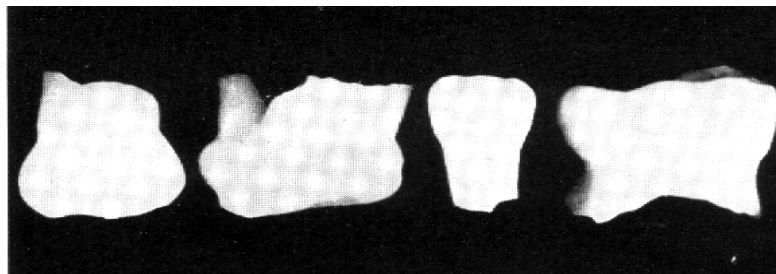


Figura 8. Reabsorción, en un mismo plano, de dientes temporales superiores e inferiores⁷.

- 4- En el tercio cervical la reabsorción se desarrolla en sentido horizontal, a consecuencia de la posición vertical de las coronas permanentes como se observa en la **Figura 9**.

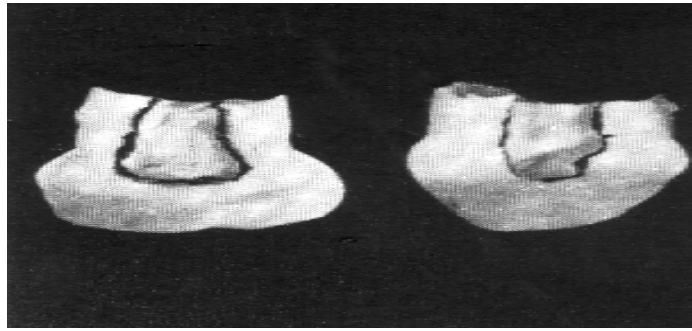


Figura 9. Reabsorción horizontal en el tercio cervical de un incisivo central y canino superiores⁷.

Es importante tener en cuenta que cuando el germen del diente permanente se sitúa en pleno espacio interradicular del diente temporal, la reabsorción se manifiesta por múltiples perforaciones de las paredes internas de los conductos, lo que ha de tenerse en cuenta para la desvitalización de la pulpa; y en la acción germicida, para actuar más por la difusión que por la acción de contacto. Es necesario ser cauteloso durante la instrumentación de los molares temporales después de los siete años de edad, a fin de no introducir los instrumentos a través de estas perforaciones⁷ como se pueden observar en los molares que aparecen en la **Figura 10**.

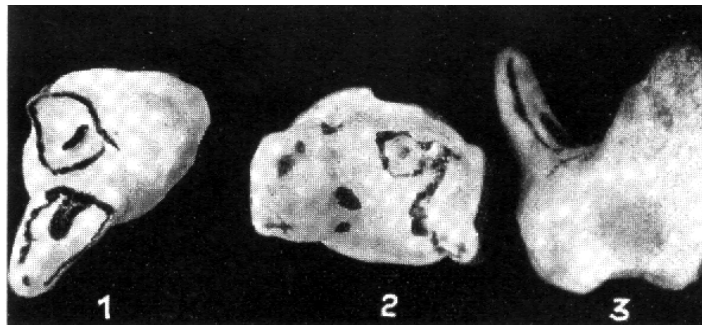


Figura 10. Perforaciones parietales y del piso de la cámara ocasionadas por la reabsorción⁷.

Estos procesos de reabsorción explicados previamente, complican la determinación de la longitud de trabajo, en caso necesario de realizar un tratamiento de conductos⁶.

Debemos tener en cuenta estos patrones de reabsorción para evitar una sobre-instrumentación del conducto radicular y realizar una cuidadosa condensación de los materiales

de obturación. Si los signos de reabsorción son visibles radiológicamente, es aconsejable establecer la distancia de trabajo de los instrumentos de endodoncia a 2-3 mm menos del ápice radiológico. En estos casos, para tener una precisión máxima al medir las longitudes del conducto, se recomienda utilizar una técnica de paralaje radiológico mediante cono largo⁵. Sin embargo, cuando existen grados pequeños de reabsorción pueden no ser apreciados en la radiografía. En estos casos, la determinación de la longitud del conducto radicular de manera electrónica, puede resultar de ayuda para superar los defectos del examen radiográfico en estos dientes. Otro de los beneficios de esta técnica se basa en la reducción en la exposición de los niños a los rayos X⁵.

Según Moss y cols. otra de las complicaciones anatómicas que se presenta es la comunicación entre la cámara pulpar y el área interradicular, lo cual puede dar origen a lesiones de bi o trifurcación⁹. Este aspecto fue confirmado por Ringelstein y Seow cuando llevaron a cabo un estudio donde comprobaron que el 42% de 75 primeros molares temporales extraídos, tenían la foramina dentro del área de la furca. Este hecho explicaría la usual aparición de condiciones patológicas en el área intrarradicular de los primeros molares temporales¹⁰.

1.3 Diagnóstico pulpar en dentición temporal.

La correlación entre los síntomas clínicos y los condicionantes histopatológicos en la patología pulpar de la dentición temporal es pobre y complica el diagnóstico pulpar cuando se produce una exposición pulpar en niños. Hoy en día, la evidencia científica determina que sin un examen histológico es imposible determinar con exactitud la extensión de la inflamación⁶.

En ocasiones, puede resultar difícil diagnosticar la condición pulpar en dientes con lesiones profundas sin exposición pulpar clínica y sin hallazgos radiográficos. Algunas veces, la pulpa puede estar inflamada de forma reversible o estar desarrollando una pulpitis irreversible o estar necrótica, contraindicándose en las dos últimas condiciones la necesidad de terapia pulpar vital¹¹.

Una historia médica completa analizando en la anamnesis las características de dolor, una rigurosa examinación intra y extraoral, y la realización de un test de vitalidad complementados con el estudio radiográfico proveerán, al clínico, de información esencial sobre el estado pulpar del diente o de los dientes en cuestión. Además, la fuente de discomfort (trauma, caries...) y la presencia de restauraciones grandes, profundas o inadecuadas, también juegan un papel crítico en el diagnóstico pulpar y por tanto, en el pronóstico del tratamiento¹².

El diagnóstico de una enfermedad es un proceso complicado que se basa en el resultado del análisis de la información registrada. El examen clínico inicial sirve como fundamento para decidir sobre la necesidad de considerar otras pruebas diagnósticas adicionales. Generalmente, con la información obtenida del examen clínico y radiográfico es suficiente para establecer un diagnóstico, aunque, en ocasiones, se necesitarán exploraciones complementarias¹.

1.3.1 Examen clínico extraoral e intraoral.

1.3.1.1 Examen extraoral.

La presencia de hinchazón facial, enrojecimiento o linfadenopatías de origen submandibular puede indicar la presencia de un absceso dento-alveolar agudo. En situaciones severas, una celulitis facial puede afectar el espacio infraorbitario resultando en un cierre parcial o total del ojo, apertura bucal limitada, fiebre y malestar general¹².

1.3.1.2 Examen intraoral.

Se examinarán los tejidos blandos, atendiendo a cambios en la coloración de la mucosa, tumefacción, abscesos y fístulas. El absceso gingival o la fístula con drenaje asociados a un diente con una lesión de caries profunda constituyen un signo clínico obvio de pulpitis irreversible¹.

A nivel dentario, se evaluará la profundidad y extensión del proceso carioso o fractura, exposiciones pulpares, pólipos y las posibilidades de aislamiento y restauración del diente. Los dientes con un diagnóstico cuestionable deberán ser examinados para observar si presentan

movilidad anormal o sensibilidad a la percusión. Cuando exista la presencia de lesiones de caries interproximales entre dientes adyacentes, ese espacio puede constituir un reservorio para la impactación alimentaria, dando como resultado un falso positivo en la prueba de percusión. La movilidad patológica también debe diferenciarse de la movilidad normal de los dientes temporales, previa a su recambio fisiológico^{1,12}.

1.3.2 Examen radiográfico.

El estudio radiográfico resulta fundamental para el diagnóstico de las lesiones pulpares y ofrece información relevante como se presenta a continuación¹:

- Tiempo de vida útil.
- Estado del diente permanente en formación.
- Anatomía del diente.
- Relación o proximidad entre el techo y el piso cameral.
- Profundidad de la lesión y su proximidad a la cámara pulpar.
- Tratamientos previos.
- Reabsorción patológica externa o interna.
- Presencia de cálculos pulpares.
- Perforación del piso cameral.
- Lesiones radiolúcidas periapicales o interradiculares, su extensión y su relación con el saco pericoronario del diente permanente sucedáneo.

1.3.3 Historia del dolor.

El dolor provocado que cesa tras eliminar la causa es normalmente reversible e indica un menor número de cambios inflamatorios. Los estímulos pueden ser térmicos, químicos y mecánicos y muchas veces son debidos a caries profundas, restauraciones filtradas, diente temporal próximo a la exfoliación o erupción de un diente permanente⁶.

El dolor espontáneo es un dolor constante o palpitante que ocurre sin estimulación previa y que puede aparecer en momentos de inactividad como el sueño⁶. En un estudio histológico, Guthrie y cols. demostraron que la presencia de dolor espontáneo está normalmente asociada con cambios degenerativos extensos que se extendían hasta los conductos radiculares. Concluyeron que en los dientes temporales con historia de dolor espontáneo no se debía realizar el tratamiento de pulpotomía, sino de pulpectomía o extracción¹³.

1.3.4 Test vitalidad.

Las pruebas de vitalidad pulpar, tanto térmicas como eléctricas, tienen escasa utilidad en dentición temporal, no ofrecen evidencias fiables sobre el grado de inflamación de la pulpa, aparte de que el dolor que desencadenan puede reducir la disposición del niño a cooperar¹.

La aplicación de agentes sobre el diente para incrementar o disminuir la temperatura y estimular de esta manera la respuesta pulpar a través de la conducción térmica ha sido el test de vitalidad más empleado. El spray de frío, debido a su sencillo almacenaje y su sencilla aplicación técnica, es el más empleado en la actualidad¹⁴.

Jespersen y cols. evaluaron la respuesta pulpar al frío y al test pulpar eléctrico en dientes con presencia y ausencia de caries. Encontraron que la presencia de lesiones de caries en dientes vitales resultaba en una respuesta más precisa al realizar el test del frío. Sin embargo, cuando no había respuesta ante el test del frío en dientes con lesiones por caries, el diagnóstico de necrosis pulpar era certero¹⁵.

El láser doppler desarrollado en 1970 para medir la velocidad de los glóbulos rojos en los capilares, es una alternativa no invasiva y no dolorosa, a los métodos tradicionales de estimulación resultando un test prometedor para los más jóvenes. Este medidor de flujo ha sido utilizado con éxito para medir el flujo en la pulpa de dientes de gatos, ratas y humanos^{16,17}.

Gazelius y cols., en un estudio realizado con pulpa dental humana, encontraron que el medidor de flujo podía producir una señal que permitiría la diferenciación de dientes vitales de no vitales¹⁷.

Fratkin y cols. realizaron un estudio en 119 dientes temporales con láser Doppler para determinar si el flujo sanguíneo pulpar estaba presente o ausente. Para ello, los dientes se testaron bajo dos condiciones, el diente insitu y extraído y el diente con pulpa o removida. Los autores concluyeron que aunque existen varios métodos para evaluar la vitalidad pulpar, el láser Doppler es el único que es objetivo, no invasivo, indoloro y aceptado por los pacientes más jóvenes y que éste láser tiene inmediatas aplicaciones clínicas en la valoración del estado pulpar en dientes temporales¹⁸.

El pulsioxímetro es un método no invasivo que permite medir la saturación de oxígeno en sangre. Es una prueba objetiva, que no requiere una respuesta subjetiva por parte del paciente. Fue inventado por Takuo Aoyagi en 1974^{19, 20}.

El sensor del pulsioxímetro consiste en dos diodos, uno transmite luz roja (640 nm) y otro emite luz infrarroja (940 nm). Los diodos transmiten la luz a través de un lecho vascular pulsátil, como el dedo o la oreja, y se detectan en el lado opuesto con un fotorreceptor. La hemoglobina oxigenada (HbO₂) y la desoxihemoglobina (Hb) absorben diferentes cantidades de luz roja o infrarroja. La HbO₂ absorbe la luz del espectro infrarrojo y permite el paso de la luz roja; por el contrario, la Hb absorbe la luz del espectro rojo y permite el paso de la luz infrarroja. El ratio de la absorción de la luz roja e infrarroja mide el grado de oxigenación de la hemoglobina²⁰.

Schnettler y Wallace encontraron una relación entre la saturación de oxígeno sistémica y la de la pulpa utilizando un pulsioxímetro de oreja modificado sobre un diente. Estos autores recomendaron su uso como test de vitalidad pulpar²¹.

Gopikrishna y cols, desarrollaron mas tarde un pulsioxímetro para evaluar la vitalidad pulpar. Compararon la precisión de este pulsioxímetro con los test pulpares eléctricos y térmicos y encontraron que la probabilidad de encontrar vitalidad pulpar positiva fue de un 81% con el test frio, un 74% con test eléctrico y un 100% con el pulsioxímetro. La posibilidad de encontrar vitalidad pulpar negativa fue de un 92% con el test de frio, un 91% con el test eléctrico y un 95% con el pulsioxímetro²².

En un estudio realizado por Goho, la muestra consistió en 45 incisivos temporales y 48 incisivos permanentes de niños entre 4 y 10 años de edad. Encontró que la saturación de oxígeno que se tomó en los incisivos permanentes mediante un sensor de oreja tuvo un valor medio del 94%, mientras que los valores medidos en el dedo del paciente tuvieron una media del 93%. En los incisivos temporales el valor medio fue del 93%, mientras que en el dedo del paciente fue del 97%. Por tanto, concluyó que los valores registrados que procedían de los dientes fueron menores que los que procedían de los dedos. Sin embargo no existió una relación estadísticamente significativa entre ambos valores. Esto puede ser debido a la utilización de un sensor que no esta específicamente diseñado para el diente, sino para otra parte del cuerpo humano²³.

El requisito que debe cumplir un pulsioxímetro, para ser utilizado en boca, es que el sensor debe adaptarse al tamaño, forma y contorno anatómico del diente. El sensor y el fotorreceptor deben estar paralelos para que el fotorreceptor reciba la luz transmitida a través del diente²².

Para que el pulsioxímetro sea preciso también será necesario tener un flujo arterial normal. Cuando este es bajo, el pulsioxímetro no podrá medir adecuadamente²⁴.

1.3.5 Prueba de percusión.

La sensibilidad a la percusión puede ser valiosa para el diagnóstico, pero se complica debido a la fiabilidad de la respuesta del niño por los aspectos psicológicos involucrados⁶.

Esta prueba se realiza con la punta del dedo, y es útil para localizar un diente doloroso en el cual la inflamación avanza y afecta al ligamento periodontal¹.

La movilidad dental puede ser normal debido a la reabsorción fisiológica, y muchos dientes que presentan un problema pulpar no tienen movilidad. La movilidad dental patológica debe diferenciarse de la movilidad normal de los dientes temporales previa a su caída; siempre hay que comparar con el diente contralateral y tener en cuenta la edad de exfoliación⁶.

1.3.6 Diagnóstico histopatológico.

En muchas ocasiones el diagnóstico definitivo solo se puede obtener por evaluación directa del tejido pulpar. El color y la cantidad de sangrado se deberán evaluar cuando el tejido pulpar esté expuesto; un sangrado profuso o un exudado purulento indicarán una pulpitis irreversible o una necrosis pulpar. Un sangrado excesivo es una indicación de que la inflamación ha alcanzado la pulpa radicular. Por el contrario, si el sangrado cesa tras la amputación de la pulpa coronal, es indicativo de un proceso pulpar reversible y la pulpotomía constituirá el tratamiento de elección para ser llevado a cabo^{12,25}.

1. 4 Terapia pulpar vital en dentición temporal.

La pulpa de un diente temporal puede resultar expuesta debido a varias causas, destacando entre ellas, una lesión de caries. El desarrollo de la lesión de caries a través de la dentina puede provocar una invasión de microorganismos de la pulpa y con ello el desarrollo de una inflamación pulpar. El objetivo de la terapia pulpar vital es tratar la lesión reversible de la pulpa y mantener su vitalidad y función hasta el momento del recambio fisiológico. Por eso la

técnica de elección es la pulpotomía, donde sólo se retira el tejido pulpar coronal inflamado, dejando el tejido pulpar radicular no afectado²⁶.

La pulpotomía, hoy en día, constituye el tratamiento llevado a cabo en las exposiciones pulpares por lesiones de caries en dientes temporales asintomáticos. Es definida por la *American Association of Pediatric Dentistry* (AAPD) como el procedimiento clínico para eliminar el tejido pulpar coronal afectado, con el fin de preservar la vitalidad y la función de la pulpa radicular²⁷. Su objetivo es evitar el dolor y la inflamación provocadas por la invasión bacteriana a la pulpa, manteniendo el diente temporal y preservando la longitud de la arcada²⁸.

La pulpotomía está indicada cuando la remoción de la caries resulta en una exposición pulpar en un diente temporal con un tejido pulpar normal o con pulpitis reversible, o tras exposición pulpar por traumatismo. El tejido pulpar coronal es amputado y el tejido pulpar radicular remanente deberá estar vital sin supuración, purulencia, necrosis o hemorragia excesiva que no pueda ser controlada por un algodón sobre el suelo de la cámara pulpar tras varios minutos de compresión y en ausencia de signos radiográficos de infección o reabsorción patológica^{5,27}.

La presencia de cualquier signo o síntoma de inflamación que se extienda más allá de la pulpa coronal es una contraindicación para la pulpotomía¹. Por tanto, la técnica de la pulpotomía en dientes temporales está contraindicada en las siguientes circunstancias^{29,30}:

- Presencia de inflamación de los tejidos blandos adyacentes de origen pulpar.
- Presencia de una fístula.
- Presencia de movilidad patológica.
- Reabsorción radicular externa o interna.
- Lesiones radiográficas periapicales o interradiculares.
- Calcificaciones pulpares.

- Ausencia de sangrado pulpar o excesivo sangrado tras la amputación pulpar.
- Historia de dolor espontáneo o nocturno.
- Sensibilidad a la percusión o palpación.
- Diente no restaurable.
- Diente próximo a ser exfoliado.

1.4.1 Técnica de pulpotomía para dientes temporales.

La técnica para la realización de una pulpotomía se basa en el hecho de que el tejido pulpar radicular está vital y tiene la capacidad de curarse tras la amputación quirúrgica de la pulpa coronal, que puede estar infectada o afectada³⁰.

La pauta de tratamiento es la siguiente^{1,12}:

1. Seleccionar el diente sobre el que vamos a realizar la terapia pulpar. El diente no debe presentar dolor espontáneo, presencia de absceso o fístula y movilidad, no presentar reabsorción radicular interna o externa y que no exista radiolucidez en la zona de la furca.
2. Anestesia y aislamiento con dique de goma para evitar la contaminación bacteriana de la pulpa cameral.
3. Remover toda la caries antes de realizar el acceso a la cámara pulpar.
4. Realizar la apertura de la cámara pulpar con una fresa de tungsteno nº 330 a alta velocidad y con refrigeración.
5. La pulpa coronal es removida con una fresa redonda de tungsteno a baja velocidad o con una cucharilla bien afilada. La hemostasia se consigue mediante la aplicación de un pellet de algodón durante un tiempo no superior a los 5 minutos. Si la hemostasia no se consigue, la pulpotomía no estará indicada, debido a que el tejido pulpar estará inflamado e hiperémico.
6. Una vez que se ha logrado conseguir la hemostasia se colocará el material de fijación de elección.

1.4.2 Materiales utilizados en pulpotomías de dientes temporales.

Idealmente un material para pulpotomías debe cumplir una serie de propiedades, como ser bactericida, fácil de usar, ser inofensivo para el tejido pulpar remanente y las estructuras que lo rodean y no debe interferir con la reabsorción radicular fisiológica del diente temporal. En la búsqueda de éste material ideal, han surgido varios candidatos desde que Buckley en los años 90 introdujera el formocresol. Estos han sido clasificados en tres grandes categorías de acuerdo con sus efectos sobre la pulpa radicular remanente: desvitalización, preservación y regeneración¹².

Ranly en 1994 clasificó la terapia pulpar vital de acuerdo con los objetivos de tratamiento: desvitalización (momificación, cauterización), preservación (mínima desvitalización, no inducción de la reparación dentinaria) o regeneración (inducción y reparación)³¹.

1.4.2.1 Desvitalización.

Según el diccionario de la RAE desvitalizar se define como quitar la vitalidad a alguien o a algo³².

Los materiales que se engloban en este grupo están diseñados para momificar el tejido pulpar remanente y son el formocresol, el láser y la electrocirugía².

1.4.2.1.1 Pulpotomía con formocresol.

En 1905, Buckley introduce el uso de una combinación de formalina y tricresol a partes iguales para tratar dientes permanentes no vitales³³. Durante los años treinta, Sweet propuso la aplicación de una mezcla de óxido de cinc eugenol y formocresol para el tratamiento pulpar de molares decíduos³⁴.

El análisis microscópico de Emmerson y cols. mostró que la mayor parte de los efectos beneficiosos del formocresol se producían en los primeros 5 minutos³⁵. Por lo tanto, la técnica original de 4-visitas se cambió por la técnica de 1-visita, con 5 minutos de aplicación introducida por Redig en 1968^{12,36}.

Desde entonces, el formocresol ha sido el medicamento más empleado en pulpotomías en dentición temporal, principalmente porque su uso es sencillo y garantiza unas altas tasas de éxito clínico³⁷. Los resultados histológicos, sin embargo, han sido más problemáticos. Se ha visto que el formocresol es citotóxico, desvitalizante pulpar y produce inflamación crónica y necrosis de los tejidos. Otro problema es la posible difusión del formocresol desde la pulpa a la circulación sistémica. La metabolización y excreción del formocresol que se absorbe se produce por vía pulmonar y renal, el resto puede llegar a fijarse en los tejidos, sobre todo en riñón, hígado y pulmones^{5, 38}. En un estudio realizado por Pashley y cols. en perros se observó que el 10% del formaldehído procedente de una pulpotomía realizada con formocresol fue absorbido a nivel sistémico³⁹.

Bolt y cols. en un estudio realizado con ratas observaron que se producía una interacción entre el formaldehído y el ADN que podían producir tumores y concluyeron que el formaldehído presenta un riesgo carcinogénico para los humanos⁴⁰.

Zarzar y cols. realizaron un estudio in vivo con una muestra de 20 niños que tenían dientes temporales con caries y que precisaban tratamiento pulpar. Se tomaron dos muestras de sangre de cada niño, una antes del tratamiento pulpar y otra 24 horas después. Los autores concluyeron que aunque no había diferencias estadísticamente significativas en ambas muestras, antes y después de realizar la pulpotomía mediante la fórmula de Buckley, sí que se encontraron alteraciones cromosómicas en el cultivo linfocitario de un paciente⁴¹.

Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó el formaldehído como carcinogénico para los humanos en junio del 2004, dejando que la profesión buscara otras alternativas al formocresol. Milnes publicó una extensa y detallada revisión de las más recientes investigaciones sobre el metabolismo, farmacocinética y carcinogenicidad del formaldehído y concluyó que el formaldehído no es un potente carcinógeno humano en

condiciones de baja exposición. Este autor recomendaba la dilución 5 a 1 de la solución de Buckley⁴².

La búsqueda de alternativas adecuadas al formocresol como medicamentos pulpares ha sido continua durante más de tres décadas, con el objetivo de identificar un material biocompatible que preservase la función de la pulpa involucrada de los dientes temporales, en un paciente en crecimiento⁴³.

Según Fuks, el material ideal para preservar la pulpa radicular debería ser: (1) bactericida, (2) inofensivo para la pulpa y las estructuras vecinas, (3) capaz de promover la curación de la pulpa radicular y (4) no interferir con el proceso fisiológico de reabsorción radicular⁴⁴.

Se han sugerido varios materiales que cumplen los requisitos anteriores tales como el glutaraldehído, el sulfato férrico, el agregado trióxido mineral (MTA), el hueso deshidratado, la proteína ósea morfogenética y el colágeno^{26,45}.

Sin embargo, en una revisión Cochrane llevada a cabo por Nadin y cols. en el año 2003, se concluyó que no había suficiente evidencia acerca del uso de un particular agente o técnica sobre otras en pulpotomías de dientes temporales⁴⁶.

1.4.2.1.2 Electrocirugía.

Consiste en la aplicación de una corriente de alta frecuencia para incidir, coagular, fulgurar o disecar tejidos⁴⁷.

