



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE  
DOCTORADO

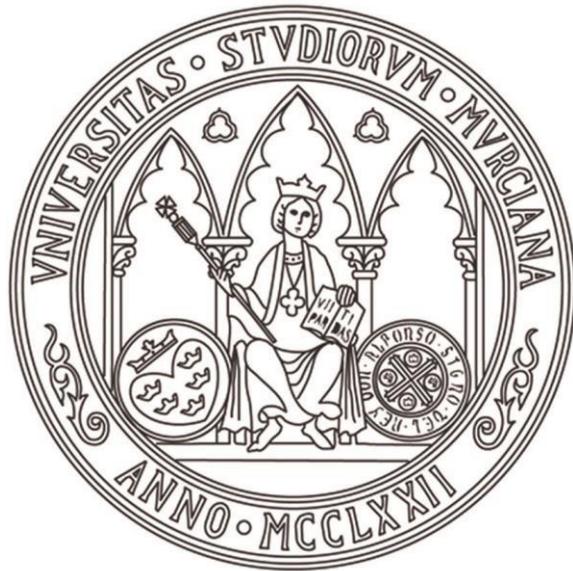
TESIS DOCTORAL

Biocompatibilidad *In Vitro* de Nuevos Productos de Eliminación de  
Caries Químico-Mecánicos en Células Madre de Pulpa Dental  
Humana

**D<sup>a</sup>. Nuria Pérez Guzmán**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE  
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Biocompatibilidad *In Vitro* de Nuevos Productos de Eliminación de  
Caries Químico-Mecánicos en Células Madre de Pulpa Dental  
Humana

Autor:

D<sup>a</sup>. Nuria Pérez Guzmán

Director/es:

Dr. Sergio López García

Dra. María Pilar Pecci Lloret





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Nuria Pérez Guzmán

doctorando del Programa de Doctorado en

Integración y Modulación de Señales en Biomedicina

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Biocompatibilidad In Vitro de Nuevos Productos de Eliminación de Caries Químico-Mecánicos en Células Madre de Pulpa Dental Humana

y dirigida por,

D./Dña. Sergio López García

D./Dña. María Pilar Pecci Lloret

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 03 de noviembre de 2023

NURIA  
PÉREZ

GUZMÁN-48  
696970-J

Firmado digitalmente  
por NURIA PÉREZ  
GUZMÁN-48696970-J  
Fecha: 2023.12.03  
18:55:44 +01'00'

Fdo.:

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, pues no podía ser de otro modo, gracias a mi directora de tesis, María Pilar Pecci Lloret, que cuando más lo necesité me tendió la mano, me dio su apoyo y me devolvió la ilusión por ser doctora. Gracias por tu ayuda incondicional siempre, por ser inspiración, por ser mi ejemplo a seguir.

Gracias a mi director de tesis Sergio López García por la enorme paciencia que ha tenido conmigo, por todo el tiempo que me ha dedicado, por enseñarme tanto, por guiarme siempre que me veía perdida, por transmitirme el entusiasmo de investigar en el laboratorio.

Gracias a mi tutor Francisco Javier Rodríguez Lozano, por su apoyo y motivación constante, por creer en mí cuando más lo necesité, y por demostrar que trabajando duro se puede llegar muy lejos.

Gracias a mis padres por darme la oportunidad de llegar hasta aquí. A mi padre, por ser un ejemplo de fuerza de voluntad y autosuperación. A mi madre, por animarme cuando más frustrada estaba, por esperarme cada viernes con una sonrisa para preguntarme como me había ido.

Gracias a mi pareja, Richard, por ser el estímulo necesario para comenzar este trabajo, por confiar siempre en mí. Gracias por apoyarme en todos mis objetivos incondicionalmente, por ser mi compañero de vida.

Gracias a mi amiga María, por ser mi banco donde descansar para poder seguir. Gracias por ser mi apoyo emocional, por ser motivación, por estar siempre.



## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido financiado por la Red Española de Terapia Celular (TerCel) otorgada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) (RETICS RD07/0010/2012 y RD12/0019/0001) y el Programa Conjunto para la Investigación Biomédica en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa del ISCiii y el FFIS (Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia).



# ÍNDICE



# ÍNDICE

RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	7
ABREVIATURAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS .....	15
ÍNDICE DE TABLAS .....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. HISTOLOGÍA DEL COMPLEJO DENTINOPULPAR .....	23
1.1.1. HISTOLOGÍA DE LA DENTINA.....	23
1.1.2. HISTOLOGÍA DE LA PULPA DENTAL .....	27
1.2. CÉLULAS MADRE .....	29
1.2.1. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDOS OROFACIALES .....	29
1.2.2. CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE LA PULPA DENTAL .....	30
1.3. PATOLOGÍA DE CARIES DENTAL .....	34
1.3.1. ETIOLOGÍA .....	35
1.4. TRATAMIENTO RESTAURADOR DE LA CARIES DENTAL.....	36
1.4.1. TRATAMIENTO RESTAURADOR CONVENCIONAL.....	36
1.4.2. TRATAMIENTO RESTAURADOR MÍNIMAMENTE INVASIVO .....	37
1.5. MATERIALES PARA LA REMOCIÓN QUÍMICO-MECÁNICA DE CARIES .....	40
1.6. BIOCOMPATIBILIDAD .....	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	51
3.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....	52
3.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR.....	52
3.2.1. EXTRACCIÓN DE LA PULPA DENTAL .....	53
3.2.2. DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA .....	54
3.2.3. SIEMBRA DE CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE COLONIAS .....	55
3.3. TRIPSINIZACIÓN.....	56
3.4. RECUENTO CELULAR .....	57
3.5. ENSAYOS EXPERIMENTALES.....	58
3.5.1. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA.....	58
3.5.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR.....	60
3.5.3. EXPERIMENTO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	61
3.5.4. EXPERIMENTO DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	62
3.5.5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR .....	63

3.5.6.	MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO INTRACELULAR .....	65
3.5.7.	MEDICIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS .....	67
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	68
4.	RESULTADOS .....	71
4.1.	RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE IC 50 .....	71
4.2.	ENSAYO DE VIABILIDAD (MTT) .....	75
4.3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR .....	78
4.4.	RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE FLUORESCENCIA .....	80
4.5.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR .....	81
4.6.	RESULTADOS DEL ENSAYO DE APOPTOSIS/NECROSIS .....	83
4.7.	RESULTADOS DE LA LIBERACIÓN DE ROS .....	85
5.	DISCUSIÓN .....	89
5.1.	REMOCIÓN QUÍMICA DE CARIES EN PACIENTES ESPECIALES .....	89
5.2.	DISCUSIÓN DEL MÉTODO <i>IN VITRO</i> .....	90
5.3.	MATERIALES DE REMOCIÓN QUÍMICA DE CARIES .....	91
5.4.	SOBRE EL USO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL .....	92
5.5.	SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA (IC50) .....	93
5.6.	ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR .....	94
5.7.	SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR .....	98
5.8.	SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS .....	99
5.9.	SOBRE EL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR .....	101
5.10.	SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR .....	102
5.11.	SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS .....	104
5.12.	PAPAÍNA COMO PRINCIPIO ACTIVO .....	104
5.13.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	105
5.14.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	106
6.	CONCLUSIONES .....	109
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113
8.	ANEXOS .....	139





# RESUMEN



## RESUMEN

**Introducción:** La caries dental en la dentición permanente es la afección más prevalente entre todas las enfermedades humanas y afecta a más de 2500 millones de personas. Una de las técnicas aplicadas en la odontología mínimamente invasiva incluye la remoción químico-mecánica de la caries. La utilización de los materiales de remoción química de caries ha demostrado reducir la ansiedad, el dolor y la necesidad de anestesia, y esto lo hace muy adecuado para el tratamiento de pacientes ansiosos o médicamente comprometidos.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue comparar las características biológicas de cuatro materiales de remoción químico-mecánica de caries para evaluar su biocompatibilidad usando células madre de pulpa de diente permanente.