La pulpotomía mediante electrocirugía tiene sus ventajas. Es más rápida y limitada, la penetración pulpar no es muy profunda. Hay hemostasia y buena visualización sin coagulación por un medio químico y no hay afectación sistémica⁴⁸.

Shulman y cols. publicaron en 1987 el primer estudio comparativo entre pulpotomías realizadas con formocresol y con electrocirugía sobre dientes temporales de primates. Tras 65 días de estudio observaron presencia de inflamación, reabsorción radicular y radiolucidez en la bifurcación en los dientes tratados mediante electrocirugía. Concluyeron que el calor y el tiempo de exposición podía ser la causa de la degeneración dental. Tampoco observaron que la adición del formocresol a los dientes, tratados mediante electrocirugía, mejorara los resultados respecto a cuándo se utilizaba sola⁴⁹.

Mack y Dean publicaron en 1983 un estudio retrospectivo donde realizaban pulpotomías mediante electrocirugía en 164 molares temporales de 101 niños. Tras un periodo de 60 meses, observaron que el 99,4% de los casos fueron un éxito desde el punto de vista clínico y radiográfico. Concluyeron que la técnica mediante electrocirugía es superior a la técnica mediante formocresol y puede considerarse un procedimiento ideal para el tratamiento de pulpotomía en molares temporales⁵⁰.

Rivera y cols. realizaron un estudio comparativo entre pulpotomías realizadas con formocresol y con electrocirugía en una muestra de 80 molares. Tras 6 meses, no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Concluyeron que la electrocirugía era un método más rápido que la técnica de formocresol y que deberían hacerse más estudios al respecto que pudieran contrastar dicha información⁵¹.

Ruemping y cols. en su estudio comparaban la respuesta pulpar a nivel histológico del formocresol con respecto a las pulpotomías realizadas con electrocirugía en dientes de primates. Tras dos meses de estudio, concluyeron que ambos sistemas mantenían la vitalidad, no existiendo evidencia de afectación periapical, furcal o necrosis pulpar⁴⁸.

1.4.2.1.3 Láser.

Algunos estudios que han reportado la aplicación del láser sobre tejidos dentales, han mostrado su potencial para incrementar la curación, estimulando la dentinogénesis y preservando la vitalidad de la pulpa dental⁵². Como resultado del uso de diferentes tipos de láseres en odontología y los beneficios terapéuticos ofrecidos por estos, como hemostasis, esterilización, curación de la herida pulpar, se ha sugerido el empleo del láser como alternativa al formocresol en la técnica de la pulpotomía⁵³. El uso del láser en pulpotomías fue reportado por primera vez por Shoji en 1985, quién empleó un láser CO2 en el tratamiento de pulpotomías en dentición temporal⁵⁴.

En 1996, Wilkerson y cols. evaluaron los efectos clínicos, radiográficos e histológicos del láser argón sobre pulpotomías vitales en dientes de cerdo. Los resultados mostraron que todos los tejidos blandos permanecieron normales y todos los dientes exhibían movilidad normal. También se observó histológicamente, como criterio de éxito, la formación de dentina⁵⁵.

Huth y cols. encontraron que las pulpotomías que realizaron con el láser Er:YAG tuvieron un éxito insignificativamente menor (78%) que con el formocresol (85%) tras un estudio de dos años de seguimiento⁵⁶. En contraste, Liu reportó un alto éxito clínico (97%) y radiológico (94,1%) para las pulpotomías realizadas con el láser Nd:YAG⁵².

Niranjani y cols. realizaron un estudio in vivo en el que comparaban el efecto del MTA, el láser y el Biodentine™ en la realización de pulpotomías de dientes temporales. Los mejores resultados fueron los obtenidos en el grupo del MTA, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas⁵⁷.

1.4.2.2 Preservación.

Según el diccionario de la RAE preservar significa proteger, resguardar a alguien o a algo, de algún daño o peligro³².

El objetivo de los materiales incluidos en este grupo es preservar la vitalidad de la pulpa radicular y entre ellos se encuentran el ZOE, el glutaraldehído, el sulfato férrico y el hipoclorito de sodio. Son materiales que no son capaces de generar un proceso inductivo³¹.

1.4.2.2.1 Óxido de zinc eugenol.

Históricamente, el óxido de zinc-eugenol (ZOE) ha sido uno de los materiales más usados para realizar tratamientos pulpares en dentición temporal después del formocresol. Su empleo más frecuente es como material de obturación en pulpectomías, pero también se utiliza en pulpotomías en dientes temporales^{58,59}.

En la búsqueda de alternativas al formocresol, algunos clínicos han eliminado el paso intermedio de colocar un medicamento y sitúan el ZOE en el interior de la cámara pulpar después de conseguir hemostasia mediante presión⁴⁵.

El ZOE puede funcionar como un cicatrizante y estimulador del órgano dentino-pulpar, fomentando el proceso de neoformación de dentina reparadora⁶⁰.

Chien y cols. compararon el éxito de pulpotomías sólo con ZOE con pulpotomías con ZOE/sulfato férrico y encontraron tasas de éxito del 100% para ambos materiales⁶¹. Erdem y cols. mostraron un éxito de un 68% durante 24 meses de seguimiento, usando la técnica de pulpotomías con ZOE⁶².

A pesar de que éste material ha mostrado resultados satisfactorios cuando se utiliza para pulpotomías de dientes temporales, el ZOE tiene un efecto tóxico notable. Diferentes estudios

han mostrado que los dientes en los que se realizaron pulpotomías con ZOE, presentaron reabsorción interna e inflamación, en la zona de la amputación de la pulpa cameral. Se cree que la reabsorción interna está asociada con el eugenol y cuando el ZOE se utiliza como material para la pulpotomía, el eugenol contacta directamente con el tejido vital y causa una respuesta inflamatoria de moderada a severa. Por lo tanto, si prevenimos el contacto directo entre el eugenol y el tejido pulpar vital, aumentará el éxito de nuestro tratamiento^{45,63}.

1.4.2.2.2 Glutaraldehído.

El glutaraldehído, un dialdehído saturado, ha sido sugerido como medicamento de preservación para pulpotomías en dentición temporal, debido a sus excelentes propiedades como fijador tisular⁶⁴. El glutaraldehído no tiene capacidad bactericida a pH bajo y por lo tanto debe ser alcalinizado a un pH de entre 7.5 y 8.5 para mejorar su efectividad. Ese aumento de pH lo hace inestable, disminuyendo su vida media a 14 días^{64,65}. En 1980 *Kopel y cols.* introducen el glutaraldehído como material para la realización de pulpotomías de dientes temporales con el fin de encontrar un material que fuera menos tóxico que el formocresol, ya que éste limita su penetración en el tejido pulpar y preserva la pulpa radicular⁶⁶.

Rushmah y cols. realizaron un estudio para determinar la difusión del formocresol y del glutaraldehído en 30 molares temporales. Estos dientes fueron pulpotomizados, utilizando formocresol en una dilución (1:5) o glutaraldehído al 2% y sumergidos en una solución tampón para valorar la difusión de ambos hacia la dentina y cemento radicular. Los autores encontraron que el formocresol difundía a través de la dentina y el cemento dentro de los 15 minutos siguientes a la realización de la pulpotomía con formocresol, sin embargo no se observó difusión del glutaraldehído⁶⁴.

Se evaluó el efecto del tiempo, la concentración y el pH sobre el efecto fijador del glutaraldehído en un estudio in vitro por Ranly y cols. Estos autores concluyeron que el

glutaraldehído es más efectivo cuando está tamponado y que, aumentando su concentración y aplicándolo por periodos de tiempo cortos, mejora el grado de fijación del material. Los datos sugirieron que en tratamientos clínicos se podría usar al 4% durante 4 minutos o al 8% durante 2 minutos⁶⁷.

En otro estudio, Tsai y cols. evaluaron clínica y radiográficamente 258 pulpotomías realizadas en molares temporales utilizando diferentes concentraciones de glutaraldehído, encontrando un 98% de éxito clínico y un 78,7% de éxito radiográfico⁶⁸.

Lloyd y cols. en su estudio evaluaron la respuesta histológica de la pulpa dental, utilizando varias concentraciones de glutaraldehído (0,5, 1,0 y 2,0%) durante diferentes tiempos de aplicación (2,5 y 10 minutos) en 160 dientes primarios de monos. Encontraron que la efectividad del glutaraldehído fue inversamente proporcional a la concentración y al tiempo de exposición. A menor concentración, mayor es el tiempo que el glutaraldehído necesita estar en contacto con la pulpa radicular remanente para mantener su efectividad. Sus resultados mostraron que una concentración del 2% con una exposición de 10 minutos tenía las tasas de éxito más favorables a lo largo del tiempo⁶⁹.

Uno de los inconvenientes del empleo del glutaraldehído es que posee unas características de pureza, preparación, estabilidad y almacenaje muy meticulosas para que la solución no pierda efectividad¹.

1.4.2.2.3 Hipoclorito de sodio (NaOCl).

Usado durante cuatro décadas como el irrigante más popular en endodoncia, ha demostrado ser un buen antimicrobiano y agente hemostático, dos factores importantes a la hora de realizar pulpotomías de dientes temporales²⁶. La efectividad antimicrobiana del NaOCl se

basa en su alto pH que interfiere con la integridad de la membrana celular, el metabolismo celular y la peroxidación lipídica⁷⁰.

Hafez y cols. llevaron a cabo dos estudios histológicos y reportaron que el NaOCl es biológicamente compatible con el tejido pulpar expuesto cuando es usado como hemostático en un recubrimiento pulpar directo^{71,72}. Cox y cols., cuyos estudios evaluaron la respuesta pulpar en dientes temporales, consideraron que la hemostasia es el factor crítico más importante para el éxito clínico en el tratamiento de pulpotomía y que se consigue mejor con el NaOCl. A diferencia del formocresol, que solo tiene propiedades hemostáticas, NaOCl tiene otras cualidades, como ser un antiséptico eficaz sin causar una irritación pulpar significativa⁷³.

En otro estudio, realizado por Tunc y cols., evaluaron el efecto del hipoclorito de sodio al 3% aplicado durante 30 segundos para el control de la hemorragia en pulpotomías con hidróxido de calcio en dientes temporales. Reportaron que el uso del NaOCl al 3% como agente hemostático no influía en el resultado de las pulpotomías con hidróxido de calcio⁷⁴.

En un estudio se comparó la habilidad para disolver tejido pulpar vital humano entre el NaOCl y el suero salino, en una muestra de 40 premolares extraídos por motivos ortodóncicos. Rosenfeld y cols. concluyeron que el NaOCl al 5,25% era más efectivo que la solución salina usando NaOCl al 5% y que su efecto solvente estaba limitado al tercio medio y oclusal, por lo que su acción sobre tejidos profundos era mínimo⁷⁵.

Vargas y cols. realizaron un estudio clínico randomizado comparando el sulfato férrico con el NaOCl encontrando una tasa de éxito del 90% en el grupo de NaOCl durante un periodo de 12 meses en comparación con la tasa del 74% del sulfato férrico⁷⁶. Posteriormente Vostatek y cols. reportaron también unas tasas de éxito clínico y radiográfico del 95% y 82%

respectivamente durante 21 meses de seguimiento, tras realizar la pulpotomía con NaOCl a 192 molares temporales³⁸.

Ruby y cols. obtuvieron unas tasas de éxito clínico y radiográfico del 100% y 80% respectivamente evaluando los efectos de NaOCl al 3% en pulpotomías de molares temporales en comparación con solución 1:5 de Buckley de formocresol, cuyas tasas fueron de 100% y 84% respectivamente tras 12 meses de evolución⁷⁷.

1.4.2.2.4 Sulfato férrico.

El sulfato férrico (15,5%) ha sido ampliamente estudiado en investigaciones con animales y humanos como agente hemostático en procedimiento de pulpotomías⁷⁸.

Cuando el sulfato férrico entra en contacto con la sangre, se produce una aglutinación de las proteínas de la sangre en contacto con los iones hierro y sulfato. Esta aglutinación forma microcoágulos que taponan los orificios de los capilares, limitando así el sangrado⁷⁹.

Landau y Johnson fueron los primeros en estudiar la respuesta del sulfato férrico en pulpotomías realizadas en dientes de monos. Los autores encontraron a los 60 días de tratamiento mejores resultados histológicos con el empleo de sulfato férrico que con hidróxido de calcio⁸⁰. Fei y cols. compararon el uso de sulfato férrico con formocresol en un estudio clínico de 12 meses de duración. Encontraron que los resultados clínicos y radiológicos fueron mejor para el sulfato férrico (100% y 97%, respectivamente), que para el formocresol (96% y 81%)⁸¹.

Histológicamente, Fuks y cols. demostraron que el sulfato férrico, así como el formocresol, no promueven la recuperación del tejido pulpar remanente y se encontraron varios grados de inflamación crónica⁸². Asimismo, Salako y cols. encontraron una destrucción pulpar

completa con sulfato férrico y necrosis pulpar con formocresol en pulpotomías realizadas en molares de ratas⁸³.

Un efecto común del sulfato férrico es la degradación crónica de la pulpa, que puede resultar en una exfoliación prematura del diente pulpotomizado^{84,85}. La exfoliación prematura en relación con las pulpotomías utilizando sulfato férrico y formocresol fue evaluado por Vargas y cols. Los autores concluyen que el 11% se perdió prematuramente debido a la formación de un absceso en el grupo del sulfato férrico y un 10% en el grupo del formocresol⁷⁶. Fuks y cols. y Salako y cols. realizaron estudios histológicos donde se observó que tanto el sulfato férrico como el formocresol producían una respuesta inflamatoria severa. Esto podría afectar a la exfoliación del diente temporal así como a la formación del diente sucesor^{82,83}.

Fuks y cols. en un estudio comparativo entre el sulfato férrico y el formocresol reportaron un 7,2% de casos con reabsorción radicular interna utilizando sulfato férrico y 5,4% con formocresol después de 34 meses⁸⁵.

Smith y cols. consiguieron unas tasas de éxito del 80% utilizando el sulfato férrico para pulpotomías en molares temporales. Encontraron también que las respuestas pulpares más frecuentes eran la reabsorción radicular interna (7-18%) y la calcificación (6-33%)⁸⁶. También Huth y cols. y Papagiannoulis y cols. encontraron una tasa de fracasos del 4% y 21,9% respectivamente por reabsorción radicular interna tras un periodo de 24 meses^{87,88}.

1.4.2.3 Reparativos.

Los materiales incluidos en ésta categoría deben permitir la vitalidad de la pulpa radicular y aislarla completamente de los efectos nocivos de los materiales restauradores y de las bases.

Podrán inducir también la formación de dentina reparativa³¹. Dentro de estos se encuentran el hidróxido de calcio, MTA y Biodentine™.

1.4.2.3.1 Hidróxido de calcio.

El uso del hidróxido de calcio en endodoncia fue introducido por Hermann en 1920²⁶. Este autor expuso que el hidróxido de calcio estimulaba la formación de nueva dentina en contacto con el tejido pulpar⁸⁹.

El hidróxido de calcio se utiliza de forma habitual en endodoncia como medicación intraconducto debido a sus excelentes propiedades. Entre éstas se incluyen: biocompatibilidad; actividad antibacteriana; alteración de la pared celular de las bacterias e inactivación de las endotoxinas bacterianas; propiedades antiinflamatorias y acción reparadora gracias a la activación de la fosfatasa alcalina, que es una enzima implicada en la inducción de la formación de tejido óseo⁹⁰.

Siqueira y cols.⁹¹ aconsejaron el uso del hidróxido de calcio como medicación intraconducto por las siguientes razones:

- a) Elimina las bacterias supervivientes en el interior del conducto radicular.
- b) Previene la proliferación de bacterias entre citas.
- c) Actúa como una barrera físico-química, evitando la reinfección del canal radicular y el aporte de nutrientes a las bacterias remanentes.

Debido a que la medicación intraconducto permanece durante un periodo de tiempo más largo que los irrigantes, es importante que estos materiales sean capaces de alcanzar a las bacterias remanentes en el interior de los conductos radiculares⁹¹.

Teuscher y Zander, en 1938, usaron el hidróxido de calcio para realizar pulpotomías en dentición temporal. Los resultados obtenidos fueron pobres debido a la frecuente reabsorción interna de los dientes tratados con hidróxido de calcio, siendo este material en un principio

relegado como material de obturación en dientes temporales⁹². Heiling y cols. sugirieron que esta reabsorción era el resultado de un proceso de “embolización” donde las partículas de hidróxido de calcio entraban en contacto con el tejido pulpar formando puntos focales de inflamación. Estos autores intentaron controlar este proceso usando una forma fraguada de hidróxido de calcio en 17 dientes. Las tasas de éxito fueron del 88% tras un periodo de observación de 9 meses⁹³.

Doyle y cols., encontraron unas tasas de fracaso del 64% de pulpotomías realizadas con hidróxido de calcio en un estudio comparativo con pulpotomías realizadas con formocresol durante 18 meses⁹⁴. Waterhouse y cols. también realizaron un estudio comparativo entre el formocresol y el hidróxido de calcio durante un periodo de 22 meses en 84 molares temporales, encontrando unas tasas de éxito del 84% para el formocresol y 77% para el hidróxido de calcio⁹⁵.

Otros estudios han mostrado tasas de éxito del uso del hidróxido de calcio en pulpotomías que varían del 31-100%, con la mayoría de los fracasos debido a la reabsorción radicular interna^{96,97}.

Los bajos resultados, encontrados al utilizar el hidróxido de calcio como material para la realización de pulpotomías en dientes temporales, puede ser debido a que se produce una inflamación crónica o a la presencia de un coágulo sanguíneo que puede inhibir los efectos beneficiosos de este tipo de material sobre el tejido pulpar remanente⁹⁸. El coágulo sanguíneo también puede actuar como substrato bacteriano, atrayendo microorganismos al área de la herida⁹⁹. Por tanto, la remoción del coágulo así como la limpieza de la superficie de la herida puede mejorar significativamente el éxito de las pulpotomías con hidróxido de calcio. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la influencia del agente antibacteriano sobre el proceso de reparación y no hay consenso sobre cuál es el agente apropiado para la desinfección de la cámara pulpar. Azcay y cols. encontraron que el uso del NaOCl como desinfectante de la pulpa cameral antes de realizar la pulpotomía con hidróxido de calcio, mejoraba el éxito de la

pulpotomía en comparación a cuando se utilizaba un agente salino durante un periodo de 12 meses¹⁰⁰.

1.4.2.3.2 Agregado de trióxido mineral.

El agregado de trióxido mineral (MTA) es un material bioactivo fundamentalmente compuesto de silicato y de calcio, que es capaz de conducir y de inducir formación de tejido duro¹⁰⁰. Según Torabinejad y cols., la composición del MTA se basa principalmente en la presencia de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico y silicato dicálcico, siendo las moléculas de calcio y los iones de fósforo las partículas más abundantes¹⁰¹.

El MTA es un polvo que consiste en finas partículas hidrofílicas y que fragua en presencia de humedad. Cuando el material se hidrata da lugar a un gel coloidal con un pH medio de 12.5, que solidifica formando un cemento duro. El tiempo de fraguado es de unas 3 horas aproximadamente^{102,103,104}. Una vez que fragua el material tiene una baja solubilidad y una radiopacidad más alta que la de la dentina⁹³. Presenta una resistencia a la compresión de 70 MPa. Esto es aproximadamente igual que el IRM, pero mucho menor que la amalgama (311 MPa)^{93,101}.

Fue utilizado experimentalmente hasta que fue aprobado por la FDA en 1998, para su uso como material endodónico en humanos^{102,103}.

El MTA tiene numerosas aplicaciones en el campo de la endodoncia como material empleado para recubrimientos pulpaes, reparación de perforaciones radiculares, retropreparaciones y otras^{102,105}. En dientes temporales el MTA se utiliza predominantemente para recubrimientos pulpaes y pulpotomías.

Los mayores beneficios del MTA son que es biocompatible, bactericida (pH alto: 12.5) y capaz de estimular la formación de una estructura similar al cemento, adherencia de los osteoblastos y regeneración osea^{12,106}.

Ford y cols.¹⁰⁷ y Torabinejad y cols.¹⁰⁸, en estudios histológicos observaron una gran biocompatibilidad del MTA y muy poca inflamación, al utilizarlo en perforaciones radiculares, cuando el material se extruía mas allá del sitio de la perforación¹⁰⁹.

Koh y cols.¹¹⁰ estudiaron osteoblastos humanos in vitro y encontraron que el MTA produce una liberación de citoquinas y la producción de interleukina. Holland y cols.¹¹¹ también mostraron que el MTA induce la formación de tejido duro¹⁰⁹.

Su biocompatibilidad, su capacidad de sellado y su actividad dentinogénica resultan de las reacciones físico-químicas entre el MTA y los fluidos tisulares durante la formación de la hidroxiapatita^{100,112}.

El MTA y el hidróxido de calcio comparten propiedades similares y ambos están relacionados con la formación de un puente dentinario en contacto con tejido pulpar vital⁶³. Caicedo y cols. reportaron que la presencia del puente dentinario no podía determinarse radiográficamente, aunque si se pudieron observar histológicamente en los dientes¹¹³. Estudios recientes sugieren que el mecanismo por el cual el hidróxido de calcio o el MTA estimulan el proceso de curación está relacionado con el efecto de solubilización del hidróxido de calcio en la matriz de la dentina. El alto pH y la baja solubilidad del hidróxido de calcio prolongan su efecto antibacteriano. Sin embargo, el hecho de ser soluble en agua puede hacer que se disuelva bajo restauraciones permeables, dejando un espacio vacío debajo del material restaurador¹². El MTA tiene mejor capacidad de sellado que el hidróxido de calcio, sin embargo se sigue utilizando junto con una capa de ionómero de vidrio¹¹⁴. La capacidad de sellado del MTA no está influida por la sangre o el agua. De hecho, Arens y Torabinejad han recomendado cubrirlo con un algodón húmedo y un IRM™ para mejorar el fraguado del material¹¹⁵.

Una de las desventajas del MTA es la presencia de hierro, tiñendo el diente de un color gris oscuro¹².

El MTA blanco (ProRoot White™) fue introducido como una mejora estética sobre el material original, el MTA gris, para colocarlo en dientes anteriores. Los principales componentes del MTA blanco eran silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminio tricálcico, sulfato cálcico deshidratado y óxido de bismuto¹¹⁶.

Agami y cols. realizaron un estudio en pulpotomías en molares temporales comparando el MTA gris y blanco y el formocresol, durante un periodo de 12 meses. Concluyeron que el MTA gris era superior al grupo del MTA blanco y al grupo del formocresol¹⁰⁹.

El MTA se prepara inmediatamente antes de su uso, mezclando el polvo con agua estéril o solución salina en proporción 3:1 sobre una loseta o papel de mezcla para obtener una consistencia que sea manejable. La mezcla se coloca sobre la pulpa expuesta y se compacta mediante un algodón.

Hay dos tipos principales de MTA que se encuentran disponibles en el mercado, el ProRoot MTA™ (Dentsply, York, PA, USA) y MTA Angelus™ (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brazil). Los dos materiales tienen una composición química similar y están compuestos de cemento Portland y de óxido de bismuto. Existen diferencias en la textura y en las partículas de cada material. MTA Angelus™ no tiene la fase de sulfato cálcico, lo que resulta en un tiempo de fraguado más corto del material. Además, es menos radioopaco^{117,118}.

Según Celik y cols. ProRoot MTA™ Y MTA Angelus™ mostraron tasas de éxito similares (98% y 91% respectivamente) como materiales de pulpotomía en molares temporales. Estas tasas fueron superiores a las obtenidas por el hidróxido de calcio (77%)¹¹⁹.

En 2001, Eidelman y cols. publicaron el primer estudio en el que analizaron clínica y radiográficamente los efectos del MTA comparándolos con el formocresol como agente terapéutico en pulpotomías en molares temporales, obteniendo un 100% de éxito clínico, concluyendo que el MTA podría ser un sustituto aceptable para el formocresol¹²⁰.

Desde entonces se han hecho muchos estudios relacionados con la terapia pulpar y el MTA con tasas de éxito que varían entre el 66 y el 100%, siendo uno de los materiales más importantes para terapia pulpar en décadas¹².

1.4.2.3.3 Biodentine™.

El Biodentine™ (Saint Maur des Faussés, France) es un material que se usa como restaurador de la dentina, además de tener indicaciones similares a las de MTA¹¹². Es un material recomendado para recubrimientos pulpares y para varios aspectos del tratamiento endodóncico reparador como perforaciones, apexificaciones y obturaciones a retro¹²¹.