**Material y Métodos:** Los materiales analizados fueron Papacárie Duo<sup>®</sup>, BRIX3000<sup>®</sup>, Cariesolut y NATURAL-CARE. Los procedimientos para evaluar la biocompatibilidad de estos materiales fueron realizados sobre células madre de pulpa dental de diente permanente. En una cabina de Bioseguridad Teslar nivel II se realizaron un total de siete experimentos: medición de la concentración inhibitoria media (IC50), medición de la actividad metabólica celular (MTT) (24, 48, 72 horas), experimento de migración celular (24, 48, 72 horas), experimento de inmunofluorescencia (72 horas), análisis de apoptosis y necrosis celular, análisis de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y análisis del ciclo celular. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional y prueba post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Resultados:** En nuestros resultados se obtuvo que BRIX3000<sup>®</sup> mostró al 0,1% y 0,01% una citocompatibilidad equiparable a la del grupo control para todos los períodos de tiempo analizados. Papacárie Duo<sup>®</sup> presentó una citotoxicidad concentración-dependiente, mostrando una baja biocompatibilidad y viabilidad celular a altas concentraciones la cual mejoraba al diluir el material. NATURAL-CARE presentó un comportamiento similar al observado en Papacárie Duo<sup>®</sup>, llegando a alcanzar a bajas concentraciones (0,01%) resultados más favorables en los experimentos de migración celular y de inmunofluorescencia con respecto a dicho material y semejantes a los del control. Cariesolut fue el material que mayor citotoxicidad

demostró en todos los casos. Los resultados sugieren que BRIX3000® a altas concentraciones es capaz de levantar las células cultivadas sin llegar a producir su apoptosis, permitiendo una viabilidad celular bastante aceptable a bajas concentraciones; Papacárie Duo® y NATURAL-CARE si llegan a producir muerte celular a altas concentraciones, mejorando su biocompatibilidad al disminuir su concentración.

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que BRIX3000® sería el material más adecuado para realizar una remoción química de caries, siendo buenas opciones también Papacárie Duo® y NATURAL-CARE, y desaconsejando la utilización de Cariesolut debido a su baja biocompatibilidad sobre células de pulpa dental de diente permanente.

**PALABRAS CLAVE**

Cultivo celular, remoción químico-mecánica, citotoxicidad, pulpa dental, papacárie, biocompatibilidad, caries, remoción, papaína, células madre.

# **ABSTRACT**



## ABSTRACT

**Introduction:** Dental caries in the permanent dentition is the most prevalent of all human diseases and affects more than 2.5 billion people. One of the techniques applied in minimally invasive dentistry includes chemical-mechanical caries removal. The use of chemical caries removal materials has been shown to reduce anxiety, pain and the need for anaesthesia, and this makes it well suited to the treatment of anxious or medically compromised patients.

**Objective:** The aim of this study was to compare the biological characteristics of four chemical-mechanical caries removal materials to evaluate their biocompatibility using permanent tooth pulp stem cells.

**Material and Methods:** The materials evaluated were Papacárie Duo<sup>®</sup>, BRIX3000<sup>®</sup>, Cariesolut and NATURAL-CARE. Procedures to evaluate the biocompatibility of these materials were performed on permanent tooth pulp stem cells. A total of seven experiments were performed in a Teslar level II biosafety cabinet: measurement of the mean inhibitory concentration (IC50), measurement of cell metabolic activity (MTT) (24, 48, 72 hours), cell migration experiment (24, 48, 72 hours), immunofluorescence experiment (72 hours), cell apoptosis and necrosis analysis, reactive oxygen species (ROS) production analysis and cell cycle analysis. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** In our results, BRIX3000<sup>®</sup> showed at 0.1% and 0.01% a cytocompatibility comparable to that of the control group for all time periods analysed. Papacárie Duo<sup>®</sup> presented a concentration-dependent cytotoxicity, showing low biocompatibility and cell viability at high concentrations which improved when the material was diluted. NATURAL-CARE showed a similar behaviour to that observed in Papacárie Duo<sup>®</sup>, reaching at low concentrations (0.01%) more favourable results in cell migration and immunofluorescence experiments with respect to that material and similar to those of the control. Cariesolut was the material that showed the highest cytotoxicity in all cases. The results suggest that BRIX3000<sup>®</sup> at high concentrations is capable of lifting the cultured cells without producing apoptosis, allowing a fairly acceptable cell viability at low concentrations; Papacárie Duo<sup>®</sup> and NATURAL-CARE do produce cell

death at high concentrations, improving their biocompatibility by decreasing their concentration.

**Conclusions:** Our findings suggest that BRIX3000® would be the most suitable material for chemical caries removal, with Papacárie Duo® and NATURAL-CARE also being good options, and discourage the use of Cariesolut due to its low biocompatibility on permanent tooth pulp cells.