El Biodentine™ está compuesto por un polvo y un líquido. El polvo contiene principalmente silicato dicálcico y tricálcico así como carbonato cálcico. El líquido contiene cloruro cálcico y un agente reductor de agua (polímero hidrosoluble). El cloruro cálcico actúa como un acelerador en el proceso de hidratación del silicato tricálcico. Esto forma una solución ácida, y esta reacción, junto con el carbonato cálcico que es básico, ayuda a aumentar la velocidad en la reacción de fraguado¹²².

Como resultado de estos componentes el Biodentine™ fragua en una media de entre 9-12 minutos, lo cual es más rápido que otros materiales como el MTA basados en silicatos de calcio sin modificar. El fraguado del Biodentine™ es similar al cemento Portland, sólo que ocurre más rápido gracias al efecto acelerador del cloruro cálcico¹²².

Hay una amplia evidencia de los efectos positivos de Biodentine™ sobre las células de la pulpa vital, estimulando formación de dentina terciaria y rápida formación de dentina reparativa^{123,124,125,126}.

Diferentes estudios acerca de las interacciones del Biodentine™ con la dentina han mostrado que este material penetra en la dentina formando microestructuras similares a los tags

dentro de los túbulos. Estas estructuras obliteran los túbulos dentinarios provocando un sellado hermético y podrían estar involucrados en la disminución de la hipersensibilidad postoperatoria¹²⁷.

Además, se ha observado clínicamente que, tras la aplicación del Biodentine™ como material restaurador, se produce una disminución de la sensación dolorosa y ausencia de la sensibilidad postoperatoria en casos de pulpitis sintomáticas. Sin embargo, el potencial celular y el mecanismo molecular por el que el Biodentine™ induce un efecto de alivio del dolor todavía se desconocen¹²⁸.

Algunos estudios muestran que el Biodentine™ parece tener mejores propiedades físicas que otros materiales como el MTA y no causa discoloración dental¹². Laurent y cols. reportaron que inducía la diferenciación de células pulpares y biomineralización *in vitro*, sugiriendo su habilidad para estimular la dentinogénesis reparativa tras el recubrimiento pulpar directo^{112,129}.

El Biodentine™ presenta un tiempo de fraguado inferior y una fuerza de compresión superior, si lo comparamos con otros cementos con base de silicato de calcio. Además es un material dimensionalmente estable¹³⁰.

1.4.2.3.4 Theracal LC.

Theracal LC (Bisco, Schamurg, IL, USA), es un nuevo material de silicato de calcio modificado con resina, fotocurable, diseñado para recubrimientos pulpares directos e indirectos¹³¹. Theracal LC contiene, aproximadamente, 45% cemento Portland, 10% componente radiopaco (óxido de bismuto), 5% agente hidrofílico espesante (sílice ahumada) y 40% resina. Se ha visto que este nuevo material presenta un tiempo de fraguado corto, menor solubilidad y mayor fluidez si lo comparamos con el MTA convencional¹³².

Gandolfi y cols. estudiaron las propiedades físicas y químicas del Theracal LC y reportaron una mayor liberación de iones calcio que el ProRoot MTA y el Dycal^{TM133}.

Poggio y cols. realizaron un estudio *in vitro*, donde compararon la biocompatibilidad de 7 materiales de recubrimiento pulpar: DycalTM, CalcurTM, Calcimol LCTM, Theracal LC, ProRoot MTA, MTA AngelusTM y BiodentineTM. Evaluaron su citocompatibilidad mediante odontoblastos de ratones (MDPC-23) en tres tiempos diferentes (24, 48, y 72 h). Los autores encontraron que los materiales en base a MTA, así como el BiodentineTM, mostraron una gran biocompatibilidad. Mientras que el Theracal LC, a pesar de que su constituyente principal es el cemento Portland, presentaba una disminución en los valores de viabilidad celular comparable con los materiales en base a hidróxido de calcio¹³⁴.

1.5 Regeneración de la pulpa dental.

Con el objetivo de mantener la vitalidad pulpar, sobre todo en casos de traumatismos, se han realizado tratamientos conservadores de la pulpa, durante los últimos años. Con el descubrimiento del papel que juegan las células madre en el tejido pulpar dental, la búsqueda de métodos biológicos para utilizar este tipo de células para la regeneración de la pulpa, se ha intensificado en los últimos años. Mientras que los tratamientos actuales se han enfocado en el mantenimiento de la estructura comprometida, el objetivo futuro será la regeneración completa del tejido dental¹³⁵.

El aislamiento de células madre post-natales de diferentes fuentes de la cavidad oral y el desarrollo de materiales más biocompatibles para las células y los factores de crecimiento posibilita que los tratamientos basados en biología celular sean más factibles¹².

1.5.1 Células madre.

Las células madre (CM) son células indiferenciadas que presentan alta capacidad clonogénica, de autorrenovación y pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares, incluyendo osteoblastos, adipocitos, condrocitos...^{136,137,138,139,140}

Hay tres aspectos que las hacen únicas en la medicina regenerativa: su estado de indiferenciación, su capacidad para proliferar indefinidamente y por último, su plasticidad y capacidad de dar origen a otros tipos celulares¹⁴¹.

Encontramos diferentes tipos de células madre (CM), dependiendo de su origen, grado de diferenciación o tejido en el que se encuentren^{136,142}.

1.5.1.1 Clasificación según su potencial de diferenciación.

- Células madre totipotentes: son capaces de generar 200 tipos de tejido humano además de tejidos extraembrionarios. El cigoto es totipotente, lo que significa que es la única célula que tiene el potencial de desarrollarse en un embrión con todas las células especializadas que forman un ser vivo, así como en la estructura de soporte necesaria para el desarrollo de la placenta fetal.
- Células madre pluripotentes: pueden generar cualquier estirpe del embrión, endodermo, mesodermo o ectodermo, aunque no extraembrionarios. Se las denomina células madre embrionarias, y se pueden diferenciar en células de aproximadamente 200 tipos de tejido humano. Takahashi y cols.¹⁴³ descubrieron en 2012 que una célula madura podrá reprogramarse para convertirse en pluripotente (células pluripotenciales inducidas).
- Células madre multipotentes: sólo pueden generar un subconjunto de tipos celulares. Son capaces de diferenciarse en un número limitado de destinos celulares; distintos tipos de células, pero un mismo linaje celular.

- Células madre oligopotentes: cuando el subconjunto de tipos celulares que pueden generar es más reducido.
- Células madre unipotentes: si sólo generan un tipo celular. Son células madre adultas que producen células de un solo linaje, como las células madre germinales, entre ellas las espermatogonias que generan el esperma.

1.5.1.2 Clasificación según su origen.

- Células madre embrionarias (ESCs) son células pluripotentes y pueden diferenciarse en casi cualquier tipo celular del cuerpo humano. Sin embargo, existen problemas éticos y legales, en relación con el uso de embriones humanos, así como el problema de rechazo de tejidos en el paciente transplantado^{143,144}.

Las células madre embrionarias derivan de la masa celular interna de los blastocitos de mamífero, tienen la habilidad de crecer indefinidamente mientras mantienen su pluripotencialidad y la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales¹⁴³.

- Células madre adultas, también conocidas como somáticas o postnatales o células estrómicas multipotentes (MSCs), pueden ser aisladas de muchos tejidos adultos diferentes y tienen el potencial de dar lugar a células de diferentes linajes¹⁴⁵. A diferencia de las ESCs, las células madre adultas pueden usarse para el tratamiento de varias enfermedades¹⁴³.

1.5.2 Células madre mesenquimales.

Estas células se encuentran en la médula ósea, son llamadas células madre mesenquimales (CMM) o mesenchymal stem cells (MSCs). Fueron identificadas por Friedenstein y cols. en 1996¹⁴⁶. Presentan un aspecto fibroblástico y características de células madre. Tienen capacidad de autorrenovación, proliferación y capacidad de diferenciación a varias líneas de

tejido mesodérmico¹⁴⁷. Por lo tanto son células multipotentes; aunque recientemente se ha observado que se les puede inducir pluripotencialidad¹⁴⁴.

Los criterios que debe cumplir una célula para ser considerada una célula madre mesenquimal son:

- a) Tienen que ser adherentes al plástico en un cultivo con condiciones estándar.
- b) Mas o igual que el 95% de la población celular debe expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 cuando se mide por citometría de flujo, además deben carecer de la expresión (menos o igual 2% positivo) de los marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α o CD19 y HLA clase II.
- c) Las células deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones de diferenciación estándar in vitro¹⁴⁵.

La diferenciación hacia osteoblastos se puede demostrar utilizando la tinción Alizarin red o con la tinción Von Kossa. La diferenciación hacia adipocitos se puede demostrar fácilmente con la tinción Oil Red O. Y por último la diferenciación a condroblastos, se puede demostrar mediante la tinción Alcian blue o mediante tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II¹⁴⁵.

Morfológicamente son difíciles de definir o distinguir, debido a que pueden ser grandes y planas o alargadas, siendo similares a los fibroblastos. Su identificación se basa en la expresión de una serie de marcadores moleculares de superficie, aunque ninguno de estos marcadores específico para CMMs, ya que también han sido detectados en células mesenquimales diferenciadas, endoteliales y epiteliales^{143,145}.

Hynes y cols. identificaron células que eran similares a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, periostio, cartílago articular, membrana sinovial, líquido sinovial, músculo esquelético, tejido adiposo, tendones, sangre, vasos sanguíneos, vasculatura del cordón

umbilical, tejido placentario, tejidos fetales y piel¹⁴⁸. Los tejidos dentales también se consideran una fuente rica en células madre mesenquimales¹⁴³.

1.5.3 Células madre dentales.

El primer tipo de células madre dentales estudiadas fueron aisladas de la pulpa humana y fueron denominadas como “células madre de la pulpa dental postnatal” (DPSCs)¹⁴⁹. Seguidamente se aislaron y caracterizaron 3 tipos más, que son: células madre de los dientes temporales exfoliados (SHED)¹⁵⁰, células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)¹⁵¹ y células madre de la papila apical (SCAP)¹⁵². Morszeck y cols. identificaron un quinto tipo, las células madre del folículo dental (DFPCs)¹⁵³. Se observan en la **Figura 11**.

Estas células se nombran de acuerdo con su localización anatómica, y son caracterizadas mediante marcadores de superficie, por su habilidad para formar colonias y su función regenerativa dental. Investigaciones recientes indican que las células madre dentales pueden tener el potencial de generar hueso, ligamento periodontal y posiblemente dientes¹⁵⁴.

Encontramos células madre intrabucales en:

- Ligamento periodontal (PDLSCs).
- Folículo dental (DFSCs).
- Papila apical (SCAP).
- Tejido gingival (GMSC).
- Tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas (PL-MS).
- Lámina propia mucosa oral (OMLP-PCs).
- Médula ósea de mandíbula (OMSCs).
- Pulpa dental (DPSCs).
- Dientes deciduos (SHED)^{149,150,151,152,155,156}.

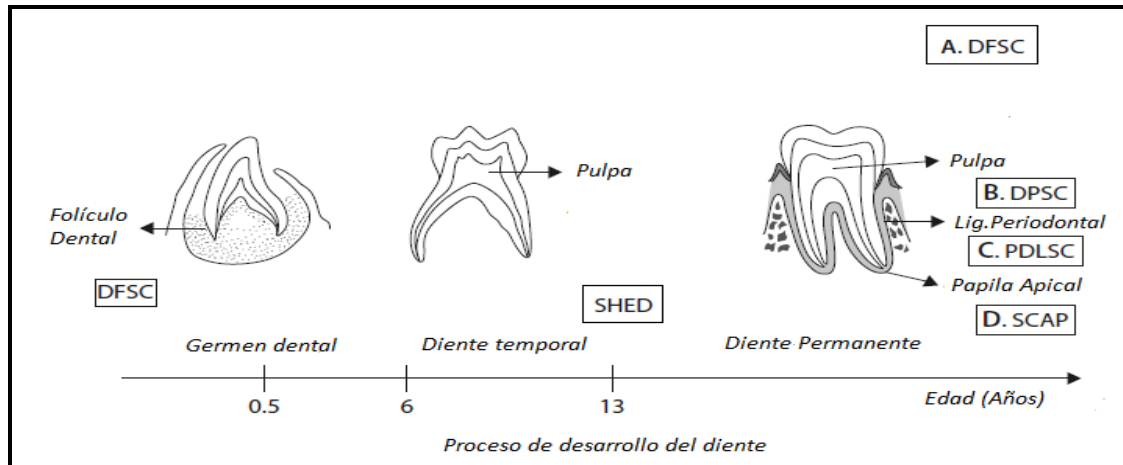


Figura 11. Etapas del desarrollo del diente y el origen de las células madre dentales¹⁵⁴.

Estas células presentan un inmunofenotipo de tipo mesenquimal. Revelaron un alto grado de expresión de los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105, mientras que resultaron negativos los antígenos CD45, CD34; CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA II. Este perfil cumple los criterios de la *International Society of Cellular Therapy*, para considerar una célula como de estirpe mesenquimal¹⁵⁷.

Leprince y cols. reportaron que este tipo de células expresan receptores para numerosos mediadores de la inflamación, que pueden aumentar o disminuir el reclutamiento, proliferación y/o diferenciación de las células madre pulpares. A su vez estas células poseen propiedades inmunosupresoras¹⁵⁸.

Según Huang y cols., las células madre dentales derivadas del ectomesénquima, pueden tener diferentes características similares a las de las células de la cresta neural¹⁵⁴.

1.5.3.1 Células madre procedente de la pulpa dental (DPSCs).

Gronthos y cols. aislaron e identificaron una población de células precursoras de la odontogénesis de tejido pulpar adulto. Estos autores describieron la identificación de las células madre de la pulpa dental (DPSCs) en virtud de sus habilidades clonogénicas, las tasas de

proliferación rápida y la capacidad para formar tejidos mineralizados tanto in vitro como in vivo¹⁴⁹.

El primer tipo de células madre dentales fue aislada a partir de la pulpa de terceros molares sanos exodonciados¹⁴⁹. Mostraron capacidad de diferenciación multipotente, expresaron marcadores indicativos de células madre, capacidad clonogénica y potencialidad para regenerar el complejo dentino-pulpar in vivo. Estas células residen en un microambiente perivascular específico donde mantienen sus características de células madre¹⁵⁴. Se observó que presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de la médula ósea¹⁵⁹.

Las DPSCs presentan los marcadores STRO-1, c-Kit y CD34, lo que representa que son capaces de diferenciarse en líneas celulares osteogénicas, adipogénicas y en linajes miogénicos. Además, la expresión de estos marcadores son indicativos de una población de células madre mesenquimales que tiene su origen en la cresta neural¹⁶⁰.

Tras dos años de criopreservación, las DPSCs mantienen su fenotipo e integridad celular, así como su capacidad para diferenciarse a pre-odontoblastos y para producir tejido óseo¹⁶¹.

Tras ser implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas fueron capaces de diferenciarse hacia odontoblastos y de formar el complejo dentino-pulpar¹⁴⁹. Este grupo de odontoblastos fue capaz de expresar sialofosfoproteína dentinaria, indicador de la producción dentinaria¹⁶². Además, combinadas con una matriz de colágeno y proteínas de la matriz de la dentina, las DPSCs fueron capaces de generar tejido pulpar en ratones inmunodeprimidos¹⁶³.

Presentan un aumento de la expresión del ARN de sialofosfoproteína de la dentina (DSPP) y de fosfoglicoproteína de la matriz extracelular, que son indicadores diferenciales de la progresión celular en el linaje odontoblástico¹⁶⁴.

No están claros los factores implicados en la diferenciación odontoblástica debido a la gran heterogeneidad de estas células^{162, 165,166, 167}.

La presencia de osteoblastos cultivados con DPSCs puede promover la diferenciación osteogénica y la proliferación de las células madre pulpare¹⁶⁸. *In vivo* se puede obtener una subpoblación de células con potencial osteogénico, odontoblastos derivados de células madre pulpare. Estos osteoblastos derivados de las células madre pulpare presentan ligeras diferencias con respecto a los odontoblastos primarios de origen óseo¹⁶⁹.

Presentan capacidad de diferenciación hacia subconjuntos endocrinos y exocrinos como son las células pancreáticas¹⁷⁰; también capacidad de diferenciación hepática, obteniendo células con igual morfología y funcionalidad¹⁷¹; capacidad de diferenciación en melanocitos y células de Schwann¹⁷² y son capaces de inducir angiogénesis y promover la migración celular endotelial, pudiendo ser útil para patologías correlacionadas con la angiogénesis inadecuada como el accidente cerebrovascular o infarto de miocardio¹⁷³; también son capaces de mostrar un fenotipo de mioblastos en cultivo tras seis semanas, con lo que tienen capacidad de formación de músculo¹⁷⁴.

Las DPSCs no solo se pueden obtener de dientes sanos, sino también de dientes con pulpitis irreversible¹⁷⁵. Las células aisladas del tejido pulpar normal y las aisladas del tejido pulpar inflamado forman una capa celular homogénea, células similares a fibroblastos, presentando una tasa de proliferación similar y los mismos tipos de líneas de diferenciación celular. Las DPSCs de pulpas inflamadas tienen alteradas algunas de las propiedades de células madre, aunque no se conocen los mecanismos de alteración, pero mantienen el potencial de regeneración de tejido¹⁷⁶. Aisladas del tejido pulpar inflamado, presentan una alta tasa de disfuncionalidad en términos de sus propiedades inmunomoduladoras. Tienen una capacidad para estimular respuestas

antiinflamatorias mínima. Esto reduce su relevancia, especialmente cuando se utiliza para enfermedad, injerto o posible trasplante de órganos¹⁷⁷.

Las células madres de pulpa obtenidas de dientes con afectación periodontal severa presentan una morfología relativamente similar a las de dientes sin afectación, pero la proliferación celular es menor. Aunque existen estudios que no obtuvieron diferencias en la diferenciación en la morfología, en el potencial de diferenciación, ni en la tasas de proliferación¹⁷⁸, existen otros en los que se encontró una disminución del potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y dentinogénico¹⁷⁹.

1.5.3.2 Células madre procedentes de dientes deciduos (SHED).

La regeneración de las estructuras dentales de forma individual es un objetivo más realista que la regeneración de un diente completo. El primer cultivo de células madre que procedían de la pulpa dental fueron denominadas células madre de la pulpa dental (DPSCs)¹⁴⁹. Un tiempo después, los dientes temporales exfoliados fueron identificados como una fuente importante de células madre postnatales (SHED). Fue la investigación llevada a cabo por Miura y cols. quienes probaron que la pulpa remanente de los dientes temporales exfoliados contienen una población de células madre multipotenciales. Estas células se pueden obtener a través de métodos no invasivos, de muy fácil acceso, presentan una disposición natural y presentan muy pocos problemas legales o éticos; siendo capaces de proporcionar suficientes células para la aplicación clínica potencial¹⁵⁰.

Las células madre de la pulpa a partir de dientes deciduos (SHED) presentan una mayor plasticidad que las de la pulpa de los dientes permanentes. Se diferencian de las DPSCs por su alto rango de proliferación, así como la habilidad de formar grupos denominadas “colonias celulares”. Presentan diferentes marcajes de superficie como son el CD13, CD29, CD44, CD56,

CD73, CD90, CD105, CD146 y CD16^{180,181}. Son capaces de diferenciarse hacia un linaje osteoblástico, adiposo y neural. Comparadas con las células madre de la médula ósea, muestran 30-50% de tasa de proliferación más alta y un incremento en la duplicación de la población¹⁵⁰.

Se observó la expresión de marcadores de mineralización y la formación de nódulos mineralizados, cuando estas células eran cultivadas en un medio inductivo que contenía ácido ascórbico, dexometasona y fosfato inorgánico^{149,150,151}. Después del trasplante *in vivo*, DPSCs y SHED son capaces de regenerar estructuras similares al complejo dentino-pulpar⁸⁰. En un experimento en el que se indujeron al linaje neural *in vitro*, tras trasplantar este tipo de células en ratones inmunodeprimidos fueron capaces de formar hueso, regenerar dentina y producir tejido pulpar, lo que sugiere que podrían ser un buen recurso para regeneración de hueso orofacial y tejido pulpar^{182,183}.

Además, en un estudio realizado con células alogénicas de dientes deciduos procedentes de minicerdos, se comprobó la capacidad de estas células para regenerar con eficacia la pérdida de tejido duro y tejido blando provocado por la periodontitis. En este estudio, los índices clínicos mostraron una restauración de salud periodontal significativa *in vivo*. La tomografía computarizada mostró que el 75% de las muestras tuvo éxito en la regeneración de tejido duro-blando y el examen clínico demostró una notable regeneración de los tejidos periodontales¹⁸⁴.

Otros estudios también realizados con cerdos demostraron que las SHED fueron capaces de regenerar satisfactoriamente defectos de hueso de mandíbula, producir tejido dentinario y restaurar los defectos del techo de la cámara pulpar^{185,186}. Estudios han demostrado que las SHED pueden reparar defectos óseos críticos a través de la formación de hueso¹⁸³. Aunque las SHED no pueden diferenciarse directamente en osteoblastos, pueden inducir la formación de nuevo hueso reclutando *in vivo* células osteogénicas. Este descubrimiento implica que los dientes deciduos no proveen únicamente una guía para la erupción del diente permanente como se asume

generalmente, sino que también están relacionados con la inducción de formación de hueso durante la erupción del diente permanente¹⁵⁰.

1.5.3.3 Células madre procedentes de la papila apical (SCAP).

La papila apical es un tejido blando que rodea el ápice en los dientes inmaduros con ápice abierto en desarrollo¹⁰⁴. Está localizada más apicalmente que la membrana del epitelio y existe una capa rica en células entre la pulpa y la papila apical. La diferencia que existe entre la pulpa dental y la papila apical es que ésta es el tejido precursor de la pulpa radicular¹⁸⁰.

Las SCAP fueron descritas por primera vez en 2008¹⁵². Son células clonogénicas, capaces de diferenciarse a odontoblastos, osteoblastos y adipocitos. Comparadas con las DPSCs y BMMSCs, las SCAP muestran un potencial de diferenciación osteo/dentinogénico similar y algo menor el adipogénico. Al igual que otras poblaciones de células madre, se caracterizan por su expresión de marcadores indicadores como STRO-1 y CD146¹⁴³. Existe un marcador específico, el CD24, que es expresado por las SCAP, no detectable en otras células madre mesenquimales, incluidas las DPSCs.

Pueden aislarse de terceros molares extraídos de pacientes jóvenes, obteniendo unas células postnatales de alta plasticidad para tratamientos regenerativos¹⁵².

Según algunos estudios las SCAP son la fuente de aportación de odontoblastos primarios, que se encargan de la formación de la dentina radicular, mientras que las DPSCs son las responsables del recambio de los odontoblastos en la fase reparativa de la dentina¹⁸⁷.

En un estudio llevado a cabo por Sonoyama y cols. encontraron que la papila apical radicular contenía células madre mesenquimales que parecían tener una mayor capacidad para

regenerar dentina que las DPSCs. Esta población celular expresó unos valores altos de survivin y telomerasa, que son dos moléculas mediadoras importantes en el proceso de proliferación celular¹⁵².

1.5.3.4 Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs).

El folículo dental es un saco de tejido conectivo derivado del ectomesénquima que rodea al germen del diente en desarrollo antes de la erupción. Las DFSCs, pueden ser fácilmente aisladas del folículo de terceros molares que todavía no han erupcionado¹⁵⁴.

El folículo dental desempeña un papel importante en la erupción dental, regulando la osteoclastogénesis y la osteogénesis¹⁴⁵. Tras la erupción del germen dental, el folículo dental se diferencia en células del periodonto, incluidos osteoblastos, fibroblastos y cementoblastos¹⁸⁸.

Las DFSCs se caracterizan por su rápida adhesión en los cultivos y por su expresión de marcadores indicadores de células madre como STRO-1, Notch-1 y Nestin¹⁵³. Además, cumplen los criterios para ser consideradas células madre de origen mesenquimal¹⁸⁹.

Muestran una proliferación más rápida comparada con las DPSCs, un mayor número de células que expresan el marcador STRO-1 y una capacidad de regenerar dentina *in vivo* aumentada. Esta capacidad puede ser una ventaja, pero también puede suponer un riesgo potencial de formación de tumores malignos^{143,161}.