**KEY WORDS**

Cell culture, chemical-mechanical removal, cytotoxicity, dental pulp, papacárie, biocompatibility, caries, removal, papain, stem cells.

# **ABREVIATURAS**



## **ABREVIATURAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ART:** Técnica de Restauración Atraumática.

**BisGMA:** Metacrilato de Bisfenol-Glicidil.

**BMP-2:** Proteína Morfogénica Ósea 2.

**BMP-7:** Proteína Morfogénica Ósea 7.

**BMSC:** Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea Humanas.

**CMRC:** Agentes para la Eliminación Químico-Mecánica de Caries.

**CMs:** Células Madre.

**DAPI:** 4,6- diclorhidrato de diamidino-2-fenilindol.

**DFSCs:** Células Madre Procedentes del Folículo Dental.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DPSCs:** Células Madre procedentes de Pulpa Dental.

**DE:** Desviación Estandar.

**GIC:** Cemento de ionómero de vidrio.

**GMSCs:** Células Madre Procedentes del Tejido Gingival.

**IP:** Yoduro de Propidio.

**MTT:** 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio.

**NVB:** Paquete Neurovascular.

**OFMSCs:** Células Madre Mesenquimales Orofaciales.

**OMI:** Odontología Mínimamente Invasiva.

**OMLP-PCs:** Células Madre Procedentes de la Lámina Propia Mucosa Oral.

**OMSCs:** Células Madre procedentes de Médula Ósea de Mandíbula.

**PDLSCs:** Células Madre Procedentes del Ligamento Periodontal.

**PBS:** tampón fosfato salino.

**PL-MSCs:** Células Madre Procedentes del Tejido Inflamatorio Periapical presente en Infecciones Odontógenas.

**PS:** Fosfatidilserina.

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno.

**SCAPs:** Células Madre Procedentes de la Papila Apical.

**SHEDs:** Células Madre procedentes de Dientes Deciduos.

# ÍNDICE DE FIGURAS



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** A. Esquema de un canino inferior donde se observa la relación de la pulpa con la dentina circundante y con los tejidos periapicales. B. Microfotografía del complejo dentina (D)-pulpa (P).

**Figura 2:** Localización de las células madre en la cavidad oral.

**Figura 3:** Desmineralización del esmalte en presencia de flúor en el biofilm.

**Figura 4:** Ruptura del colágeno por acción de un agente químico de remoción de caries.

**Figura 5:** cabina Tesltar BIO II A.

**Figura 6:** Tanque de agua a 37 °C.

**Figura 7:** Centrífuga.

**Figura 8:** Estufa de cultivo.

**Figura 9:** Contador automático celular

**Figura 10:** Citómetro de flujo BD LSRFortessa™ X-20.

**Figura 11:** Siembra de células en placas de 6 pocillos.

**Figura 12:** Concentración de inhibición media de Papacárie Duo®.

**Figura 13:** Concentración de inhibición media de BRIX3000®.

**Figura 14:** Concentración de inhibición media de NATURAL-CARE.

**Figura 15:** Concentración de inhibición media de Cariesolut.

**Figura 16:** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 2%.

**Figura 17:** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 0,1%.

**Figura 18:** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 0,01%.

**Figura 19:** Resultados del ensayo de cicatrización de heridas. El porcentaje de área de herida abierta se muestra gráficamente en tres momentos diferentes (24, 48 y 72 h)

para cada uno de los eluatos de solventes probados (2 %, 0,1 % y 0,01 %) en relación con el porcentaje de área de herida abierta en 0 h. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . También se muestran imágenes del área abierta de la herida (barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ ).

**Figura 20:** Morfología del citoesqueleto y núcleo de las células de pulpa dental de diente permanente a las 72 horas de cultivo en los cuatro tipos de materiales observada en microscopio de fluorescencia.

**Figura 21:** Resultados del análisis del ciclo celular.

**Figura 22:** Análisis de citometría de flujo de la apoptosis celular y necrosis inducida por los cuatro materiales de remoción química de caries en SHED por tinción con Anexina-V-FITC y 7-AAD.

**Figura 23:** Resultados de liberación de ROS sobre el porcentaje de células positivas para CM-H2DCFDA. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

# ÍNDICE DE TABLAS



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Especificaciones de los materiales de remoción química de caries.

**Tabla 2:** Resumen de los estudios cuyo objetivo fue evaluar la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries mediante el ensayo de MTT.



# INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. HISTOLOGÍA DEL COMPLEJO DENTINOPULPAR

La dentina y la pulpa constituyen una unidad a nivel funcional e histológico, considerándose en este sentido como partes de un mismo tejido (Figura 1), siendo la dentina el complejo mineralizado del complejo dentinopulpar, y la pulpa el componente no mineralizado <sup>[1]</sup>.

Para simplificar la comprensión, la histología de la dentina y la de la pulpa se analizarán por separado.



**Figura 1:** A, esquema de un canino inferior donde se observa la relación de la pulpa con la dentina circundante y con los tejidos periapicales. B, microfotografía del complejo dentina (D)-pulpa (P). Tomado de *Endodoncia técnica y fundamentos*, de Soares y Goldberg <sup>[2]</sup>.

### 1.1.1. HISTOLOGÍA DE LA DENTINA

La dentina es el tejido que conforma la gran mayoría del volumen del diente, siendo la que le otorga la forma y rigidez necesarias durante la masticación. Es por tanto un tejido mineralizado, recubierto por esmalte en la zona coronal y por cemento en la zona de la raíz. La dentina delimita la cavidad que ocupa la pulpa dental, teniendo ambas un origen mesodérmico a partir de la papila dental<sup>[1,3]</sup>.

### **1.1.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA**

La dentina es un tejido conjuntivo duro, cuyo peso se compone de materia orgánica en un 70%, de materia inorgánica en un 18% y de agua en un 12%. La materia inorgánica está formada mayormente por cristales de hidroxiapatita los cuales presentan un tamaño inferior que los existentes en el esmalte. La materia orgánica se conforma de colágeno tipo I y de proteínas similares a las del hueso. En volumen, la dentina está compuesta por material inorgánico en un 45 %, en un 33% por material orgánico, y en un 22% por agua <sup>[1,3]</sup>.

### **1.1.1.2. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA DENTINA**

La dentina presenta una estructura tubular, la cual está conformada por una serie de túbulos que la atraviesan y que constituyen la dentina intratubular, con pocas fibras colágenas, y por una matriz o dentina intertubular<sup>[3]</sup>.

#### **A. TÚBULOS DENTINARIOS**

Son conductos huecos que van desde la pulpa hasta el límite amelodentinario, delimitados por la dentina peritubular, la cual es rica en fibras colágenas y presenta un espesor que va desde los 400 nm a la altura de la dentina circumpulpar y hasta los 750 nm a nivel de la dentina del manto<sup>[3]</sup>.

Los túbulos describen un trayecto en forma de «S» itálica, siendo esta curva más acentuada en la porción coronaria de la dentina. A nivel de la dentina radicular los túbulos exhiben una curvatura poco pronunciada, y a la altura de los bordes incisales o cúspides los túbulos pueden llegar a describir una trayectoria rectilínea<sup>[1]</sup>. Todas estas trayectorias se originan como consecuencia de la restricción gradual del espacio de los odontoblastos durante la formación de la dentina. Como resultado de esa aglomeración, existe un mayor número de túbulos dentinarios por unidad de superficie en las capas de dentina cercanas a la pulpa en comparación con las zonas más externas de la dentina<sup>[4,5]</sup>.

En el interior de los túbulos dentinarios se hallan las prolongaciones de Tomes, las cuales son prolongaciones de los dentinoblastos que a su vez emiten prolongaciones

laterales que, a través de los túbulos secundarios, contactan con las prolongaciones de los túbulos adyacentes<sup>[3]</sup>.

El espacio peridentinoblástico es el espacio que se encuentra entre el citoplasma celular y la pared del túbulo. En este espacio podemos encontrar el llamado fluido dentinario o linfa, así como fibras nerviosas amielínicas, fibras colágenas y algunos cristales de hidroxiapatita<sup>[3,6]</sup>.

## **B. DENTINA INTERTUBULAR, PERITUBULAR E INTERGLOBULAR**

Los túbulos están rodeados por una pared que se denomina dentina peritubular o intratubular, de manera que esta dentina se forma en la luz de los propios túbulos. La formación de dentina peritubular es un proceso continuo en el cual intervienen factores ambientales o patológicos, debido a lo cual se va reduciendo la luz de los túbulos pudiendo incluso llegar a obliterarse <sup>[1,7]</sup>.