Las DFSCs son capaces de diferenciarse hacia otras líneas celulares, como odontoblastos, y contribuir a la formación de dentina en presencia de la matriz dentinaria, también reparar ligamento periodontal *in vivo* y formar un tejido similar al cemento cuando se implantan en ratones inmunodeprimidos¹⁴⁸. Además tienen capacidad osteogénica, adipogénica y neurogénica,

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL

mientras que la capacidad condrogénica está en duda en los estudios llevados a cabo actualmente. Pueden criopreservarse durante muchos años manteniendo la expresión de los marcadores de células madre^{189,190,191}.

2-Justificación.

La conservación de los dientes temporales hasta su periodo de exfoliación natural, es esencial para mantener la integridad de la arcada dentaria y prevenir problemas estéticos y funcionales¹.

El principal objetivo de la terapia pulpar, según la Academia Americana de Odontopediatría, es mantener la integridad y la salud de los dientes afectados por caries o trauma y sus tejidos de soporte⁶.

La pulpotomía es el tratamiento más aceptado para aquellos dientes temporales asintomáticos, que presentan exposición pulpar por caries. Su éxito se basa en la capacidad de reparación del tejido pulpar radicular una vez que el tejido pulpar coronal infectado o afectado, ha sido amputado^{5,6,27}.

Desde que Buckley introdujera la técnica de pulpotomía al formocresol, en 1904, se han obtenido unas altas tasas de éxito clínico y radiográfico. Sin embargo, diferentes estudios han mostrado su potencial tóxico, carcinogénico y mutagénico, así como su capacidad de distribución a nivel sistémico^{33,34,39}.

A lo largo de los años se ha intentado buscar un sustituto adecuado para el formocresol, que mantenga los criterios de éxito mencionados y evite los efectos adversos. Entre estos materiales se encuentran: el glutaraldehído, el hipoclorito de sodio, el sulfato férrico, el láser, la electrocirugía y más recientemente, materiales más biocompatibles, como el MTA, el Biodentine™ y el Theracal LC⁴³.

Desde la aparición del MTA, y su aplicación en el campo de la odontopediatría, han surgido distintos materiales basados en silicatos de calcio con el fin de mejorar las propiedades y

ampliar las aplicaciones clínicas del mismo. El Biodentine™ es un material altamente biocompatible como el MTA, que se ha visto que presenta propiedades mecánicas superiores y tiene la ventaja de no teñir el diente tras su aplicación^{12,130}. El Theracal LC es un nuevo material basado en silicato de calcio modificado con resina, que mejora los tiempos de fraguado y es fotopolimerizable con lo que facilita su aplicación clínica¹³¹.

La rápida evolución en este ámbito requiere una constante investigación aplicada para establecer las posibilidades, limitaciones e indicaciones de estos materiales: estudios clínicos, análisis de propiedades físico-mecánicas y, por supuesto, estudios de orden biológico, como, por ejemplo, los estudios de biocompatibilidad.

Con la presente investigación se pretende aportar conocimiento sobre éste último aspecto, para ello se evaluará la citotoxicidad de cuatro materiales, tres de ellos en base a biosilicatos (MTA, Biodentine™ y Theracal LC) y uno de obturación provisional (IRM™), utilizados para el tratamiento de pulpotomías en dentición temporal, sobre células madre procedentes de dientes decíduos (SHED).

3-Objetivos.

3.1 Objetivo General.

Evaluar la citotoxicidad de tres materiales en base a biosilicatos y uno de obturación provisional, utilizados para realizar pulpotomías en dentición temporal, sobre células madre de dientes decíduos (SHED).

3.2 Objetivos específicos.

3.2.1 Evaluar la viabilidad celular de SHED en presencia de extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.

3.2.2 Establecer los niveles de apoptosis celular en presencia de los extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.

3.2.3 Describir la capacidad de migración en presencia de los extractos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.

3.2.4 Evaluar la morfología celular sobre los discos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.

3.2.5 Evaluar la capacidad de mineralización y/o formación de depósitos cálcicos de las SHED en presencia de discos de MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC e IRM™.

4-Material y métodos.

4.1 Tipo y población de estudio.

Se realizó un estudio experimental in vitro de citotoxicidad según ISO 10993-5, de tipo comparativo entre diferentes materiales utilizados para pulpotomías en dentición temporal. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

4.1.1 Selección y tamaño de la muestra.

Las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de Cirugía Oral y Maxilofacial del citado hospital. Se extrajeron dientes deciduos por indicación ortodóncica, sin afectación pulpar (n=8 de niños de entre 6 y 9 años de edad). Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos. Los padres/tutores de los donantes firmaron un consentimiento informado que se presenta en el **Anexo 1**.

4.1.1.1 Criterios de inclusión/exclusión.

Los criterios de inclusión fueron:

- Dientes temporales vitales y asintomáticos sin afectación pulpar.
- Ausencias de evidencias clínicas y radiográficas que indicaran una posible degeneración pulpar, como reabsorción interna/externa u osteítis interradicular en la zona de la furca.

Los criterios de exclusión fueron:

- Presencia de signos o síntomas de afectación pulpar del diente temporal.

4.2 Materiales.

Los materiales utilizados para este estudio fueron, **óxido de zinc eugenol** (IRM™, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemania), **MTA Angelus™** (Angelus, Industria de Productos

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL

Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brazil), **Biodentine™** (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Creteil, France) y **Theracal LC** (Bisco Inc, Schamburg, IL, USA), como se puede apreciar en la **Tabla**

1.

Material	Presentación		Componentes
Óxido de cinc eugenol	Polvo-líquido	Dentsply, Konstanz, Alemania	<u>Polvo:</u> Óxido de zinc, polimetilmetacrilato. <u>Líquido:</u> Eugenol.
MTA Angelus™	Polvo-líquido	Angelus, Brasil.	<u>Polvo:</u> Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, aluminato tricálcico, sulfato de calcio, óxido de calcio. <u>Líquido:</u> Agua destilada.
Biodentine™	Polvo-líquido	Saint Maur des Faussés, France	<u>Polvo:</u> Silicato tricálcico, óxido de calcio, carbonato cálcico, óxido de zirconio, óxido de hierro (trazas). <u>Líquido:</u> Agua, cloruro cálcico, polímero hidrosoluble.
Theracal LC	Jeringa premezclada	Bisco, Inc Schaumburg, IL .USA	Cemento Portland tipo III, HEMA, Dimetacrilato polietilenglicol, zirconato de bario.

Tabla 1. Presentación y composición de los materiales utilizados.

4.3 Metodología.

4.3.1 Obtención de las células madre de los dientes temporales.

4.3.1.1 Aislamiento celular.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos (FALCON) con medio de cultivo celular, que consta de: Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, SIGMA), una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C hasta poder ser procesadas.

4.3.1.2 Extracción de la pulpa dental humana (hDP).

Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar):

- Los dientes recogidos se colocaron en una placa de Petri que contenía PBS estéril (tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4) y una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina; SIGMA).
- Para obtener la pulpa dental el diente se seccionó transversalmente y con la ayuda de limas manuales y tiranervios se obtuvo el tejido pulpar.
- La pulpa dental (junto con el PBS) se traspasó por separado a un tubo (Falcon) donde se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

4.3.1.2.1 Disgregación enzimática.

1. El precipitado celular se sometió a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: colagenasa tipo I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37°C. (**Figura 12**)

2. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular DMEM muy frío.
3. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
4. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular DMEM con anfotericina (250 unidades/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. (**Figura 13**)
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular DMEM con anfotericina (250 unidades/ml).

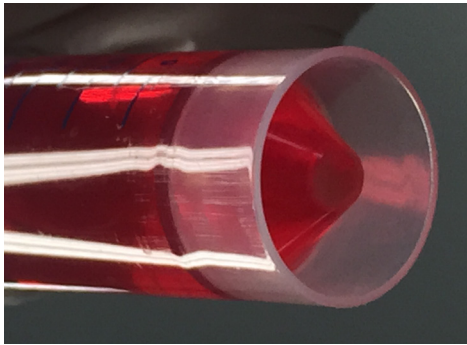


Figura 12. Precipitado celular.



Figura 13. Centrifugadora.

4.3.1.2.2 Disgregación mecánica.

1. Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μm (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo DMEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular DMEM.

4.3.1.3 Recuento y estimación de la viabilidad celular.

Antes de cultivar las células obtenidas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer o hemocitómetro y azul tripán. Este método se basa en el principio de que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permite la entrada del colorante (azul tripán), permaneciendo refringentes.

Mientras que las células muertas (no viables), debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota, permiten el paso de colorante, tiñéndolas de azul. La sistemática que se llevó a cabo se describe a continuación.

La suspensión celular se agitó y se depositaron 10 μ l de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadió 10 μ l de la solución de azul tripán a la muestra anterior, agitándose la mezcla con la misma micropipeta y procurando no hacer burbujas. Se pegó el cubrecámara en el hemocitómetro humedeciendo los bordes del mismo, y se llenó con la mezcla anterior la cámara de aire que existe entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (0,1 mm³), por uno de los lados del mismo. Contamos en el microscopio de contraste de fase las células teñidas y no teñidas en una de las regiones de la cámara como se observa en la **Figura 14**.

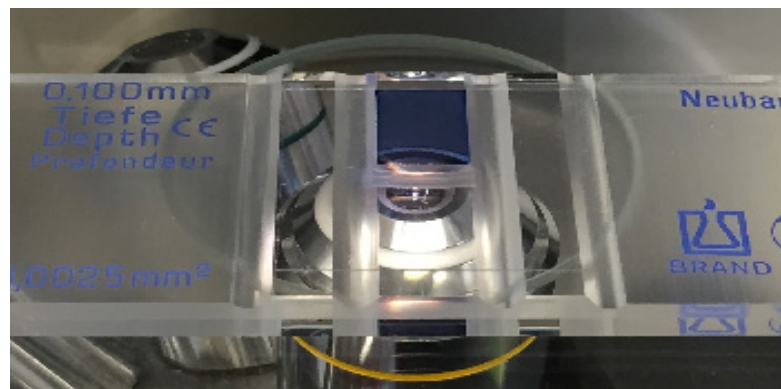


Figura 14. Cámara de Neubauer con azul tripán.

Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos (**Figura 15**). Se calculó el número de células totales y viables de la muestra según las siguientes fórmulas:

- N^o células viables/ml = n^o células vivas contadas x 10000 x factor de dilución.
- N^o células totales/ml = (n^o células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.

➤
$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células viables} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ células totales}}$$

Se multiplica el número de células por 10000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de $0,1 \text{ mm}^3$.

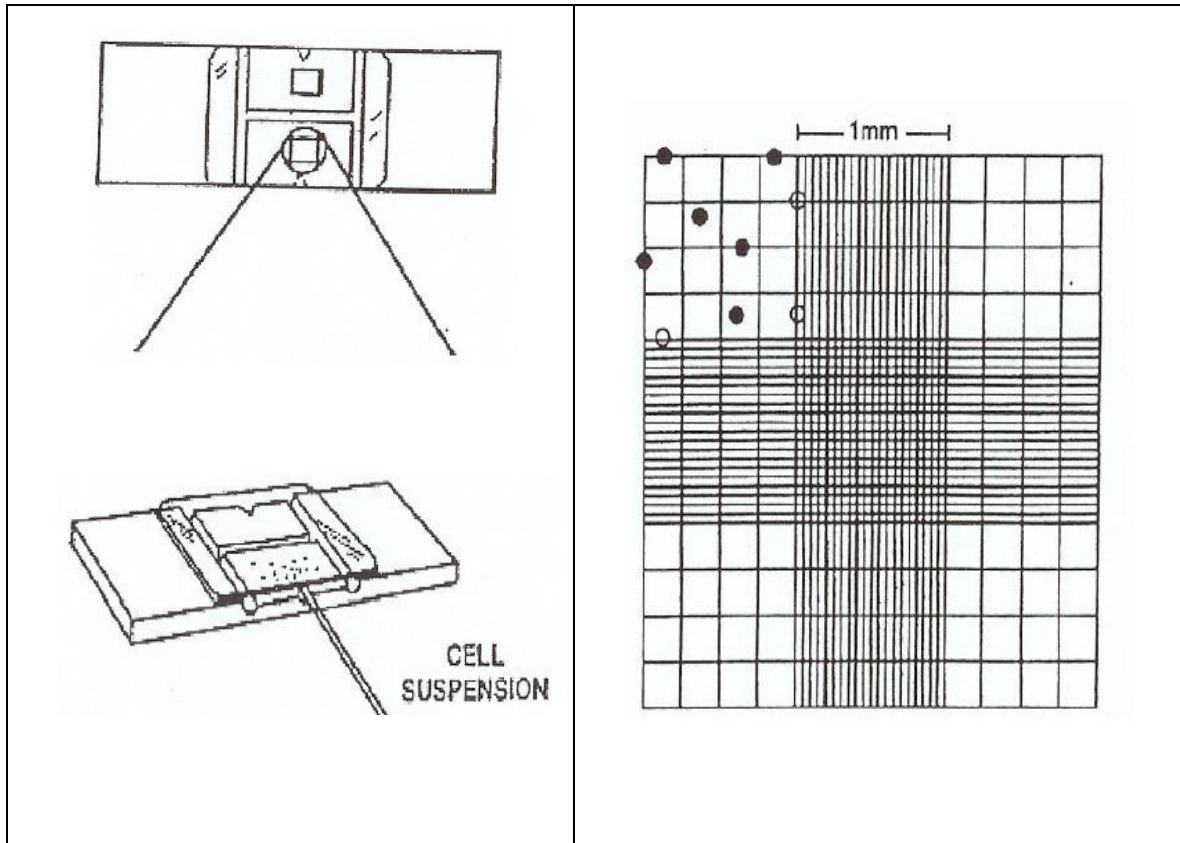


Figura 15. Recuento con cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1×10^5 células/ml y se sembró 3 ml de la misma por frasco de cultivo de 25 cm^2 (Sarstedt). Las células se cultivaron a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad.

4.3.1.4 Cultivo de células de pulpa dental de dientes deciduos (SHED).

Las células aisladas de la pulpa dental crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de las SHED, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que fue denominado medio basal (MB). El medio basal está compuesto por α -MEM al que se le añadirán los siguientes componentes que se presentan en la **Tabla 2**:

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
SBF (Gibco)	15%
P/E (Sigma)	100 µg/ml
Glutamina (Sigma)	2 mmol/l
Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma)	100 µg/ml
Anfotericina (Sigma)	2,5 µg/ml

Tabla 2. Componentes que se añaden al α -MEM

Con el objetivo de conseguir un número de células suficientes para llevar a cabo la investigación semanalmente, cuando las células estaban cerca de llegar al estadio de confluencia, ocupando aproximadamente el 85% de la base del frasco de cultivo, se realizó el siguiente proceso:

- Se retiró el medio de cultivo del frasco que contenían las células, se añadió Tripsina 0,25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubó en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 5 minutos.
- Posteriormente, se procedió a la neutralización de la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo frío. La mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo basal. Tras estimar la viabilidad, se ajustó el número de células de la suspensión anterior, normalmente a 1×10^5 células/ml, y fueron sembradas en un frasco de cultivos de mayor superficie que el anterior. Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal se cambió con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.

4.3.2 Ensayo experimental.

4.3.2.1 Caracterización o identificación celular.

El fenotipo de las células SHED se analizó mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para CD90 (dilución 1:250) (BD Biosciences, Pharmingen, San José, CA, USA), CD73 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) and CD105 (1:100) (Abcam, Cambridge, UK). Después de tres lavados con PBS, las células fueron incubadas en la oscuridad durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-anticuerpo de ratón Alexa Fluor® 488 (1:500) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Los portas de microscopio se montaron con una solución anti-desvanecimiento (Vecta shield mounting medium, Vector Laboratories, Hercules, CA, USA) que contiene 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (sonda molecular fluorescente, 0,2 mg/mL in PBS) y examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 4000B, Wetzlar, Germany).

4.3.2.2 Preparación de los extractos.

Para realizar el estudio se pretendió simular las condiciones en que los distintos materiales iban a interactuar con el tejido pulpar de los dientes temporales. Puesto que son materiales destinados a fraguar dentro de la cámara pulpar, se eligió el método de elución, en el que se extrae una sustancia por elución, que llamaremos extracto o eluato, mediante un disolvente que entra en contacto con el material, que llamamos eluente.

El eluente es el medio de cultivo que se incuba durante 24 horas con el material de estudio, y el extracto resultante se aplicó en distintas concentraciones sobre las células.

En el ensayo se aplicó cada concentración de eluente a tres pocillos diferentes, y tres semanas más tarde se repitió todo el ensayo, por lo que se hizo por sextuplicado. Además de las diluciones, se empleó un control negativo (medio de cultivo), y un blanco (medio de cultivo sin células, para contrarrestar la contaminación colorimétrica del propio medio de cultivo).

La preparación de los extractos de los distintos materiales se realizó siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para test de citotoxicidad in vitro¹⁷⁰. Para ello, se mezclaron los materiales y se prepararon según las instrucciones del fabricante en condiciones de esterilidad. Una vez mezclados, se colocaron fragmentos de los materiales de 2-3 mm de alto y 35 mm de diámetro en placas estériles de 6 mm de alto y 35 mm de diámetro y se dejaron fraguar en una cámara de humedad (según el material) a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez fraguados todos los materiales, se cubrieron con medio de cultivo, (DMEM; Sigma-Aldrich, Madrid, España), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland), L-glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Austria), penicilina /estreptomicina (PAA Laboratories) en una relación de 3 cm² de material en la placa por cada mililitro de medio de cultivo según la norma ISO 10993-5, y se dejaron 24 horas en la incubadora de CO₂, a 37°C y humedad relativa del 95%.

Posteriormente, se recogió con una jeringa estéril el medio de cultivo que se había incubado con los materiales de estudio y se filtró para eliminar residuos, con un filtro para tamaño de partícula 0,22 µm (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.) y con capacidad para un volumen de 1-10 ml de volumen filtrado. A partir de aquí se obtuvo un resultante, que será la concentración total, a partir de la cual se prepararán las diluciones 1/2 y 1/4.

4.3.2.3 Ensayo de viabilidad celular MTT.

La tasa de viabilidad celular en presencia de las diferentes eluciones de los materiales se evalúa utilizando un ensayo MTT (MTT Cell Growth Kit, Chemicon, Rosemont, EE.UU.). Con esta técnica se quiere evidenciar la proliferación de las SHED en presencia del extracto sin diluir y con las diluciones 1/2 y 1/4. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa sobre el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT). Como resultado se genera formazán, un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo.

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

- a) Se sembraron SHED en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo (1×10^3).
- b) Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se aplicaron 100 µl/pocillo de diluciones 1:1, 1:2, 1:4, y se incubaron a 24, 48 y 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.
- c) Transcurrido el tiempo de incubación (24h, 48 ó 72 horas), se sustituyó el DMEM con rojo fenol por 400 µl de DMEM sin rojo fenol.
- d) El reactivo MTT se añadió a cada uno de los pocillos para quedar a una concentración final de 3,8 mg/ml y se incubó a 37°C y un 5% de CO₂ durante 4 horas. (**Figura 16**)
- e) Tras la incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadió 400 µl de DMSO por pocillo.

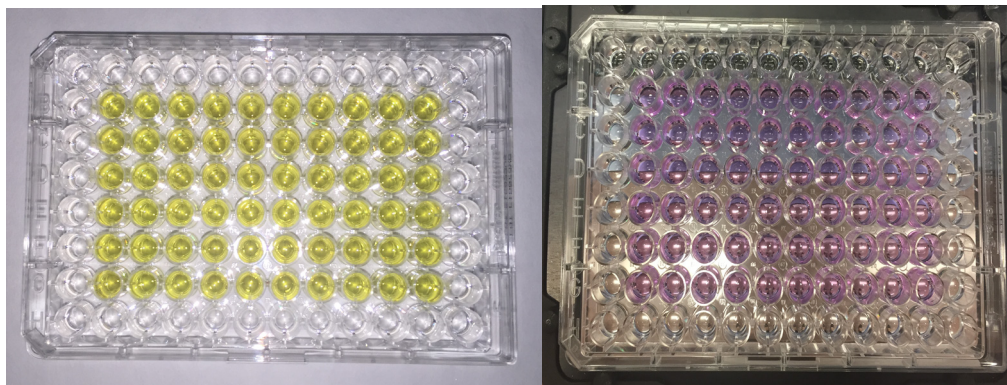


Figura 16. Formación de los cristales de formazan, tras 4 horas de incubación.

- f) Se trasvasaron 200 µl del contenido de cada pocillo a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 570 nm con medida de referencia a 620 nm utilizando un lector de microplacas automático (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, EE.UU.).

Análisis de la expresión de los marcadores de superficie de células madre mesenquimales sobre las SHED expuestas a los materiales de pulpotomía.

La expresión de los marcadores de superficie de las células madre mesenquimales se analizaron en los cultivos de SHED por medio de la citometría de flujo. Las células fueron sembradas a una densidad de 3×10^4 cel/cm² en 48 placas y tratadas con los diferentes eluatos durante 72 días a 37°C. Posteriormente, las células fueron despegadas usando una solución tripsina/ EDTA al 0,25%, lavadas dos veces con PBS e incubadas en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorescencia para CD73, CD90 y CD105 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), como recomienda la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células¹³⁹. También se analizó la falta de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45. La fluorescencia no específica se midió utilizando anticuerpos monoclonales de isotipo específico. La fluorescencia celular se realizó usando un citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, USA) y analizadas mediante el análisis de software Kaluza (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA).

4.3.2.4 Ensayo de apoptosis celular.

En la fase temprana de la apoptosis, la integridad de la membrana celular se mantiene, pero se pierde la simetría de la membrana citoplasmática. Las anexinas son un grupo de proteínas calcio dependientes unidas a fosfolípidos. Estas se utilizan junto con tinciones vitales para identificar, mediante citometría de flujo, diferentes estados apoptóticos. Dentro de ellas, la Anexina-V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidil serina (PS), los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática celular.

La PS es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y cuando ésta entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición

de la misma hacia el exterior de la membrana celular, pudiendo ser detectada mediante Anexina-V conjugada con ficoeritrina (PE).

Cuando el proceso de apoptosis progresa la integridad de la membrana celular se pierde, el ADN se hace accesible y se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena (y, por tanto, en el ADN) como el Yoduro de Propidio (PI) y la 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

Se sembraron SHED en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo (1×10^3). Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se aplicaron 100 µl/ pocillo de diluciones 1:1, 1:2, 1:4, y se incubaron a 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Las SHED fueron sometidas a una tinción doble con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD mediante el kit de detección de apoptosis (BD Biosciences™) con el fin de determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Las células se separaron de la superficie de cultivo empleando una solución de tripsina-EDTA al 0,25%.
- Se lavaron con PBS 1X.
- Se incubaron con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD en tampón de unión a temperatura ambiente durante 15 minutos.

El análisis de los resultados se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto™, interpretándolos del siguiente modo:

- Células vivas: Anexina-V/7-AAD⁻.

- Células en apoptosis temprana o tardía: Anexina-V⁺/7-AAD⁻.
- Células necróticas: Anexina-V⁺/7-AAD⁺.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.3.2.5 Ensayo de migración celular.

Para este ensayo, cultivamos SHED a una densidad adecuada (5×10^5) en placas de 6 pocillos hasta que alcancen la confluencia en presencia de eluatos. En ese momento, trazamos una línea utilizando una punta estéril de 200 μ l de pipeta, creando una herida en el campo de visión al microscopio, dando lugar a una zona despejada de células. Cambiamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas y administramos las diluciones por triplicado.

Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como referencia la marca realizada en el exterior del pocillo con rotulador permanente, utilizándola como guía de la línea que hemos trazado anteriormente. Las imágenes se tomaron a las 0, a las 24 y a las 48 horas de tratamiento, utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Tokio, Japón).

Las imágenes obtenidas se corrigieron con Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems, McLean, VA, EE.UU.), mientras que se utilizó el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.) para medir la superficie cubierta por las células.

Se determinó la distancia entre los frentes de migración a las 0,24 y 48 horas.

4.3.2.6 Estudio microscópico de la morfología celular.

Se utilizó la microscopía electrónica de barrido (MEB) para analizar la morfología celular en cada material.

Se prepararon quince discos de cada material y se subdividieron en 3 grupos, de 5 muestras cada uno. Para eliminar posibles subproductos tóxicos, todos los discos se incubaron primero a 37°C en placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 1 ml de agua destilada, que se cambiaron al día durante 5 días. Después, las SHED se sembraron directamente sobre cada disco a una densidad de 5×10^4 células/ml.