La dentina intertubular conforma la mayor parte de la dentina y se localiza entre la dentina peritubular. Está constituida por una red tridimensional de fibras colágenas con un diámetro de entre 50 y 200 nm y sobre las que se depositan los cristales de hidroxiapatita <sup>[1,3]</sup>.

La estructura y composición de ambos tipos de dentina son distintas: mientras que el colágeno tipo I es la proteína principal de la dentina intertubular (90%), en la dentina peritubular no se advierten fibrillas de colágeno<sup>[8,9]</sup>.

Los llamados espacios de Czermack se corresponden con la dentina interglobular, la cual está constituida por matriz orgánica no mineralizada o hipomineralizada que se origina en el límite de la zona amelodentinaria<sup>[1,10]</sup>.

## **C. OTROS ELEMENTOS ESTRUCTURALES**

En la dentina también se pueden observar líneas incrementales o de crecimiento: por un lado encontramos las líneas mayores o líneas de contorno de Owen, y por otro lado las líneas menores o líneas de Von Ebner <sup>[3]</sup>.

### **1.1.1.3. TIPOS DE DENTINA**

Según las características de la formación de la dentina, se pueden distinguir 3 tipos:

### **A. DENTINA PRIMARIA**

La dentina primaria es la primera en formarse, comenzando a secretarse desde el inicio del desarrollo dentinario hasta que el diente entra en oclusión estableciéndose contactos entre cúspides antagonistas. La capa externa de esta dentina es la dentina del manto, que es la primera que se forma y posee una matriz orgánica compuesta por sustancia fundamental y fibras colágenas. El resto de la dentina primaria es la llamada dentina circumpulpar, rodea toda la cámara pulpar y es más mineralizada que la dentina del manto<sup>[1,3]</sup>.

### **B. DENTINA SECUNDARIA, SECUNDARIA FISIOLÓGICA O REGULAR**

La dentina secundaria es aquella secretada de forma fisiológica por el odontoblasto durante toda la vida del diente tras la completa formación de la raíz, produciéndose su formación a una velocidad mucho menor que la primaria. La dentina secundaria se va depositando en el interior de la cámara pulpar y los conductos radiculares, condicionando un descenso gradual del volumen de ambos. Se singulariza por presentar túbulos dentinarios paralelos y rectos. Se puede advertir una línea de reposo entre la dentina primaria y la secundaria <sup>[1,3,11]</sup>.

### **C. DENTINA ESCLERÓTICA**

Esta dentina puede ser fisiológica o patológica. La fisiológica se forma a lo largo de la vida del diente en toda su dentina; la patológica se forma en respuesta a agresiones de baja intensidad, en cuyo caso queda circunscrita a la zona de dicha lesión. En ambos casos, sobre la dentina ya formada se produce una disminución gradual de la luz de los túbulos dentinarios por aposición de la dentina peritubular <sup>[1,12]</sup>.

### **D. DENTINA TERCIARIA, SECUNDARIA REPARATIVA O IRREGULAR**

La dentina terciaria es otro tipo de dentina que se produce en determinadas zonas de la interfase pulpa-dentina como respuesta a agresiones externas (caries, procesos destructivos no cariogénicos, fracturas, etc.). Su espesor dependerá de la duración e intensidad del estímulo, lo que condiciona el descenso irregular del volumen de la cámara pulpar. De forma característica, esta dentina se localiza en aquellos lugares de la cavidad pulpar contiguos al de la actuación del estímulo nocivo. Si los estímulos

nocivos son de grado leve o moderado y durante un período de tiempo prolongado, la dentina terciaria que se forma es más organizada y tubular, y se le denomina dentina terciaria reaccional. Sin embargo, a mayor grado de agresión y durante un corto período de tiempo, la dentina terciaria se forma más rápido, siendo desorganizada y menos tubular, y se le denomina dentina terciaria reparativa <sup>[1,3,13]</sup>.

### **1.1.2. HISTOLOGÍA DE LA PULPA DENTAL**

La pulpa es un tejido conectivo laxo que se encuentra en el interior de la cámara pulpar y de los conductos radiculares, siendo el componente no mineralizado del complejo dentinopulpar <sup>[1,3]</sup>.