Después de 4 días de cultivo, las muestras sembradas con SHED fueron retiradas de los pocillos de cultivo, se enjuagaron con PBS y se fijaron con 3% de glutaraldehído en 0,1 M tampón de cacodilato de 1,5 h a 4°C. Luego se aclararon de nuevo y después fueron fijados en tetróxido de osmio durante 1 hora, antes de ser deshidratados en una serie de soluciones de etanol graduadas (30, 50, 70, 90% vol/vol). El secado final se realizó por el método de punto crítico (CPDO2 Balzers Union). Finalmente, las muestras metalizadas con oro fueron examinadas por MEB.

4.3.2.7 Análisis del depósito de calcio en la matriz.

Para este estudio se prepararon discos similares en cuanto a dimensión que en el estudio con microscopia electrónica de barrido y se sembraron 1×10^4 células en placas de 12 pocillos, en presencia de estos discos.

Se estudió la producción de calcio en la matriz en los grupos experimentales y de control, a los 7, 14 y 21 días de tratamiento mediante una tinción de Alizarin red, un colorante derivado de la antraquinona que se une a las sales de calcio y que se utiliza para determinar la presencia de los depósitos de calcio que contienen los osteocitos de un cultivo diferenciado de MSCs, tanto de humanos como de roedores. Se fijaron las células con metanol durante 5 minutos a -20°C y se lavaron con agua ultrapura. Posteriormente se tiñeron con una solución de Alizarin red al 2% (Sigma AB, Malmö, Sweden) durante 30 minutos y se lavaron tres veces con agua ultrapura. Dejamos una capa de agua para evitar que se reseque la muestra y

tomamos fotos con una cámara acoplada a un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Tokio, Japón).

Para cuantificar el nivel de tinción se añadió 1 ml de cloruro de cetilpiridinio (CPC) (Sigma AB, Malmö, Sweden), al 10%, a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos para disolver los depósitos que estaban teñidos. La absorbancia de la tinción eluída fue leída a 550 nm usando un espectrofotómetro, y se elaboró una curva estándar usando tinción de Alizarin red y CPC.

4.4 Análisis estadístico.

Los datos procedentes del ensayo MTT, del ensayo de migración celular y del de cuantificación de la tinción Alizarin red, se analizaron usando el paquete de software estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Se evaluaron los datos por distribución normal usando el test de Kolmogorov-Smirnov, y las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de Bonferroni. Todos los valores fueron presentados como media \pm desviación estándar (DS). Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo.

5-Resultados.

5.1 Obtención de las células madre de dientes temporales exfoliados (SHED).

5.1.1 Aislamiento y caracterización de las SHED.

La presencia de células madre procedentes de la pulpa dental remanente de dientes temporales que habían sido exfoliados, fue confirmada y caracterizada utilizando anticuerpos específicos para los siguientes marcadores de superficie: CD73, CD90 y CD105. Más del 95% presentaron resultados positivos para estos marcadores como se puede observar en la **Figura 17**.

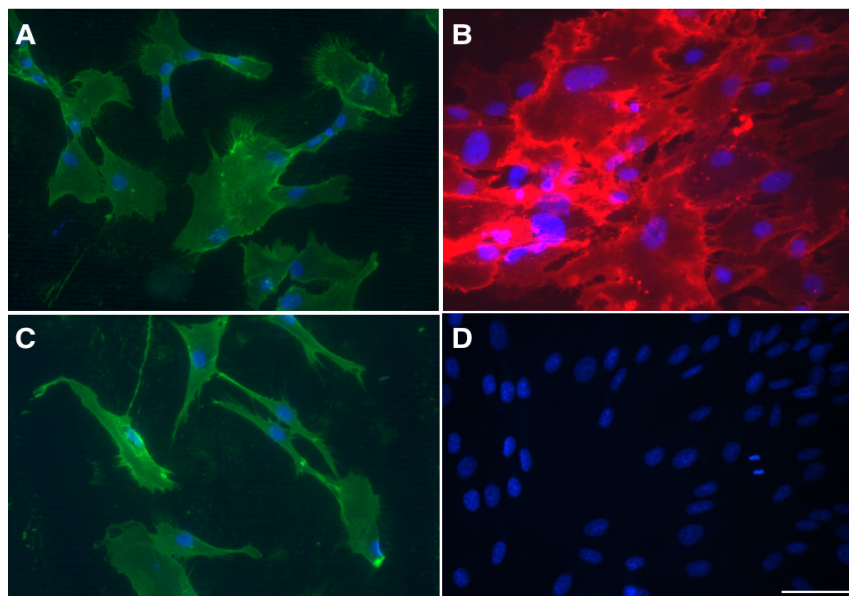


Figura 17. Imágenes de inmunofluorescencia de SHED teñidas, usando CD73 (A), CD90 (B), CD105 (C) y un control negativo (D).

5.2 Ensayo experimental.

5.2.1 Ensayo de proliferación celular MTT.

Se midió la proliferación celular de las células madre de los dientes temporales SHED, tras la exposición a diferentes diluciones de los materiales para pulpotomías estudiados (sin diluir; dilución 1:2, dilución 1:4), a las 24, 48 y 72 horas de incubación como se observa en las **Gráficos 1, 2 y 3**.

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL

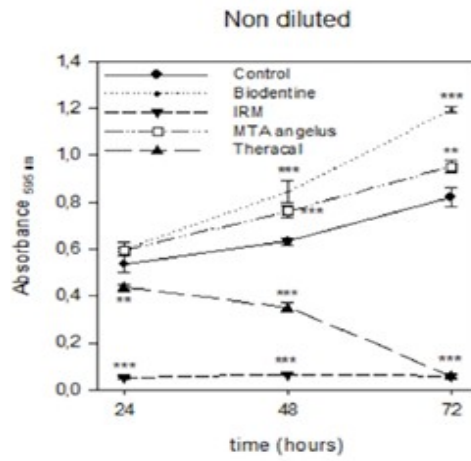


Gráfico 1. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir.

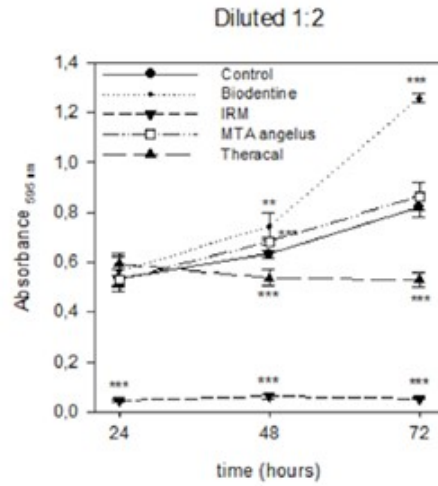


Gráfico 2. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:2.

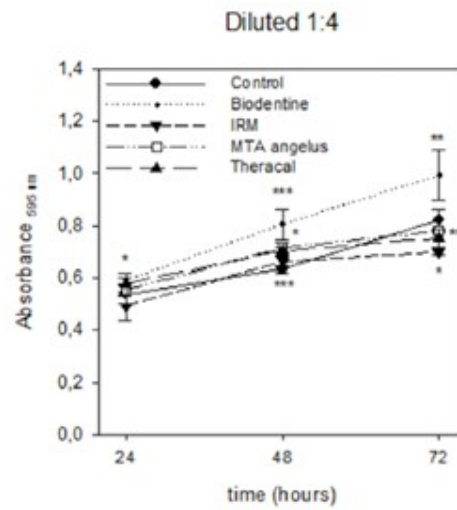


Gráfico 3. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4.

Las células incubadas en presencia del eluato del IRM™ para las diluciones (1:1 o 1:2<1:4), mostraron una reducción significativa de la tasa de crecimiento celular ($p<0.001$) en todos los tiempos evaluados, en comparación con lo observado en el grupo control.

En presencia del eluato del Theracal LC, para las diluciones (sin dilución y 1:2) la proliferación celular fue casi completamente inhibida y fue significativamente menor que la tasa obtenida en el grupo control para todos los tiempos del experimento ($p<0.001$).

Sin embargo, MTA Angelus™ mostró unas tasas de proliferación celular significativamente mayores que el grupo control desde las 48 horas en adelante ($p<0.01$), en las tres diluciones (sin diluir, 1:2, 1:4).

Asimismo, para Biodentine™ a las 48 y 72 horas se halló una proliferación significativamente mayor que la del grupo control ($p<0.001$), en las tres diluciones estudiadas.

A modo de resumen podemos decir que Biodentine™, particularmente, induce la proliferación de las SHED y presenta una tasa de proliferación celular significativamente mayor que el MTA Angelus™ desde las 48 horas de incubación en adelante ($p<0.01$) y superior a la del grupo control en todas las diluciones. En tercer lugar se posicionó el Theracal LC, apreciándose que a concentraciones más bajas, permitía mayor proliferación celular. Y por último, el IRM™ que fue el material que menor proliferación celular indujo en todos los tiempos y diluciones.

5.2.2 Análisis del fenotipo mesenquimal y apoptosis/necrosis.

5.2.2.1 Análisis del fenotipo.

Realizamos un análisis mediante citometría de flujo para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células madre SHED, aisladas de un cultivo de pulpa dental de dientes

temporales, y para determinar posibles cambios fenotípicos, tras el cultivo con los eluatos de los diferentes materiales utilizados para pulpotomías en dentición temporal a las 72 horas.

Más del 95% de las células SHED, presentaron resultados positivos de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105, mientras que sólo un 5% presentaron resultados positivos de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45 como se puede observar en la

Figura 18.

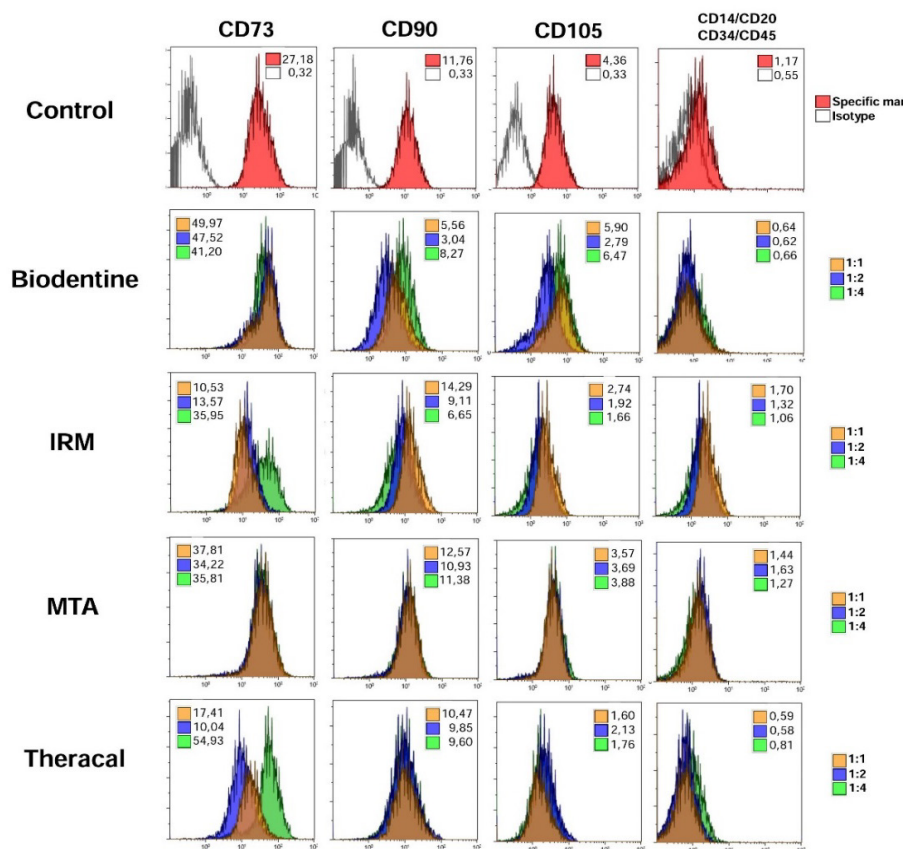


Figura 18. Expresión de marcadores específicos mediante citometría de flujo.

Un aspecto importante es el hecho de que tras la incubación de las SHED con las diferentes diluciones de los extractos eluidos (sin dilución, 1:1, 1:2, y 1:4), el porcentaje de resultados positivos de los marcadores mesenquimales no presentó cambios significativos frente al grupo de SHED no tratadas (control).

5.2.2.2 Análisis apoptosis/necrosis.

Las SHED se cultivaron sobre eluatos de Biodentine™, MTA Angelus™, Theracal LC, IRM™ y plástico (control) durante un periodo de 72 horas. Transcurrido éste tiempo, las células fueron marcadas con Anexina-V y 7-AAD y analizadas mediante citometría de flujo.

Se representó mediante diagrama de puntos bidimensional, la distribución de las células vivas (Anexina-V⁻/7-AAD⁻), células en apoptosis temprana (Anexina-V⁺/7-AAD⁻) y células en apoptosis tardía y necróticas (Anexina-V⁺/7-AAD⁺ y Anexina-V⁻/7-AAD⁺) en SHED no tratadas, o en las expuestas a las diferentes diluciones de los eluatos de los agentes para pulpotomías estudiados, como se observa en la **Figura 19**.

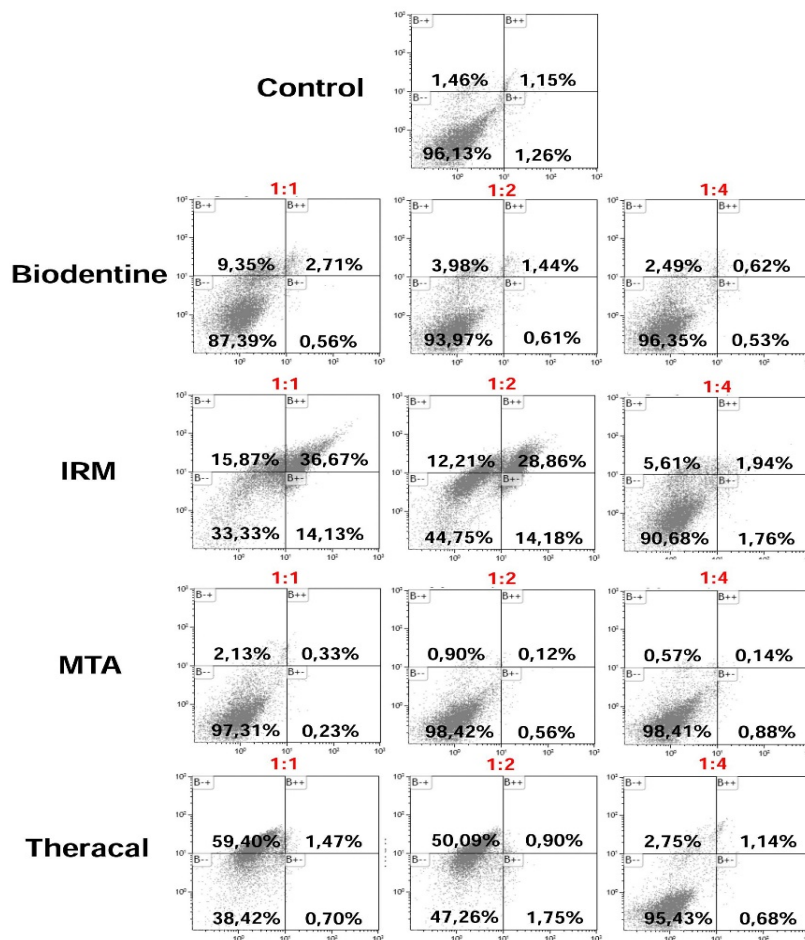


Figura 19. Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necróticas.

Los extractos sin diluir de Biodentine™ y MTA Angelus™ permiten la viabilidad celular de más del 87% y del 97% de las células, respectivamente, tras 72 horas. En la dilución 1:4 aumentaron los valores de viabilidad celular a un 96% y 98% respectivamente.

Por el contrario, Theracal LC e IRM™ muestran una disminución significativa de la viabilidad celular cuando usamos los eluatos más concentrados (sin dilución) siendo inferior al 39% y en la dilución 1:2 inferior al 47%. Este efecto citotóxico se pierde cuando empleamos los eluatos más diluidos (1:4), obteniendo unos valores de viabilidad celular del 95% para el Theracal LC y del 90% para IRM™.

5.2.3 Ensayo de migración celular.

Para evaluar si los diferentes materiales utilizados para pulpotomías en dentición temporal podían influenciar el proceso de migración celular, se utilizó un modelo de curación de herida (wound healing). Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa de células a la que previamente se le ha hecho una “herida”, área libre de células. Las células en el borde de la “herida” se moverán hacia la abertura, pudiendo evaluar la migración celular que se produce en presencia o ausencia de los extractos de los materiales de pulpotomía empleados.

En el grupo control se observa, que a medida que aumenta el tiempo de cultivo, se produce una mayor migración celular, produciéndose el 50% del cierre de la herida a las 24h y el cierre completo a las 48 horas.

El tratamiento con diferentes diluciones del eluato del Biodentine™ a las 24 horas induce una tasa de migración celular, algo menor, pero todavía significativa ($p < 0.001$) que la del grupo control. Mientras que a las 48 horas se produjo el cierre completo en las diluciones (sin dilución y 1:2).

Los extractos del MTA Angelus™ a las 24 horas en la dilución 1:1 presentaron resultados similares que el grupo control y el grupo Biodentine™. Mientras, en las diluciones 1:2 y 1:4 la tasa de migración celular del MTA Angelus™ fue menor que en el grupo control y en el grupo Biodentine™. Tras 48 horas de tratamiento, ambos materiales promovieron significativamente el cierre de la herida, siendo estos resultados comparables con los observados en el grupo control ($p < 0.001$).

El tratamiento con la dilución 1:1 de los eluatos del IRM™ y del Theracal LC a las 24 horas, presentaron los menores valores de migración celular con respecto al resto de los grupos. Tras 48 horas de incubación con IRM™ y Theracal LC (sin dilución, 1:2 y 1:4), la migración celular fue significativamente menor que en el grupo control ($p < 0.001$). (**Figura 20**)

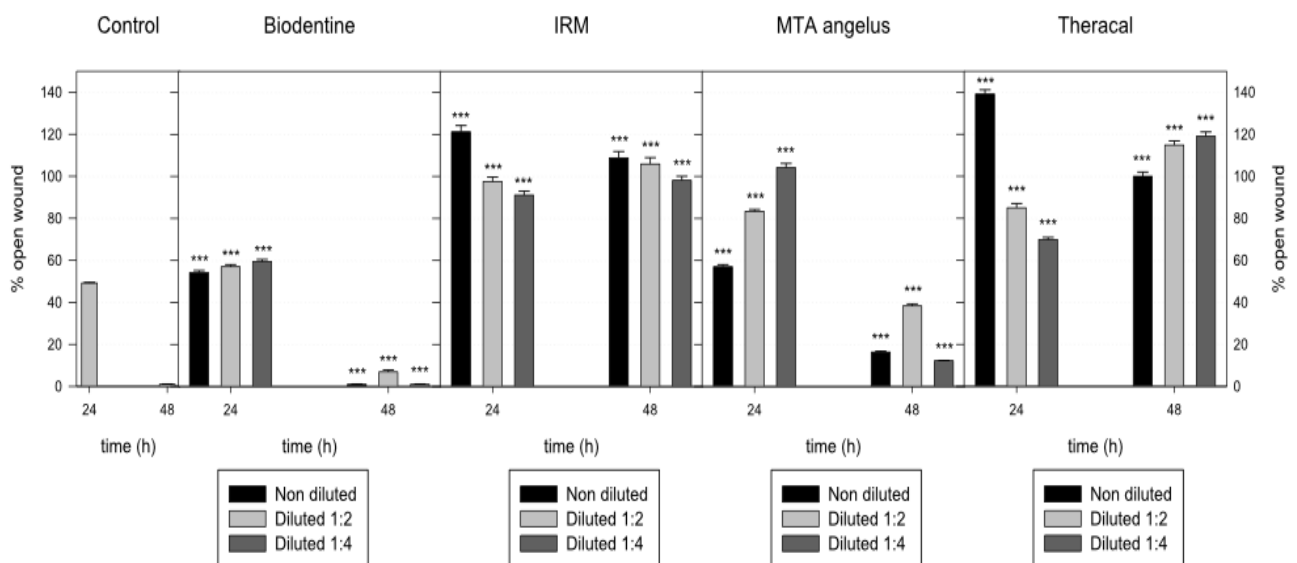


Figura 20. Porcentaje de migración celular a las 24 y 48 horas para cada uno de los grupos en comparación con el grupo control. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

5.2.4 Fijación de las SHED sobre los discos de materiales de pulpotomía.

La morfología y adhesión de las SHED sobre la superficie de los discos de Biodentine™, MTA Angelus™, Theracal LC e IRM™ tras un cultivo de 72 horas se muestran en la **Figura 21**.

El análisis mediante SEM muestra un mayor crecimiento y extensión celular sobre el Biodentine™ y el MTA Angelus™ (*Figura 21 A y B respectivamente*) comparado con lo observado sobre Theracal LC o IRM™ (*Figura 21 C y D respectivamente*). Se formaron un mayor número de estructuras celulares monocapa sobre la superficie del Biodentine™ y MTA Angelus™, sugiriendo que estos materiales poseen una buena microestructura porosa que permite una mayor fijación celular. Sin embargo, la fijación celular sobre los discos de IRM™ y Theracal LC fue limitada, mostrando sólo unas pocas células redondas sobre la superficie de los discos de material.

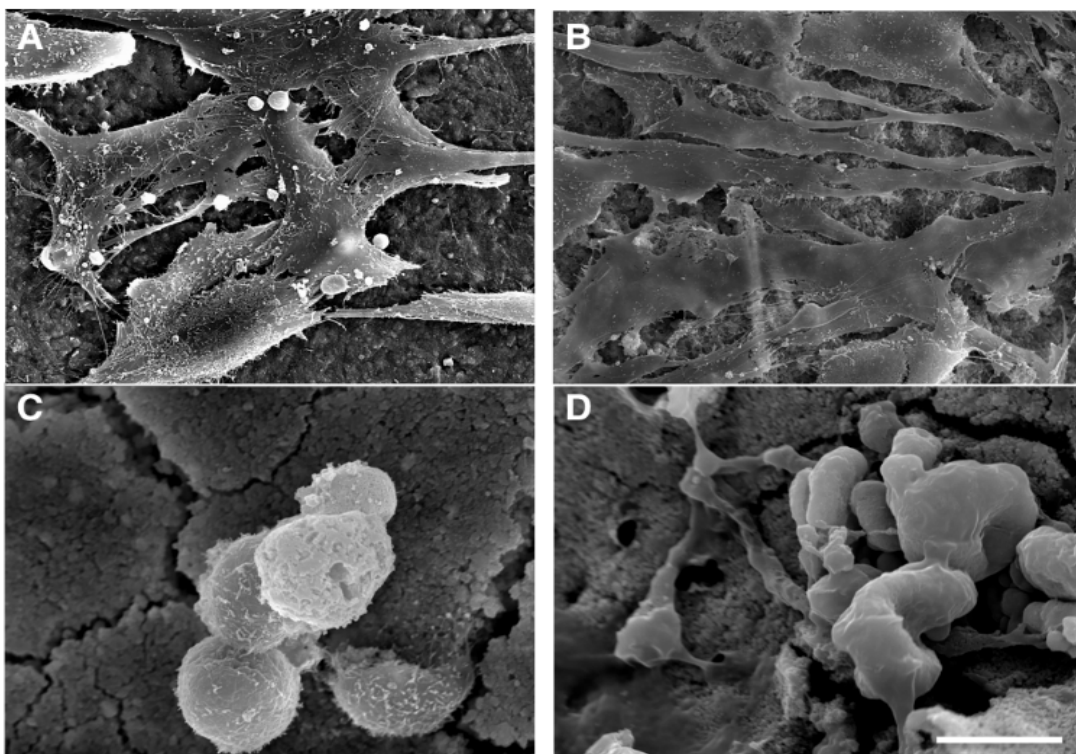


Figura 21. Morfología de la adhesión de las SHED a las 72 horas de cultivo sobre las superficies de los discos de Biodentine™ (A), MTA Angelus™ (B), Theracal LC (C) e IRM™ (D).

5.2.5 Análisis del depósito de calcio en la matriz mediante tinción de Alizarin red.

El depósito de calcio en la matriz se verificó mediante la tinción de Alizarin red, aplicándola sobre los diferentes materiales tras el cultivo con SHED.

Las células cultivadas sobre el Biodentine™ presentaron una tinción significativamente más alta que el grupo control tras 7 días de cultivo, a diferencia de los cultivos de IRM™ o

Theracal LC, donde la tinción fue prácticamente inexistente ($p < 0.01$). (**Figura 22 A y B**) El MTA Angelus™ presentó una tinción superior a la del grupo control, pero inferior a la del Biodentine™.

A los 15 días de cultivo, el Biodentine™ seguía presentando los valores más altos de calcificación, superando a todos los grupos. Por el contrario el Theracal LC presentó una tinción significativamente más baja que el grupo control ($p < 0.001$).

Las tinciones se hicieron más pronunciadas a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, y, tras 21 días de tinción con Alizarin red, el Biodentine™ mostró un incremento significativo en la calcificación comparado con los resultados obtenidos en el grupo control o con el del Theracal LC/IRM™ ($p < 0.01$ y $p < 0.0001$, respectivamente). (**Figura 22 B**)

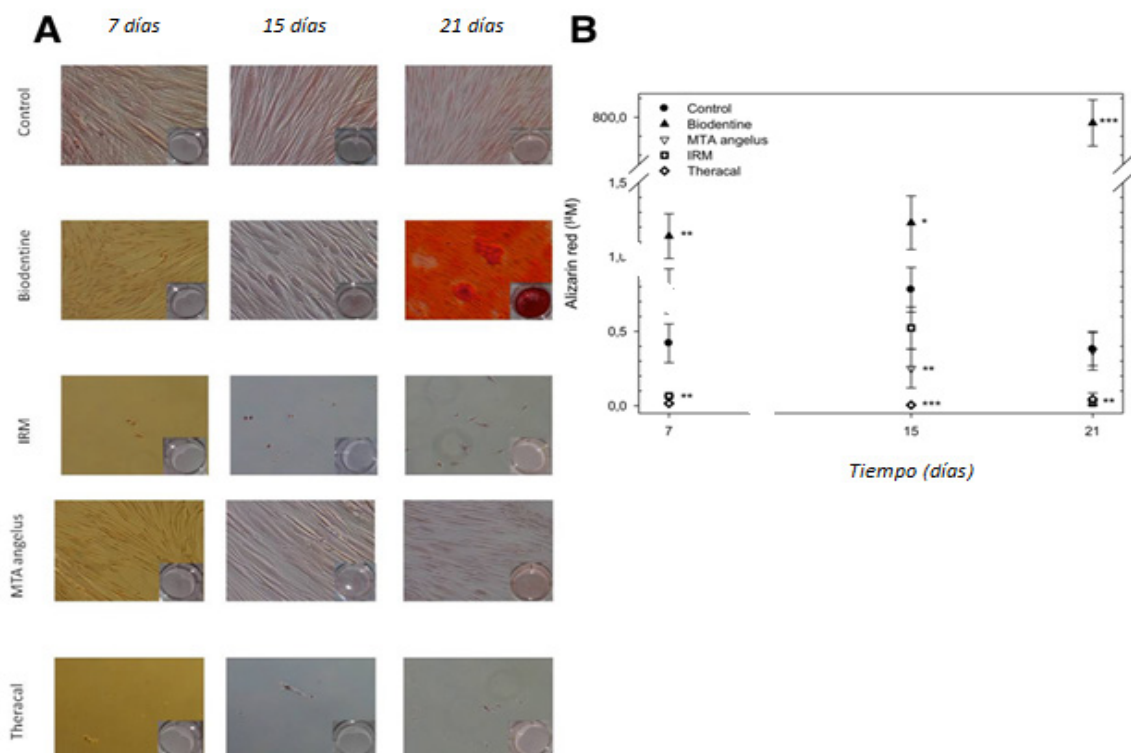


Figura 22. Tinción de las SHED con Alizarin red en presencia de los materiales para pulpotomías utilizados.

6-Discusión.

6.1 Sobre la metodología.

La biocompatibilidad describe la habilidad de un material o de una sustancia para dar lugar a una respuesta conveniente en el huésped cuando se aplica intencionadamente¹⁹². Esta es una propiedad importante que debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el material para realizar un tratamiento pulpar vital, debido al contacto directo de éste con el tejido vivo¹⁹³.

En este estudio, se llevaron a cabo tests *in vitro* relacionados con la biocompatibilidad, con el fin de proveer datos, sobre el uso seguro de biomateriales, para la terapia pulpar vital en dentición temporal. Los ensayos *in vitro* constituyen métodos muy útiles para evaluar los efectos biológicos de los biomateriales y presentan una serie de ventajas como la rapidez con la que se pueden realizar los estudios, la relación coste/efectividad y el no utilizar animales de experimentación¹⁹⁴.

Dentro de los métodos para evaluar los efectos adversos de los materiales se incluyen los cultivos celulares, los experimentos con animales y los estudios clínicos. Los métodos de análisis modernos confían en cultivos celulares, para determinar efectos dañinos inespecíficos (no relacionados con los materiales dentales) sobre las células (citotoxicidad y mutagenicidad). Los análisis con animales, también llamados análisis secundarios, son desarrollados para evaluar, por ejemplo, irritaciones de piel y mucosa y efectos tóxicos sistémicos y para determinar el potencial de sensibilización de los materiales. La finalidad de estos test es la aplicación de los materiales en animales de la misma manera que se haría en los pacientes¹⁹⁵.

Recientemente se han desarrollados análisis mediante cultivos celulares, dirigidos a reemplazar a los modelos que utilizan animales de experimentación. El objetivo es mejorar la compatibilidad de los datos generados por laboratorios diferentes así como disminuir los costes y los experimentos con animales¹⁹⁵.

Las técnicas de cultivo celular se usan para evaluar la biocompatibilidad de diferentes materiales¹⁹². De hecho, se utilizan ensayos *in vitro* con cultivos celulares de manera habitual, para esclarecer los mecanismos involucrados en las diferentes respuestas biológicas y para investigar el comportamiento celular en situaciones específicas. Aunque los resultados de estos ensayos *in vitro* no pueden ser extrapolados inmediatamente a las condiciones clínicas en humanos, son clínicamente relevantes, porque presentan un modelo apropiado para la evaluación de las propiedades de los diferentes materiales dentales, así como para evaluar los riesgos potenciales para la salud¹⁹⁶.

6.1.1 Sobre el aislamiento celular.

La transición de la dentición temporal a la dentición permanente es un proceso único y dinámico en el cual el desarrollo y erupción del diente permanente está coordinado con la reabsorción de las raíces de los dientes temporales. El proceso por el cual se completa el reemplazo de los 20 dientes temporales en humanos, lleva unos 7 años¹⁵⁰.

En nuestro estudio aislamos una población de células madre multipotentes procedentes de la pulpa remanente de los dientes temporales exfoliados. Elegimos este tipo de células, puesto que los materiales que evaluamos son para realizar las pulpotomías en dentición temporal.

Utilizamos la técnica de aislamiento celular descrita por Seo y cols. que combina la disgregación celular de forma mecánica y enzimática¹⁵¹. Otros autores como Deltoé y cols. o Zhu y cols. utilizaron la técnica de explante o cultivo de tejido^{197,198}. Viña-Almunia y cols. realizaron un estudio comparativo entre diferentes técnicas de aislamiento celular, concluyeron que el tiempo necesario para la obtención de las células madre de la pulpa dental se reducía mucho mediante la combinación de digestión, disgregación y agentes mecánicos. Todo ello sin comprometer la obtención de las células¹⁹⁹.

El recuento y estimación de la viabilidad celular se determinaron mediante la utilización de la cámara de Neubauer o hemocitómetro y azul tripán, que es una técnica universalmente conocida y más sensible que utilizar el lector automático (TC20TM Automatic Cell Counter de BioRad), debido a la heterogeneidad del cultivo primario²⁰⁰.

En un estudio previo, Miura y cols.¹⁵⁰ utilizaron células madre procedentes de dientes temporales, indicando que el hecho natural de exfoliación de un diente era similar al del proceso del cordón umbilical, constituyendo una fuente de células madre que pueden servir para futuras aplicaciones clínicas.

Moodley y cols. reportaron que la líneas celulares procedentes de pulpa humana mostraron una sensibilidad más alta que las líneas celulares de murine 3T3, que muchos autores han utilizado para evaluaciones de citocompatibilidad de materiales dentales²⁰¹.

Autores previos como de Menezes y cols. habían utilizado líneas celulares de animales, nosotros en este estudio utilizamos células madre de la pulpa dental procedente de dientes temporales exfoliados. Estos autores en su estudio también trabajaron con materiales para pulpotomías teniendo en común con nosotros el MTA²⁰².

6.1.2 Sobre los materiales.

Los materiales analizados en este estudio fueron tres en base a biosilicatos: Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Creteil, France), MTA Angelus™ (Angelus, Industria de Productos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brazil), Theracal LC (Bisco Inc, Schamburg, IL, USA) y un material de obturación provisional, IRM™ (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany). Se analizaron para evaluar su citocompatibilidad con las SHED.

Para la realización de este estudio, se escogieron estos materiales debido a que el ZOE es uno de los materiales más utilizados en odontopediatría y es el primer material que se utilizó

para intentar preservar el tejido pulpar, MTA y Biodentine™ son dos materiales en base a biosilicatos que han mostrado grandes propiedades en cuanto a su biocompatibilidad y un material más reciente como Theracal LC, del que no hay estudios de citotoxicidad con células madre procedentes de la pulpa dental de dientes exfoliados.

Aunque todos los materiales que utilizamos en nuestro estudio se pueden encontrar en el mercado y han pasado los test oportunos de seguridad, nuestro objetivo fue evaluar cuál sería el material idóneo en términos de citotoxicidad para su uso en la práctica clínica.

6.1.3 Sobre el ensayo para viabilidad celular.

Para evaluar la citotoxicidad y el potencial de los posibles efectos adversos sobre el comportamiento celular, existen una serie de métodos *in vitro* cuantitativos y cualitativos²⁰³. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar²⁰⁴. Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Por ejemplo, el ensayo MTT (Mossman's Tetrazolium Toxicity) basado en colorimetría, es una técnica que se utiliza para valorar cuantitativamente la viabilidad o proliferación celular. Este método está basado en la reducción de 3-(4.5-dimeltiazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, concretamente por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, a formazán (cristales azul violeta, insolubles en agua). Posteriormente se añade una solución acidifica para disolver el formazán, que es un producto insoluble, obteniendo como resultado una solución coloreada. La absorbancia de esta solución se puede cuantificar. Esto nos permitirá evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad de los materiales^{205,206}.

Dicho método fue desarrollado por Mosmann²⁰⁷, como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas, y es preciso y rápido²⁰⁸. La literatura consultada avala el uso del MTT, siendo una prueba de citotoxicidad empleada en varios de los artículos encontrados^{128,134,197,209,210,211,212,213,214,215}.

Sin embargo, la citotoxicidad es sólo un aspecto de la biocompatibilidad y por tanto, éste método por sí solo, no puede usarse únicamente para clasificar un material como biocompatible o no biocompatible¹⁹². Por tanto, en nuestro estudio, nosotros también analizamos la apoptosis celular, la migración celular y la mineralización, en presencia de los citados materiales con el fin de obtener más información en términos de citocompatibilidad.

6.1.4 Sobre la identificación celular.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció una serie de criterios para la identificación del tipo celular, que nosotros seguimos en éste estudio. Los marcadores de antígenos de superficie, que se han utilizado en gran medida en inmunología y hematología, nos permiten una rápida identificación de la población celular. Para identificar las células mesenquimales, Dominique y cols. propusieron que debían expresar los marcadores CD105 (conocido como endoglin y reconocido por el MAb SH2), CD73 (conocido como ecto 5' nucleotidasa y reconocido por el MAb SH3 y SH4) y CD90 (también conocido como Thy-1). También recomendaron la falta de expresión de antígenos hematopoyéticos como un criterio adicional para la identificación, ya que las MSC no expresan esos antígenos¹⁴⁵.

Las SHED son células madre de origen mesenquimal y se considera que tienen capacidad para diferenciarse hacia un linaje osteoblástico, adiposo y neural¹⁵⁰.

En nuestro estudio, las SHED se caracterizaron inicialmente mediante tinción inmunocitoquímica debido a los claros detalles citomorfológicos que éste método consigue.

También utilizamos citometría de flujo porque permite correlacionar múltiples características en células individuales y la identificación de la presencia de antígenos tanto en la superficie como en el interior de la célula. Además, la información obtenida es cualitativa y cuantitativa²¹⁶.

6.1.5 Sobre el ensayo de apoptosis celular.

Los métodos que resultan más confiables para la detección de apoptosis son la determinación de alteraciones morfológicas, el ensayo de TUNEL, así como la detección de cambios en la simetría de la membrana celular y la activación de las caspasas²¹⁷.

En nuestro estudio elegimos el método consistente en la doble tinción celular mediante Anexina-V y 7-AAD, con el fin de determinar la apoptosis celular. Esta técnica requiere de la utilización de células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro*, aunque también puede ser utilizada en análisis de apoptosis en muestras obtenidas para análisis citológicos, o bien para detectar apoptosis en sangre²¹⁷. La tinción con Anexina-V precede la pérdida de la integridad de la membrana celular (la cual acompaña las últimas etapas de muerte celular) resultante de un proceso de apoptosis o necrosis. Por tanto, la tinción con Anexina-V se usa normalmente acompañada de un colorante vital como es el 7-AAD para identificar los diferentes estadios de apoptosis. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o bien, en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria²¹⁷.

6.1.6 Sobre el ensayo de migración celular.

En cavidades muy profundas donde el espesor de la dentina remanente está entre 0.25-0.01 mm o en caries con exposición pulpar, las células madre de la pulpa proliferan, migran al sitio del daño y se diferencian en células odontoblásticas²¹⁶.

Según Rennert y cols. la migración celular es necesaria para mantener la homeostasis del tejido y la regeneración de los órganos y tejidos dañados²¹⁸. Por esta razón, los materiales

dentales deberían facilitar la migración celular con el fin de proteger o reparar la pulpa dental. En nuestro estudio se evaluó la migración celular mediante la técnica de curación de “herida” o “wound healing”, donde se mide la capacidad para recolonizar la zona dañada por parte de nuestras células. Chaushu y Weinreb describieron ésta técnica como la adecuada para analizar la migración celular²¹⁹.

6.1.7 Sobre el estudio de la morfología celular.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento muy útil para determinar la morfología y la fijación celular de un cultivo celular primario sembrado sobre materiales dentales²²⁰. Nos sirve para comprobar el estado celular, si las células se encuentran bien fijadas al disco y presentan una morfología adecuada o si por el contrario tenemos células en estado de apoptosis y mal adheridas, presentando una morfología redondeada que termina muriendo y por tanto despegándose del biomaterial^{221,214}.

Las diferencias en el nivel de adhesión y extensión celular de los diferentes materiales se pueden atribuir a varios factores como la composición química, el tamaño de partícula, la topografía de superficie y la bioactividad de las muestras^{222,223}.

6.1.8 Sobre el análisis del depósito de calcio en la matriz.

La tinción de Alizarin red (ARS) se ha utilizado durante décadas para evaluar los depósitos ricos en calcio que depositan las células en el cultivo. Resulta interesante que el colorante pueda ser extraído de la monocapa teñida y por tanto ser analizada. Este colorante tiene predilección por las sales de calcio²²⁴. En nuestro estudio, nosotros también analizamos la mineralización de la matriz extracelular en presencia de 4 materiales utilizados para pulpotomías de dientes temporales, empleando la tinción Alizarin red.

Para investigar el potencial de las SHED, para diferenciarse en tejido mineralizado, Miura y cols. también emplearon la tinción de Alizarin red en su estudio. Obtuvieron que se formaron

nódulos que dieron positivo para la tinción de Alizarin red en los cultivos celulares con SHED tras 4 semanas de inducción, indicando que existía una acumulación de calcio in vitro¹⁵⁰.

6.2 Sobre los resultados.

En la última década, se han llevado a cabo muchos estudios clínicos y experimentales para comprobar la biocompatibilidad y las propiedades antibacterianas de nuevos materiales dentales. Los materiales usados deben provocar una respuesta apropiada en el huésped. Esto significa que los tejidos que se pongan en contacto con los materiales, no deben mostrar ninguna respuesta tóxica, irritante, inflamatoria, alérgica, genotóxica o carcinogénica. Los materiales que utilizamos para recubrimientos pulpaes o pulpotomías deben actuar como una barrera que proteja la vitalidad del tejido pulpar recubriendo la mínima exposición tisular posible para prevenir un futuro tratamiento endodóncico¹³⁴.

Aunque el formocresol diluido (solución de Buckley 1:5) ha sido considerado el material gold standard para realizar la pulpotomía en dientes temporales, podemos encontrar otros agentes que protejan la pulpa radicular. El uso del formocresol ha sido cuestionado debido a sus efectos adversos como su potencial carcinogénico, mutagenicidad y citotoxicidad. Esto ha llevado a realizar más investigaciones sobre técnicas y materiales nuevos⁵⁷.

Nosotros en nuestro estudio decidimos emplear tres materiales en base a biosilicatos y uno de obturación provisional como es IRMTM, que ha sido utilizado en el campo de la odontopediatría durante muchos años.

El MTA se utiliza habitualmente en muchos procedimientos desde que se considera un material altamente biocompatible²²⁵.

BiodentineTM es un material basado en silicato de calcio, que ha demostrado su biocompatibilidad cuando ha sido probado sobre varias líneas celulares con unas mejores

propiedades de mezclado y un tiempo de fraguado mas corto comparado con el MTA^{226,227,228,229}. Sin embargo la evidencia científica es limitada en cuanto a las interacciones de este material con las células madre procedentes de la pulpa dental y no hay ninguno que se hubiera realizado con SHED^{124,126}.

Theracal LC es un material reciente, basado en el cemento Portland y modificado con resina. Estos monómeros de resina pueden causar reacciones adversas en la pulpa. Theracal LC no incluye agua en su composición, por lo que esta depende del agua que captan del ambiente que les rodea y de su difusión dentro del material y su citotoxicidad hacia las células dentales de la pulpa no ha sido estudiada de forma extensa¹²⁴.

6.2.1 Relacionado con la caracterización y aislamiento celular.

La pulpa dental de los dientes temporales contiene una población celular heterogénea y única que comienza su formación durante la sexta semana intraútero. La pulpa dental es un tejido conectivo vascular que está rodeado por dentina y está compuesta por fibroblastos, odontoblastos, células sanguíneas, células de Schwann, células endoteliales y células mesenquimales indiferenciadas²³¹. Numerosos estudios han demostrado que las células procedentes de la pulpa dental tiene la capacidad de diferenciarse en odontoblastos para reparar el daño sufrido por la dentina, como en caries o traumatismos^{231,232}.

Las células procedentes de la pulpa dental, frecuentemente fibroblastos y células mesenquimales indiferenciadas, son capaces de crecer en placas de cultivo y han sido utilizadas para estudiar la diferenciación de las células pulpares en células similares a los odontoblastos²³¹.

Miura y cols. comentaron que la pulpa dental remanente de dientes temporales exfoliados contenía una población células madre multipotentes, llamadas SHED. Se vio que estas células expresaban los marcadores STRO-1 y CD146, que son marcadores de células madre

mesenquimales, que habían sido encontrados previamente en células madre procedentes de la médula ósea y células madre procedentes de la pulpa dental de dientes permanentes. Las células madre procedentes de dientes primarios mostraron una proliferación celular más alta que aquellas que procedían de dientes permanentes. Estos autores también confirmaron que las SHED parecen ser un tipo de células más inmaduras que las DPSCs, presentando un gran índice de proliferación y potencial de diferenciación en múltiples líneas celulares¹⁵⁰.

La línea celular elegida para este estudio fueron las SHED, que fueron aisladas de dientes temporales exfoliados.

En nuestro estudio encontramos que con Biodentine™ y MTA Angelus™, más del 95% de las células SHED, presentaron resultados positivos de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105, mientras que sólo un 5% presentaron resultados positivos de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. Sin embargo, tan sólo con una dilución 1:4 de IRM™ y Theracal LC obtuvimos resultados similares para el marcador CD73, probablemente debido a factores relacionados con la muerte celular.

En un estudio previo realizado por Insausti y cols. en el cual aislaron MSCs procedentes de otras fuentes como la membrana amniótica o el tejido adiposo, encontraron resultados similares, presentando resultados positivos para los marcadores CD54, CD29, CD73, CD90, CD13, CD44, CD105 y CD106. Nuestros resultados sugieren que los perfiles morfológicos y inmunofenotípicos de las SHED son similares a aquellos procedentes de las MSCs aisladas de médula ósea^{233,234}.

6.2.2 Relacionado con la viabilidad celular y la citotoxicidad.

De Menezes y cols. compararon la toxicidad in vitro de MTA con otros agentes utilizados para pulpotomías en dentición temporal, el hidróxido de calcio, sulfato férrico, el formocresol

diluido y la solución de Buckley de formocresol²⁰². Se utilizó el MTT para el ensayo de viabilidad celular. Los autores concluyeron que el MTA presentó los valores de toxicidad más bajos de los materiales evaluados, siendo la solución de formocresol de Buckley la que presentaba los valores más altos. En nuestro estudio el MTA también presentó unos valores altos de viabilidad celular.

Widbiler y cols. mostraron que la viabilidad de las DSPSC sobre el MTA fue significativamente menor que sobre Biodentine™ durante los 7 primeros días²¹⁴. Sin embargo otros estudios que comparaban la viabilidad de los fibroblastos procedentes de la pulpa humana, fibroblastos procedentes de la encía humana o células similares a osteoblastos expuestos a Biodentine™ y MTA, observaron similar crecimiento celular sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales^{226,227,228}.

Un estudio previo mostró que las células de la papila apical presentaron mayor viabilidad cuando se exponían a MTA fraguado durante 24 horas que al MTA fraguado durante 1 hora. Una explicación es que la liberación de iones calcio, así como la presencia de componentes tóxicos que proceden del MTA fresco, puede afectar el comportamiento celular²³⁵. Nosotros utilizamos los materiales fraguados y no frescos cuando se realizó la preparación de los extractos.

En nuestro estudio encontramos que los resultados del MTT muestran que ni Biodentine™, ni MTA fueron citotóxicos para las SHED, por lo menos en las diluciones 1:1, 1:2 y 1:4. Sin embargo, en presencia de los eluatos de IRM™ y de Theracal LC, encontramos que la viabilidad celular fue muy baja o prácticamente nula.

Estos resultados corroboran los estudios previos, como el de Daltoé y cols., los cuales revelan que no existen diferencias significativas entre los extractos del MTA Angelus™ y el Biodentine™ con sus respectivos controles, tras 24 y 48 horas de cultivo usando DPCs¹⁹⁷. Sin embargo, usando una línea celular odontoblástica de ratón (MDPC-23), Ceci y cols.²³⁶ 2015,

reportaron que Biodentine™ mostró mejor biocompatibilidad que los eluatos del MTA Angelus™ y Proroot MTA™ después de 72 horas de cultivo.

Poggio y cols.¹³⁴ compararon entre otros materiales, el MTA Angelus™, MTA Proroot™ y Theracal LC. Observaron que el Biodentine™ mostró los porcentajes más altos de biocompatibilidad celular, mientras que el MTA Angelus™ y el Proroot MTA™ resultaron menos biocompatibles a las 72 horas, lo que coincide con los resultados encontrados en nuestro estudio en los que el MTA Angelus™ mostró unos valores inferiores al Biodentine™ en todos los tiempos y diluciones. El estudio también muestra que el Theracal LC resultó bastante citotóxico pero sólo en el tiempo de incubación más largo, a las 72 horas. En nuestro caso en presencia del Theracal LC, la proliferación celular fue casi completamente inhibida y menor que el grupo control en todos los tiempos del experimento, para las diluciones (sin dilución y 1:2).

Zhou y cols. también evaluaron en su estudio la citotoxicidad de Biodentine™, MTA blanco Proroot™ y un cemento ionómero de vidrio (Fuji IX), en fibroblastos humanos, que fueron incubados durante un periodo de 7 días. Concluyeron que las células expuestas a los extractos del Biodentine™ obtuvieron las mayores tasas de viabilidad en todas las concentraciones. Esto coincide con nuestros resultados sobre el Biodentine™. Los autores comentaron que a pesar de la superficie desigual y cristalina del Biodentine™ y del MTA comparados con la textura suave de la superficie del ionómero de vidrio, la fijación y el crecimiento celular fueron más favorables en estos dos materiales. Esto se puede atribuir a la liberación de sustancias por parte del ionómero de vidrio que interaccionarían de manera negativa a nivel celular²³⁷.

Agrafioti y cols.²³⁸ compararon en su estudio Biodentine™, MTA fraguado 1 hora y MTA fraguado 24 horas. Se cultivaron DPSCs y se pusieron en contacto con los materiales. Se observó que Biodentine™ expresó una mayor viabilidad celular comparada con los otros grupos tras 4 días, no existiendo diferencias a los 7 días. Utilizaron MTT para su estudio de viabilidad celular. Los resultados muestran que Biodentine™ presentó la mayor viabilidad celular a los 4 días

comparado con el MTA, esto coincide con los datos de nuestro estudio, donde el Biodentine™ mostró los resultados más altos de viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento.

Hebling y cols.²³⁹ evaluaron los efectos citotóxicos de Theracal LC, Vitrebond™ y Ultrablend plus™ sobre un cultivo de células pulpares. Tras incubarse durante 72 horas las células pulpares, los extractos se pusieron en contacto con las células. A las 24 horas de entrar en contacto con los extractos de Theracal LC, Vitrebond™ y Ultrablend plus™ mostraron una disminución de la viabilidad celular al 31%, 73.5% y 71% respectivamente. Esto coincide con nuestros resultados en los que el Theracal LC mostró una baja viabilidad celular a las 24 horas, siendo su citotoxicidad en torno al 38% en su mayor concentración.

Lee y cols.²⁴⁰ evaluaron y compararon la formación de la barrera cálcica, la inflamación del tejido pulpar y la formación de la capa odontoblástica de Proroot MTA™, RetroMTA™ y Theracal LC en pulpotomías realizadas en 60 dientes de perro. Se utilizó IRM™ como control negativo. Después de 4 semanas los dientes fueron extraídos y examinados histológicamente y por inmunohistoquímica. Los autores observaron la formación de una barrera calcificada tanto en Proroot MTA™, como en RetroMTA™, y el tejido pulpar estaba libre de inflamación y se podía observar una capa odontoblástica, sin embargo, Theracal LC presentó una barrera cálcica de menor calidad, una formación de la capa odontoblástica menos favorable y extensa inflamación a nivel pulpar. Concluyeron que tanto Proroot MTA™ como RetroMTA™ producían una respuesta pulpar favorable, al contrario que Theracal LC. Esto coincide con nuestro estudio, en el que Theracal LC presenta unos valores altos de citotoxicidad.

Dedeus y cols.²⁴¹ compararon la citotoxicidad de ProrootMTA™, MTA Angelus™ y cemento Portland, y no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres materiales en términos de citotoxicidad.

Haglund y cols.²⁴² compararon MTA, la amalgama, IRM™ y una resina compuesta, para evaluar sus efectos sobre fibroblastos y macrófagos de ratones. Hubo una disminución significativa de los cultivos celulares en el grupo del IRM™ fresco y del composite, comparados con el de la amalgama y el del MTA. Para los materiales fraguados no hubo diferencias significativas en el crecimiento celular de los fibroblastos ente MTA, amalgama y el composite. En cambio el IRM™ presentó una disminución del crecimiento celular respecto a los otros materiales en la línea de los macrófagos. En nuestro estudio IRM™ mostró los valores más altos de citotoxicidad, muy por encima de MTA.

En nuestro estudio, los resultados revelaron que MTA y Biodentine™ no inducen apoptosis, mientras que IRM™ y Theracal LC fueron más citotóxicos que los otros materiales a base de silicato empleados en el estudio, conduciendo a una permeabilidad de la membrana relacionada con la apoptosis y necrosis celular. Estos resultados de apoptosis de nuestro estudio coinciden con los de Bortoluzzi y cols.²⁴³ quienes reportaron que la exposición a MTA Angelus™, Biodentine™, Theracal LC y IRM™ frescos mostraron unas diferencias significativas en los porcentajes de células saludables, no apoptóticas y no necróticas, siendo Theracal LC e IRM™ los más citotóxicos.

6.2.3 Relacionado con la migración celular.

En este estudio se evaluó la migración celular de las SHED en presencia de los eluatos de varios materiales. Biodentine™ y MTA mostraron una migración celular muy buena a las 48 horas, especialmente en la dilución 1:4, mientras que los eluatos de IRM™ y Theracal LC no estimularon la migración celular de las SHED. Estos resultados coinciden con los encontrados por Luo y cols.²²⁹, que mostraron que la exposición a Biodentine™ produce un incremento significativo en la migración celular y fijación a los discos.

En otro estudio se evaluó la migración de células madre dentales con MTA, virutas de dentina y Bio-oss™. Se realizaron cavidades en terceros molares extraídos mediante un molde y

se llenaron con los diferentes materiales. Las células fueron sembradas sobre la superficie de la cavidad. Los autores concluyeron que tras 24 horas, tanto el MTA como las virutas de dentina, promovían la migración de las células madre dentales, mientras que el Bio-Oss™ parecía inhibirla²⁴⁴. Esto coincide con el estudio de D'antó y cols., que observaron que el MTA favorecía la migración de las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (hMSCs), siendo ésta significativamente mayor que la encontrada con el cemento Portland²⁴⁵.

6.2.4 Relacionado con la morfología celular.

En el presente estudio, el SEM mostró un nivel limitado de adhesión celular sobre los discos de IRM™ y de Theracal LC, mientras que MTA Angelus™ y Blodentine™ permitieron una colonización celular extensa sobre sus discos, formando de esta manera, una monocapa celular que cubría la totalidad de la superficie.

Widbiller y cols. obtuvieron resultados similares acerca de la adhesión celular cuando utilizaron hDPSCs y discos de Biodentine™²¹⁴.

Zhu²⁴⁶ y Balto²²⁷ observan, mediante microscopía electrónica de barrido, la morfología celular y adhesión de distintas células cultivadas en presencia de MTA. Zhu²⁴⁶ comprobó que los osteoblastos humanos se adhieren y extienden bien sobre composite y MTA; no así sobre amalgama e IRM™, con los que presentan aspecto redondeado. Estos datos indican una respuesta favorable al MTA, así como al composite. Balto²²⁷ detecta adhesión y crecimiento de fibroblastos de ligamento periodontal humano sobre MTA fraguado. Concluyó que la calidad y cantidad de células adheridas podría utilizarse como criterio para evaluar la toxicidad del material.

En otro estudio comparativo entre MTA y Biodentine™ las DPSCs mostraron adherencia a los discos, tanto con MTA como con Biodentine™. Las células sobre los materiales conservadas

en ácido cítrico mostraron una apariencia similar a los fibroblastos con un citoesqueleto alargado²³⁸.

Koh¹¹⁰ evaluó la reacción celular a MTA e IRMTM. Observó, con el microscopio electrónico de barrido, el aspecto de cultivos de células óseas humanas incubadas en presencia de los materiales durante distintos periodos de tiempo. Observaron que las células incubadas con MTA presentaban una morfología normal (planas y adheridas al cemento), lo cual demuestra la biocompatibilidad del cemento, mientras que con el IRMTM las células aparecen redondeadas y en menor número, lo que indica mayor toxicidad de este último material.

Haglung y cols. en su estudio también observaron que se producía una zona de muerte celular alrededor del MTA, aunque más allá de esa zona, la morfología de las células es normal. Morfológicamente MTA se caracteriza por desnaturalizar proteínas del medio y produce la muerte celular de las células adyacentes al material, lo cual observó solo en el grupo de MTA fresco²⁴².

Saidon y cols.²⁴⁷ compararon el efecto de MTA y el cemento Portland recién mezclados sobre cultivos celulares de fibroblastos de ratón. Se encontraron resultados similares tras dos semanas de estudio. Se observó una zona de muerte celular alrededor de los materiales frescos, teniendo un crecimiento normal más allá de esa zona al igual que encontró Haglung²⁴².

6.2.5 Relacionado con el depósito de calcio en la matriz.

Múltiples estudios histológicos realizados con MTA, por Torabinejad y cols.²⁴⁸ y Koh y cols.²⁴⁹ expresan que éste tiene un substrato propicio en la activación de los osteoblastos y puede estimular la formación de fosfato de calcio, que favorece la comunicación con el contenido celular.

No solo es un material de sellado que no provoca inflamación, sino que produce un sustrato biológico y biocompatible activo para la formación de tejidos duros como hueso y cemento²⁵⁰.

Para mantener la viabilidad celular, los materiales de recubrimiento deben ser capaces de inducir la formación de puentes de tejido mineralizado cuando entran en contacto con la pulpa en procedimientos como las pulpotomías y los recubrimientos pulpares¹⁹⁷.

En nuestro estudio analizamos la mineralización de la matriz extracelular en presencia de los cuatro materiales para pulpotomías en dentición temporal evaluados. Biodentine™ estimuló la deposición de nódulos de mineralización en una extensión significativa y su efecto fue menos pronunciado en el caso de MTA. La habilidad de MTA para inducir la deposición de calcio ha sido reportada en varios estudios que evaluaron su bioactividad y su potencial para inducir diferenciación osteogénica^{251,252}. Sin embargo la falta de estudios que evalúen la bioactividad del Biodentine™ sobre SHED descarta comparaciones directas con los resultados del presente estudio.

Thompson y cols.²⁵³ comprobaron la capacidad de los cementoblastos humanos para crecer y adherirse sobre MTA y para producir, en presencia del material, osteocalcina, una proteína implicada en la regulación del proceso de mineralización del tejido duro. El autor considera al material cemento-conductor.

Bonson²⁵⁴ comparó MTA con un cemento de vidrio ionómero, con un cemento de óxido de zinc y amalgama con el objetivo de ver cuál de estos materiales promovía la expresión de un fenotipo osteogénico. Se vio que el MTA era capaz de inducir en fibroblastos gingivales y de ligamento periodontal humanos, la expresión de genes de proteínas relacionados con la formación de hueso como la periostina o la fosfatasa alcalina.

Margunato y cols.²⁵⁵ compararon el efecto de Proroot MTA™, Biodentine™ y MM-MTA, y evaluaron la viabilidad celular, capacidad de deposición de tejido duro y la diferenciación osteogénica de las células madre de médula ósea (hBMSCs) derivadas de hueso mandibular. Estos autores evaluaron la viabilidad celular mediante MTT y el depósito de calcio mediante la tinción de Alizarin red.

Concluyeron que MTA, Biodentine™ y MM-MTA presentaron efectos citotóxicos sobre las hBMSCs comparados con el control negativo tras 14 días de cultivo. Aunque todos los materiales estimularon la diferenciación celular osteogénica de HBMSCs comparadas con el control negativo, Proroot MTA™ mostró más osteoinducción que Biodentine™ y MM-MTA con respecto a la técnica por inmunohistoquímica, a la tinción de Alizarin red y a la fosfatasa alcalina.

Esto difiere de nuestro estudio, ya que la mayor osteoinducción la encontramos en el Biodentine™, aunque nosotros utilizamos el material MTA Angelus™ y no Proroot MTA™. Todos los materiales mostraron un potencial de diferenciación osteogénico de las hBMSCs.

Según Daltoé y cols., Biodentine™ estimula los mismos marcadores de mineralización que MTA, pero la tinción fue más intensa en la pulpa dental radicular y en los puentes dentinarios¹⁹⁷.

7-Conclusiones.

1. Biodentine™ mejora la viabilidad celular de las SHED, siendo superior al MTA Angelus™. Theracal LC presenta una tasa de viabilidad celular disminuida, mientras que en presencia de IRM™ disminuye considerablemente la viabilidad de las células madre procedentes de dientes exfoliados.
2. Biodentine™ y MTA Angelus™ presentan una tasa prácticamente nula de apoptosis. Mientras que Theracal LC e IRM™ produjeron un aumento de la apoptosis celular.
3. Con Biodentine™ y MTA Angelus™ se incrementó la migración celular, mientras que con Theracal LC e IRM™ fue prácticamente inexistente.
4. La morfología celular de las SHED sembradas sobre MTA Angelus™ y Biodentine™ fue adecuada y su fijación y extensión celular grande. Theracal LC e IRM™ presentaron una fijación celular limitada y una morfología redonda y por tanto inadecuada.
5. Biodentine™ presentó el mayor incremento en la calcificación seguido por el MTA Angelus™. Por el contrario, Theracal LC e IRM™ presentaron valores muy bajos de calcificación.
6. Tras nuestros resultados, podemos concluir que Biodentine™ resultó ser el material más adecuado en términos de citocompatibilidad y bioactividad para pulpotomías en molares temporales.

8-Bibliografía.

1. Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A. Diagnóstico y tratamiento pulpar en dentición temporal. En: Odontopediatría, 1ªed.Madrid: Masson;2004.p.173-82.
2. Teixeira F, de Sousa R. Effects of eugenol and non-eugenol endodontic fillers on short post retention, in primary anterior teeth: an in vitro study. J Clin Pediatr Dent 2005; 29(3):211-4.
3. Kopel HM. Endodoncia Pediátrica. En: Ingle J, Bakland L, eds. Endodoncia, 5ªed. Mc Graw Hill, 2004; 873-909.
4. Camp JH. Tratamiento endodóncico en pediatría. En: Cohen S, Burn R, editores. Vías de la pulpa. 7ªed. España: Harcourt; 1999. p. 6694-734.
5. Cohen S, Burns R. Endodoncia pediátrica: Tratamiento endodóncico en la dentición temporal y permanente joven. En: eds. Vías de la pulpa, 8ªed. España: Mosby; 2004; p. 797-845.
6. Camp JH. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: Treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. Pediatr Dent 2008; 30(3):197-205.
7. Pucci FM, Reig R. Conductos Radiculares. Anatomía, patología y terapia. En: Fundamentos sobre conductos radiculares. Vol I. Buenos Aires: ed Médico-Quirúrgica; 1944. p. 190-219.
8. Arregui M, Guinot F, Saez S, Bellet JL. Instrumentación mecánica en dentición temporal. Odontol Pediatr 2005; 13(3):102-7.
9. Moss SJ, Addeleston H. Histological study of pulpal floor of deciduous molars. J Am Dent Assoc 1965; 70:372-79.
10. Rigelstein D, Seow WK. The prevalence of furcation foramina in primary molars. Pediatr Dent 1989; 11: 198 – 202.
11. Coll J A, Campbell A, Chalmers N I. Effects of glass ionomer temporary restorations on pulpal diagnosis and treatment outcomes in primary molars. Pediatr Dent 2013; 35(5): 416-21.
12. Guelmann, M. Clinical pulpal diagnosis. En: Fuks AB, Peretz B. Pediatrics endodontics. Current Concepts in Pulp Therapy for Primary and Young Permanent Teeth. 1ªed. Switzerland: Springer; 2016. p. 23-36.

13. Guthrie TJ, McDonald RE, Mitchell DF. Dental hemogram. *J Dent Res* 1965; 44:678-82.
14. Chen E, Abbott PV. Dental Pulp Testing: A Review. *Int J Dent* 2009:365-785.
15. Jespersen JJ, Hellstein J, Williamson A, Johnson WT, Qian F. Evaluation of dental pulp sensibility tests in a clinical setting. *J Endod* 2014;40:351-4.
16. Edwall B, Gazelius B, Berg J, Edwall L, Hellander K, Olgart L. Blood flow changes in the dental pulp of the cat and rat measured simultaneously by laser-Doppler flowmetry and local clearance. *Acta Physiol Scand* 1987;131:81-91.
17. Gazelius B, Olgart L, Edwall B, Edwall L. Non-invasive recording of blood flow in human dental pulp. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:219-21.
18. Fratkin R D, Kenny D J, Johnston DH. Evaluation of a laser Doppler flowmeter to assess blood flow in human primary incisor teeth. *Pediatr Dent* 1999;21: 53-6.
19. Setzer FC, Kataoka SH, Natrielli F, Gondim-Junior E, Caldeira CL. Clinical diagnosis of pulp inflammation based on pulp oxygenation rates measured by pulse oximetry. *J Endod* 2012; 38:880-3.
20. Salyer JW. Neonatal and pediatric pulse oximetry. *Respiratory Care* 2003; 48:386-397.
21. Schnettler JM, Wallace JA. Pulse oximeter as a diagnostic tool of pulp vitality. *J Endod* 1991;17:488-490.
22. Gopikrishna V, Kandaswamy D, Tinagupta K. Assessment of efficacy of an indigenously developed pulse oximeter dental sensor holder for pulp vitality testing - an in vitro study. *Indian J Dent Res* 2006;17:111-113.
23. Goho C. Pulse oximetry evaluation of vitality in primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent* 1999;21:125-127.
24. Wilson WC, Shapiro B. Preoperative hypoxia: the clinical spectrum and current oxygen monitoring methodology. *Anesthesiol Clin North America* 2001;19:799-804.
25. Fuks AB, Guelman M, Kupietzky A. Current developments in pulp therapy for primary teeth. *Endod topics* 2012; 23:50-72.

26. Shabzendedar M, Mazhari F, Alami M, Talebi M. Sodium hypochlorite vs formocresol as pulpotomy medicaments in primary molars: 1-year follow-up. *Pediatr Dent* 2013; 35(4): 329-32.
27. American Academy of Pediatric dentistry. Clinical guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. Reference manual 2008-09. *Pediatr dent* 2008;30:171.
28. Fuks, AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *J Endod* 2008; 34(7):18-24.
29. Primosch RE, Glomb TA, Jerrell RG. Primary tooth pulp therapy as taught in predoctoral pediatric dental programs in the United States. *Pediatr Dent* 1997;19:118-22.
30. Roberts JF. Treatment of vital and non-vital primary molar teeth by one-stage formocresol pulpotomy. Clinical success and effect upon age of exfoliation. *Int J Paediatr Dent* 1996;6(2):111-5.
31. Ranly DM. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. *Pediatr Dent* 1994; 16(6): 430-9.
32. Real Academia Española. (2001). *Diccionario de la lengua española* (22.a ed.). Consultado en <http://www.rae.es/rae.html>.
33. Rolling I, Thylstrup A. A 3-year clinical follow-up study of pulpotomized primary molar treated with the formocresol technique. *Scand J Dent Res* 1975;83:47-53.
34. Nunn JH, Smeaton I, Gilroy J. The development of formocresol as a medicament for primary molar pulpotomy procedures. *ASDC J Dent Child* 1996;63(1):51-3.
35. Emmerson CC, Miyamoto O, Sweet CA, Bhatia HL. Pulpal changes following formocresol applications on rat molars and human primary teeth. *J Cal Dent Assoc* 1959; 27: 309-23.
36. Redig DF. A comparison and evaluation of two formocresol pulpotomy technics utilizing "Buckley's" fomocresol. *ASDC J Dent Child* 1968;35(1):22-30.
37. El-Meligry O, Abdalla M, El-Baraway S, El-Tekya M. Histological evaluation of electro surgey and formocresol pulpotomy techniques in primary teeth in dogs. *J Clin Pediatr Dent*;2002;26(1):81-85.

38. Vostatek S, Kanellis M, Weber-Gasparoni K. Sodium hypochlorite pulpotomies in primary teeth: A retrospective Assessment. *Pediatr Dent*;2011;33(4):327-332.
39. Pashley EL, Myers DR, Pashley DH, Whitford GM. Systemic distribution of 14C-formaldehyde from formocresol-treated pulpotomy sites. *J Dent Res* 1980; 59(3):602–7.
40. Bolt HM. Experimental toxicology of formaldehyde. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113(4):305–9.
41. Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, et al. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. *J Dent* 2003;31:479-85.
42. Milnes AR. Persuasive evidence that formocresol use in pediatric dentistry is safe. *J Can Dent Assoc*; 2006; 72(3):247-8.
43. Mettlach S, Zealand C, Botero M, Boynton JR, Majewski R. Comparison of mineral trioxide aggregate and diluted formocresol in pulpotomized human primary molars: 42-month follow-up and survival analysis. *Pediatr Dent* 2013; 35(3)87-94.
44. Fuks AB. Pulp therapy for the primary dentition. In: Pinkham JR, ed: *Pediatric Dentistry*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders;1999.
45. Hui-Derksen EK, Chen CF, Majewski R, Tootla RG, Boynton JR. Reinforced zinc oxide-eugenol pulpotomy: A retrospective study. *Pediatr Dent* 2013;35(1):43-6.
46. Nadin G, Goel BR, Yeung, A, Glenny AM. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (1):CD003220.
47. Roby G. Electrosurgical currents and their effects. *Dent Clin North Am* 1982;26:683-91.
48. Ruemping DR, Morton TH., Anderson MW. Electrosurgical pulpotomy in primates--a comparison with formocresol pulpotomy. *Pediatr Dent* 1983; 5(1):14-18.
49. Shulman ER, McIver FT, Burkes EJ. Comparison of electrosurgery and formocresol as pulpotomy techniques in monkey primary teeth. *Pediatr Dent* 1987; 9:189-94.
50. Mack RB, Dean JA. Electrosurgical pulpotomy: A retrospective study. *ASDC J Dent Child* 1993;60(2):107-114.

51. Rivera N, Reyes E, Mazzaoui S, Moron A. Pulpal therapy for primary teeth: formocresol vs electrosurgery: a clinical study. *ASDC J Dent Child* 2003;70(1):71-73.
52. Liu JF. Effects of Nd: YAG laser pulpotomy on human primary molars. *J Endod.* 2006; 32(5):404–7.
53. Mareddy A, Mallikarjun SB, Shetty PV, Rao VVN, Chandru TP. Histological evaluation of diode laser pulpotomy in dogs. *J Oral Laser Appl* 2010; 10:7–16.
54. Shoji S, Nakamura M, Horiuchi H. Histopathological changes in dental pulps irradiated by CO2 laser: a preliminary report on laser pulpotomy. *J Endod* 1985; 11(9):379-84.
55. Wilkerson M, Hill S, Ascoria C: Effects of the argón laser on primary tooth pulpotomies in swine. *J Clin Las Med Surg* 1996; 14:37-42.
56. Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatat N, Hollweck R, Crispin A, Hickel R, et al. Effectiveness of 4 Pulpotomy Techniques-Randomized Controlled Trial. *J Dent Res* 2005; 84:1144–48.
57. Niranjani K, Prasad MG, Vasa AA, Divya G, Thakur MS, Saujanya K. Clinical Evaluation of Success of Primary Teeth Pulpotomy Using Mineral Trioxide Aggregate®, Laser and Biodentine™-an In Vivo Study . *J Clin Diagn Res* 2015;9(4):35-7.
58. Mani SA, Chawla HS, Tewari A, Goyal A. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide-eugenol as root canal filling materials in primary teeth. *ASDC J Dent Child* 1999;67(2):142-7.
59. Cleaton-Jones P, Duggal M, Parak R, et al. Zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide pulpectomies in baboon primary molars: histological responses. *Eur J Paediatr Dent* 2004; 5(3):131-5.
60. Sorbe R, Garcia flores JA. Conceptos básicos en odontología pediátrica. Venezuela:Disinlimed CA;1996.
61. Chien MM, Setzer S, Cleaton-Jones P. *SADJ* 2001;56(3) How does zinc oxide-eugenol compare to ferric sulphate as a pulpotomy material?:130-5.
62. Erdem AP, Guven Y, Balli B, et al. Success rate of mineral trioxide aggregate, ferric sulphate and formocresol pulpotomies: A 24 month study. *Pediatr Dent* 2011;33(2):165-70.

63. Doyle T L, Casas M J, Kenny D J, Judd P L. Mineral trioxide aggregate produces superior outcomes in vital primary molar pulpotomy. *Pediatr Dent* 2010; 32(1): 41-7.
64. Rusmah M, Rahim ZH. Diffusion of buffered glutaraldehyde and formocresol from pulpotomized primary teeth. *ASDC J Dent Child* 1992;59:108-110.
65. Praveen K, Rashmi N, Vipin B, Pujan M. Pulpotomy medicaments: continued search for new alternatives-a review. *Oral Health Dent Manag*;2014;13(4): 883-90.
66. Kopel HM, Bernik S, Zachrisson E, De Romero SA. The effects of glutaraldehyde on primary pulp tissue following coronal amputation: an in vivo histological study. *ASDC J Dent Child* 1980;4(6):425-30.
67. Ranly DM, Garcia-Godoy F, Horn D. Time, concentration and pH parameters for the use of glutaraldehyde as a pulpotomy agent: an in vitro study. *Pediatr Dent* 1987; 9(3):199-203.
68. Tsai T, Su H, Tseng L. Glutaraldehyde preparations and pulpotomy in primary molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76:346-50.
69. Lloyd MJ, Seale NS, Wilson CFG. The effects of various concentrations and lengths of application of glutaraldehyde on monkey pulp tissue. *Pediatr Dent* 1988;10(2):115-20.
70. Estrela C, Ribeiro R G, Estrela C R, Pécora J D, Sousa-Neto M D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14(1): 58-62.
71. Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N. An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence Int* 2002; 33(4):261-72.
72. Hafez AA, Kopel HM, Cox CF. Pulpotomy reconsidered: Application of an adhesive system to pulpotomized permanent primate pulps. *Quintessence Int* 2000; 31(8):579-89.
73. Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998;11:55-63.

74. Tunç ES, Saroğlu I, Sarı S, Günhan, O. The effect of sodium hypochlorite application on the success of calcium hydroxide pulpotomy in primary teeth. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 2006; 102(2):e22-6.
75. Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod* 1978; 4(5):140-6.
76. Vargas, K G, Packham B, Lowman D. Preliminary evaluation of sodium hypochlorite for pulpotomies in primary molars. *Pediatr Dent*.2006; 28(6):511-517.
77. Ruby JD, Cox CF, Mitchell SC, Makhija S, Chompu-Inwai P, Jackson J. A randomized study of sodium hypochlorite versus formocresol pulpotomy in primary molar teeth. *Int J Paediatr Dent* 2013; 23(2):145-152.
78. Srinivasan V, Patchett CL, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's Formocresol? Part I -- a narrative review of alternative interventions and materials. *Int J Paediatr Dent* 2006;16(2):117-27.
79. Smith N L., Seale N S, Nunn M E. Ferric sulfate pulpotomy in primary molars: a retrospective study. *Pediatr Dent* 2000; 22(3):192-199.
80. Landau MJ, Johnson DC. Pulpal response to ferric sulfate in monkeys. *J Dent Res* 1988; 67:215.
81. Fei AL, Udin RD, Johnson R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediatr Dent* 1990;13(6):327-332.
82. Fuks A B, Eidelman E, Cleaton-Jones P, Michaeli Y. Pulp response to ferric sulfate, diluted formocresol and IRM in pulpotomized primary baboon teeth. *ASDC J Dent Child* 1996;64(4):254-259.
83. Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol* 2003;19(6): 314-320.
84. Farsi DJ, El-Khodary HM, Farsi NM, El Ashiry E.A, Yagmoor M A, Alzain S M. Sodium Hypochlorite Versus Formocresol and Ferric Sulfate Pulpotomies in Primary Molars: 18-month Follow-up. *Pediatr Dent* 2015;37(7): 535-540.

85. Fuks AB, Holan G, Davis JM, Eidelman E. Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow up. *Pediatr Dent* 1996; 19(5):327-30.
86. Smith N L., Seale N S, Nunn ME. Ferric sulfate pulpotomy in primary molars: a retrospective study. *Pediatr Dent* 2000;22(3): 192-99.
87. Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatat N, Hollweck R, Crispin A, Hickel, R et al. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques—randomized controlled trial. *J Dent Res* 2005;84(12):1144-1148.
88. Papagiannoulis, L. Clinical studies on ferric sulphate as a pulpotomy medicament in primary teeth. *Eur J Paediatr Dent* 2002; 3: 126-132.
89. Kubota K, Goleen B, Penugonda P. Root canal filling materials for primary teeth: A review of the literature. *ASDC J Dent Child* 1992;59(3):225-27.
90. De Sousa DL, De Sousa RB, Pinto D. Antibacterial effects of chemomechanical instrumentation and calcium hydroxide in primary teeth with pulp necrosis. *Pediatr Dent* 2011;33(4):307-311.
91. Siqueira JF, Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endodon* 1998;24:663-5.
92. Teuscher GW, Zander HA. (1938) A preliminary report on pulpotomy. *Northwestern University Grad. Bull* 1938; 39:4.
93. Heilig J, Yates J, Siskin M, McKnight J, Turner J. Calcium hydroxide pulpotomy for primary teeth: A clinical study. *J Am Dent Assoc* 1984; 108: 775-8.
94. Doyle WA, McDonald RE, Mitchell DF. Formocresol versus Calcium Hydroxide in pulpotomy. *ASDC J Dent Child* 1962;29:86-97.
95. Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM. An investigation of the relative efficacy of Buckley's formocresol and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. *Br Dent J*. 2000;188:32-6.
96. Magnusson, B. Therapeutic pulpotomy in primary molars—clinical and histological follow-up. I. Calcium hydroxide paste as wound dressing. *Odontol Revy* 1970; 21(4):415-31.
97. Schroder U. A 2-year follow-up of primary molars pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium Hydroxide. *Scan J Dent Res* 1978;86:273-8.

98. Ketley, C. E., & Goodman, J. R. (1991). Formocresol toxicity: is there a suitable alternative for pulpotomy of primary molars? *Int J Paediatr Dent* 1(2): 67-72.
99. Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulpcapping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-8.
100. Akcay M, Sari S. The effect of sodium hypochlorite application on the success of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate pulpotomies in primary teeth. *Pediatr Dent* 2014;36(4):316-321.
101. Torabinejad M, Hong CU, McDonad F, Pitt Ford TR. Physical and Chemical Properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21(7):349-53.
102. Torabinejad M, Chivian N. Aplicaciones clínicas del agregado trióxido mineral. *Endodoncia* 1999;17(3):159-71.
103. Schwartz RS, Mauger M, Clemnt D, Walker WA. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999;130:967-75.
104. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R S, Wang S, Shi et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008;34(2):166-71.
105. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis R. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mat* 2005;21(4):297-303.
106. Anthonappa RP, King N, Martens L. Is there sufficient evidence to support the long term efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) for endodontic therapy in primary teeth?. *Int Endod J* 2013;46(3):198-204.
107. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:756-763.
108. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23:225-228.

109. Agamy, HA, Bakry, NS, Mounir, MM, Avery, DR. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. *Pediatr Dent* 2004;26(4):302-309.
110. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998;24:543-47.
111. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otobony Filho JA, Bernabe PF, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161-166.
112. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46(9):808-814.
113. Caicedo R, Abbott P V, Alongi D J, Alarcon MY. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Aust Dent J* 2006; 51(4): 297-305.
114. Czarnecka B, Nicholson J. Materials for pulp capping. En: *Materials for direct restoration of teeth*. 1ª ed. Woodhead Publishing. 1ª ed; 2016 .p.189.
115. El Meligy O A, Avery D R. Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide as pulpotomy agents in young permanent teeth (apexogenesis). *Pediatr Dent* 2006;28(5):399-404.
116. Dentsply Tulsa Dental. Materials safety data sheet (MSDS). White ProRoot MTA root canal repair material. Prepared January 30, 2001.
117. Eidelman E, Holan G, Fuks AB. Mineral trioxide aggregate vs formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. *Pediatr Dent* 2001; 23:15-8.
118. Oliveira M, Xavier CB, Demarco F, Pinheiro A, Costa A, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cement. *Braz Dent J* 2007;18(1):3-7.
119. Celik B, Atac AS, Cehreli Z C, Uysal S. A randomized trial of mineral trioxide aggregate cements in primary tooth pulpotomies. *ASDC J Dent Child* 2013; 80(3):126-32.

120. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46(9):808-814.
121. Malkondu O, Kazandag MK, Kazazoglu E. A review on Biodentine™, a contemporary dentine replacement and repair material. *BioMed Res Int* 2014; article ID 160951.
122. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine™ and MTA Angelus. *Dent Mat* 2013; 29(5): 580-93.
123. Laurent P, Camps J. Biodentine™ induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012; 45(5):439–48.
124. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2011;37:1240–46.
125. Tran XV, Gorin C, Willing C, Baroukh B, Pellat B, Decup F et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012; 91:1166–71.
126. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine™ induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012;38:1220–26.
127. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G et al. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res* 2012;91:454-9
128. El Karim IA, McCrudden MT, McGahon MK, Curtis TM, Jeanneau C, Giraud T et al. Biodentine™ Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-induced TRPA1 Expression in Odontoblastlike Cells. *J Endod* 2016; 42(4):589-95.
129. Laurent P, Camps J. Biodentine™ induces TGF-B1 release from human pulp cells. *Int Endod J*. 2012; 45:439-48.
130. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013;29:20-8.

131. Deepa VL, Dhamaraju B, Bollu IP, Balaji TS. Shear bond strength evaluation of resin composite bonded to three different liners: Theracal LC, Biodentine™, and resin-modified glass ionomer cement using universal adhesive: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2016;19(2):166-70.
132. Alzraikat H, Qasrawi D, Burrow MF. Shear bond strength of a novel light cured calcium silicate based-cement to resin composite using different adhesive systems. *Dent Mat J* 2016; 35(6):881-87.
133. Gandolfi MG, Siboni F,Prati C. Chemical-physical properties of Theracal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping.*Int Endod J* 2012;45:571-9.
134. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrani R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials:a comparative study.*Arch Hig Rada Toksikol* 2015;66:181-88.
135. Casagrande L, Cordeiro MM,Nör SA,Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry.*Odontology*.2011;99(1):1-7.
136. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100(1):157-68.
137. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol* 2006;(17):74-7.
138. Blanquer M, Moraleda JM, Iniesta F, Gómez-Espuch J, Meca-Lallana J, Villaverde R et al. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells* 2012;30(6):1277-85.
139. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19(3):180-92.
140. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
141. Caplan A I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641-650.

142. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;(21):759-806.
143. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-676.
144. El-Sayed K F, Dorfer C, Fandrich, Gieseler F, Moustafa M H, Ungefroren, H. Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. En: *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. .Berlin Heidelberg:Springer; 2012. p. 89-103.
145. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
146. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3): 381-390.
147. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(4):1209-21.
148. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P M. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000;59(1):203-227.
149. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13625-30.
150. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):5807-12.
151. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364(9429):149-55.

152. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1:e79.
153. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24: 155-65.
154. Huang, YH, Yang JC, Wang CW, Lee SY. Dental stem cells and tooth banking for regenerative medicine. *J Exp Clin Med* 2010; 2(3):111-117.
155. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2011; 90(3):317-24.
156. Doyle Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009; 183(12):7787-98.
157. Rodríguez-Lozano F J, Bueno C, Insausti C L., Meseguer L., Ramirez MC, Blanquer M et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* 2011; 44(9):800-6.
158. Leprince, JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J* 2012; 45(8):689-701.
159. Shi, S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001; 29(6):532-39.
160. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L et al. Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two subpopulations. *BMC Dev Biol* 2015; 15(1):14.
161. Peng L, Ye L., Zhou X D. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci* 2009; 1(1): 6-12.
162. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher L.W, Gronthos S et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003; 82(12): 976-81.
163. Prescott R S, Alsanea R, Fayad M I, Johnson B R, Wenckus C S, Hao J et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold,

- and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008; 34(4): 421-426.
164. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 2007; 33(6): 703-708.
165. Zhang C, Chang J, Sonoyama W, Shi S, Wang C Y . Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling. *J Dent Res* 2008; 87(3):250-255.
166. Luo Z, Kohli MR, Yu Q, Kim S, Qu T, He W X. Biodentine™ induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. *J Endod* 2014; 40(7): 937-942.
167. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T et al. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146-side population cells from a canine tooth. *Regen Med* 2009; 4(3):377-85.
168. Wang Y, Yao J, Yuan M, Zhang, Z, Hu W. Osteoblasts can induce dental pulp stem cells to undergo osteogenic differentiation. *Cytotechnology* 2013; 65(2):223-231.
169. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg* 2008;19(3):616-625.
170. Ishkitiev N, Yaegaki K, Kozhuharova A, Tanaka T, Okada M, Mitev V, Imai T. Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117+ stem cells. *Regen Med* 2013; 8(5):597-69.
171. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H et al. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J Endod* 2012; 38(4): 475-480.
172. Alzer H, Apel C, Heiland M, Friedrich RE, Jung O, Kroeger N et al. Enrichment and Schwann Cell Differentiation of Neural Crest-derived Dental Pulp Stem Cells. *In Vivo* 2015; 29(3):319-326.
173. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C et al. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One* 2013; 8(8):e71104.

174. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006;12(10): 2813-2823.
175. Wang Y, Cheung GS P, Xu X, Zhao S, Zhang C. The effect of cultured autologous periodontal ligament cells on the healing of delayed autotransplanted dog's teeth. *J Endod* 2010; 36(2):264-267.
176. Alongi, D J, Yamaza T, Song Y, Fouad A F, Romberg E E, Shi S et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010; 5(4): 617-631.
177. Yazid F B, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Govindasamy V, Musa S. Comparison of immunodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clin Oral Investig* 2014;18(9):2103-2112.
178. Pereira L O, Rubini M R, Silva J R, Oliveira DM, Silva I C R, Poças-Fonseca, M J et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J* 2012;45(12): 1080-1090.
179. Sun HH, Chen B, Zhu Q L, Kong H, Li QH, Gao L et al. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials* 2014; 35(35): 9459-9472.
180. Huang, G J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.
181. Pivoriuūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev* 2010; 19(7):1081-93.
182. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008; 34(8):962-9.

183. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis* 2008; 14(5):428-34.
184. Fu X, Jin L, Ma P, Fan Z, Wang S. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol* 2014; 85(6):845-51.
185. Zheng Y, Wang XY, Wang YM, Liu XY, Zhang CM, Hou BX, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res* 2012; 91(7):676-82.
186. Zheng Y, Liu Y, Zhang C, Zhang H, Li W, Shi S et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res* 2009; 88(3):249-54.
187. Huang G J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008; 34(6): 645-651.
188. Kémoun P, Laurencin-Dalícieux S, Rue J, Farges J C, Gennero I, Conte-Auriol et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 2007; 329(2): 283-94.
189. Mori G, Ballini A, Carbone C, Oranger A, Brunetti G, Di Benedetto A. Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *Int J Med Sci* 2012; 9(6): 480.
190. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono, T, Sato S, Teranaka T et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002;31(5):606-611.
191. Hond, M J, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morszeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010;52(4):541-552.
192. Peters OA. Research that matters-biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int endod Journal* 2013; 46: 195-197.
193. Lee BN, Lee KN, Koh JT et al. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod* 2014;40:1217-22.
194. Rodríguez-Lozano F J, Serrano-Belmonte I, Calvo J P, Coronado-Parra M T, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda J M. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells

- (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *J Mat Sci Mat Med* 2013;24(4):979-988.
195. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Material Tissue interaction-From toxicity to tissue regeneration. *Oper Dent*. 2016;41-2:117-131.
 196. Pires CW, Botton G, Cadoná FC et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J* 2016;49:737-45.
 197. Daltoé MO, Paula-silva FW, Faccioli L, Gatón-Hernández PM, De rossi A, Silva L. Expression of mineralization markers during pulp response to Biodentine™ and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2016;42:596-603.
 198. Zhu Zhu, L., Yang, J, Zhang, J, Peng, B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *J Endod* 2014;40(8):1118-1123.
 199. 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;1;21 (3):e374-9.
 200. Rodríguez-Lozano F J, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca M A, Algueró M C, Atucha N M et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25(12): 2731-2741.
 201. Moodley D, Grobler SR, Olivler A. Cytotoxicity of a dentine bonding agent on four different cell-lines. *SADJ: journal of the South African Dental Association*. 2005; 60(6): 234-236.
 202. De Menezes JV, Takamori ER, Bijella MF, Granjeiro JM. In vitro toxicity of MTA compared with other primary teeth pulpotomy agents. *J Clin Pediatr Dent* 2009;33(3): 217-22.
 203. Buttke TM, M^cCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure the viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 1993;157:223-40.

204. Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, Van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol* 2005;78(934): 945-947.
205. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro* 2002;16(5): 599-607.
206. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial a Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. *Cytometry* 2002;47 (4): 236-242.
207. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65 (1-2): 55-63.
208. Bellamy WT. Prediction of response to drugs therapy of cancer: a review of in vitro assay. *Drugs* 1992; 44 (5): 690-708.
209. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A simple In vitro cytotoxicity test using MTT colorimetric assay: analysis of eugenol toixicity on dental pulp cells. *Jpn J Pharmacol* 1990;52(1):95-100.
210. Al-Hiyasat A S, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J* 2010;43(2):148-153.
211. Camps J, Jeanneau C, Laurent P. Bioactivity of a Calcium Silicate–based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod* 2015;41 (9):1469-73.
212. Lee, SJ, Chung J, Na H S, Park E J, Jeon HJ, Kim HC. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clinical oral investigations* 2013;17(3), 1009-1015.
213. Silva GO, Cavalcanti BN, Oliveira TR, Bin CV, Camargo SE, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clin Oral Investig.*2016; 20(4):815-9.
214. Widbiller M, Lindner S R, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Schmalz G et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investing* 2016;20(2):237-46.

215. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J* 2013;24(2):111-116.
216. Lutfi AN, Kannan T P, Fazliah MN, Jamaruddin M A, Saidi J. Proliferative activity of cells from remaining dental pulp in response to treatment with dental materials. *Aust Dent J* 2010;55(1):79-85.
217. Wals GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods* 1998;217:153-63.
218. Rennert RC, Sorkin M, Garg R K, Gurtner GC. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med* 2012;7(6): 833-850.
219. Chausu L, Weinreb M, Beitlitum I, Moses O, Nemcovsky CE. Evaluation of a topical herbal patch for soft tissue wound healing: an animal study. *J Clin Periodontol* 2015;42(3):288-93.
220. Ahmed HM, Luddin N, Kannan TP, Mokhtar KI, Ahmad A. Cell attachment properties of Portland cement-based endodontic materials: biological and methodological considerations. *J Endod* 2014;40:1517-23.
221. Guven E P, Yalvac M E, Kayahan M B, Sunay H, Sahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci* 2013;21(4):351-357.
222. Utneja S, Nawal RR, Talwar S, Verma M. Current perspectives of bio-ceramic technology in endodontics: calcium enriched mixture cement-review of its composition, properties and applications. *Restor Dent Endod* 2015;40:1-13
223. Butt N, Talwar S, Chaundry S, Nawal RR, Yadav S, Bali A. Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine™. *Indian J Dent Res* 2014;25(6):692-7.
224. Gregory C A, Gunn W G, Peister A, Prockop D J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analyt biochem* 2004;329(1):77-84.

225. Samara A, Sarri Y, Stravopodis D, Tzanetakis GN, Kontakiotis EG, Anastasiadou E. A comparative study of the effects of three root-end filling materials on proliferation and adherence of human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2011; 37: 865-870.
226. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *Int Endod J* 2014;12:1133-1141.
227. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod* 2004; 30:25-29.
228. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater* 2008; 24:1486-1494.
229. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* 2014; 42:490-497.
230. Camilleri J, Laurent P. Hydration of Biodentine™, Theracal LC and a prototype Tricalcium Silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod* 2014;40(11):1846-1854.
231. Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Characterization of primary dental pulp cells in vitro. Pediatr Dent* 2009;31(7):467-71
232. Murray PE, et al. Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 2000; 131:321-9.
233. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histology Histopathology* 2010;25:91-8.
234. Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem cells and Development* 2012;21:260-72.
235. Schneider R, Holland GR, Chiego D, Jr, Hu JC, Nör JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod* 2014; 40:931–936.

236. Ceci M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: A comparative study. *J Conserv Dent* 2015;18(2):94-99.
237. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod* 2013; 39(4):478-83.
238. Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V, Lympieri S, Panopoulos P, Anastasiadou E 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.
239. Hebling J, Lessa FC, Nogueira I, Carvalho RM, Costa CA. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *Am J Dent* 2009; 22(3):137-142.
240. Lee H, Shin Y, Kim SO, Lee HS, Choi HJ, Song JS. Comparative study of pulpal responses to pulpotomy with Proroot MTA, RetroMTA and Theracal LC in dog's teeth. *J Endod* 2015; 41(8):1317-24.
241. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod* 2009;35(10):1387-90.
242. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spångberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(6):739-45.
243. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mat* 2015;31:1510-22.
244. Lympieri S, Taraslia V, Tsatsoulis IN, Samara A, Velentzas AD, Agrafioti A, et al. Dental Stem Cell Migration on Pulp Ceiling Cavities Filled with MTA, Dentin Chips, or Bio-Oss. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:189872.
245. D'Antò V, Di Caprio M P, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod*; 2010;36(11):1839–1843.

246. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LSW. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 2000;26(7):404-6.
247. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95(4):483-9.
248. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21(10):489-92.
249. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997;37(3):432-9.
250. Maroto M, Barberia E, Planells P, Garcia Godoy F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. *Am J Dent* 2005; 18(3):151-4.
251. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011;37:1691-5.
252. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008;34:1057-60.
253. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2003; 29:407-12.
254. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; 83(5):408-13.
255. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Karapınar KM, Sahin F. In Vitro Evaluation of ProRoot MTA, Biodentine™ and MM-MTA on Human alveolar Bone Marrow Stem Cells in Terms of Biocompatibility and Mineralization. *J Endod* 2015;41(10):1646-52.

9-Anexos.

Anexo 1.- Consentimiento informado.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./Dña., de años de edad y con DNI nº, manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios del estudio realizado con mi/s molar/es temporales, para cubrir los objetivos del Proyecto de Tesis Doctoral de Investigación titulado “EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BIOCOPATIBILIDAD DE MATERIALES EN BASE DE BIOSILICATO PARA SU USO EN PULPOTOMÍAS EN DENTICIÓN TEMPORAL”, llevado a cabo por D^a. Táбата Álvarez Muro, teléfono de contacto 677346316 y correo electrónico tabathamuro@hotmail.com; y dirigido por el Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano, teléfono de contacto 609406624 y correo electrónico fcojavier@um.es, con el fin de determinar la biocompatibilidad de los materiales citados.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de pulpa dental puede tener sobre mi bienestar y salud.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

He sido también informado que puedo abandonar en cualquier momento mi participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio alguno.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Murcia, a de..... de 2016.

Fdo. D/Dña

Anexo 2.- Índice de figuras.

ÍNDICE DE FIGURAS		
Figura 1.	Presenta el corte mesial de un segundo molar superior temporal con la resultante a-b, de un conducto muy divergente; y el corte mesiodistal de un primer molar inferior temporario con las resultantes a-b y c-d, de los conductos mesial y distal, respectivamente. La línea e-d, muestra el ligero desgaste compensatorio.	Pág. 20
Figura 2.	Características de reabsorción en un incisivo central y canino superior temporal.	Pág. 22
Figura 3.	Aspectos de la reabsorción de la cara lingual de las raíces de los dientes unirradiculares inferiores.	Pág. 22
Figura 4.	Reabsorción preponderante de las raíces distal y palatina del primer molar superior temporal.	Pág. 23
Figura 5.	Segundos molares superiores temporales que muestran la misma característica de reabsorción de los primeros molares superiores.	Pág. 23
Figura 6.	Reabsorción preponderante de la raíz distal de los primeros molares inferiores.	Pág. 23
Figura 7.	Segundos molares inferiores mostrando la reabsorción semejante a la de los primeros molares inferiores.	Pág. 231
Figura 8.	Reabsorción, en un mismo plano, de dientes temporales superiores e inferiores.	Pág. 23
Figura 9.	Reabsorción horizontal en el tercio cervical de un incisivo central y canino superiores ⁷	Pág. 24
Figura 10.	Perforaciones parietales y del piso de la cámara ocasionadas por la reabsorción.	Pág. 24
Figura 11.	Etapas del desarrollo del diente y el origen de las células madre dentales.	Pág. 57
Figura 12.	Precipitado celular.	Pág. 78

Figura 13.	Centrifugadora.	Pág. 78
Figura 14.	Cámara de Neubauer con azul tripan.	Pág. 79
Figura 15.	Recuento con cámara de Neubauer o hemocitómetro.	Pág. 80
Figura 16.	Formación de los cristales de formazán, tras 4 horas de incubación.	Pág. 84
Figura 17.	Imágenes de inmunofluorescencia de SHED teñidas, usando CD73 (A), CD90 (B), CD105 (C) y un control negativo (D).	Pág. 93
Figura 18.	Expresión de marcadores específicos mediante citometría de flujo.	Pág. 96
Figura 19.	Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necróticas.	Pág. 97
Figura 20.	Porcentaje de migración celular a las 24 y 48 horas para cada uno e los grupos en comparación con el grupo de control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).	Pág. 99
Figura 21.	Morfología de la adhesión de las SHED a las 72 horas de cultivo sobre las superficies de los discos de Biodentine™ (A), MTA Angelus™ (B), Theracal LC™ (C) e IRM™ (D).	Pág. 100
Figura 22.	Tinción de las SHED con Alizarin Red en presencia de los materiales para pulpotomías utilizados	Pág. 101

Anexo 3.- Índice de gráficas.

ÍNDICE DE GRÁFICAS		
Gráfica 1.	Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir.	Pág. 94
Gráfica 2.	Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:2.	Pág. 94
Gráfica 3.	Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4.	Pág. 94

Anexo 4.- Índice de tablas.

ÍNDICE DE TABLAS		
Tabla 1.	Presentación y composición de los materiales utilizados.	Pág. 76
Tabla 2.	Componentes que se añaden al α -MEM-	Pág. 81