#### **1.1.2.1. COMPOSICIÓN**

La pulpa dental está compuesta por materia orgánica en un 25% y por agua en un 75%. La materia orgánica la conforman células (fundamentalmente fibroblastos y células mesenquimatosas indiferenciadas), fibras colágenas y reticulares, y sustancia fundamental, además de vasos sanguíneos y nervios<sup>[3]</sup>.

#### **1.1.2.2. CÉLULAS**

Las células que podemos encontrar en la pulpa dental se encargan de su mantenimiento, defensa y capacidad de reparación, y son muy heterogéneas<sup>[14]</sup>:

##### **A. ODONTOBLASTOS**

Los odontoblastos son las células más características del complejo dentino-pulpar, siendo las encargadas de la formación de la dentina tanto durante el desarrollo como durante el envejecimiento dental. Durante la dentinogénesis dan lugar a los túbulos dentinarios. Son células que se distribuyen en la periferia de la pulpa, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas de longitud variable entre 0,2 a 0,7mm que se alojan en la dentina, de manera que su existencia dentro de los túbulos hace de la dentina un tejido vital. Estas células sintetizan colágeno tipo I, así como proteoglucanos, fosfoproteínas y fosfatasa alcalina, entre otros elementos<sup>[1,3,15]</sup>.

## **B. FIBROBLASTOS**

Los fibroblastos son las células más abundantes en la pulpa, siendo su función formar y mantener la matriz pulpar mediante la síntesis de colágeno I y III, proteoglucanos y mucopolisacáridos. Estas células se encuentran distribuidas por toda la pulpa, localizándose de manera más abundante en la zona rica en células. Se pueden encontrar en estado de reposo o de actividad, y muestran variabilidad entre ellos a nivel del aparato de Golgi, del retículo endoplásmico rugoso y en las vacuolas secretoras<sup>[1,3]</sup>.

## **C. MACRÓFAGOS O HISTIOCITOS**

Los macrófagos son los monocitos que abandonan el torrente sanguíneo, entran en los tejidos extravasculares y se diferencian en subpoblaciones de células. Se localizan en la zona central de la pulpa, preferentemente alrededor de los vasos sanguíneos. Su función es la de participar en el proceso de iniciación de la respuesta inmunológica primaria, procesando antígenos y presentándolos a los linfocitos, además de tener una gran actividad endocítica y fagocitaria<sup>[1,3,16]</sup>.

## **D. CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas son elementos accesorios del sistema inmune. Dentro de este grupo se encuentran los linfocitos, las células plasmáticas y en ocasiones, eosinófilos y mastocitos. Se hallan preferentemente en dos áreas: en la zona perivascular de la pulpa central y en la zona subodontoblástica. Desempeñan la función de inducir la inmunidad dependiente de las células T, ya que son células presentadoras de antígenos<sup>[1,3]</sup>.

## **E. LINFOCITOS**

Los linfocitos son células de defensa que participan en la inmunidad celular, activándose ante la presencia de antígenos, los cuales liberan linfoquinas que provocan vasodilatación pulpar. La pulpa sana únicamente presenta linfocitos de tipo T (fundamentalmente T8 supresores), encontrándose los linfocitos B normalmente ausentes<sup>[1,3]</sup>.

## **F. CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS**

Las células mesenquimáticas son células a partir de las cuales se diferencian otras células conjuntivas de la pulpa. Dependiendo de la estimulación, pueden originar odontoblastos, fibroblastos o macrófagos. Al aumentar la edad pulpar, su número desciende dando lugar a una disminución del potencial de regeneración pulpar<sup>[1,17]</sup>.

## **G. MASTOCITOS**

Son células que presentan en su citoplasma gránulos con histamina, heparina y un anticoagulante. Suelen localizarse en tejidos con inflamación crónica, pero también se hallan en pulpas normales <sup>[3]</sup>.

## **1.2. CÉLULAS MADRE**

Las células madre (CMs) son células indiferenciadas que tienen una gran capacidad clonogénica y de autorrenovación, pudiendo diferenciarse en múltiples linajes celulares, entre los que se encuentran osteoblastos, adipocitos o condrocitos<sup>[18–20]</sup>. Dependiendo de su origen, grado de diferenciación o tejido en el que se encuentren, las CMs pueden ser clasificadas de la siguiente manera<sup>[21–24]</sup>:

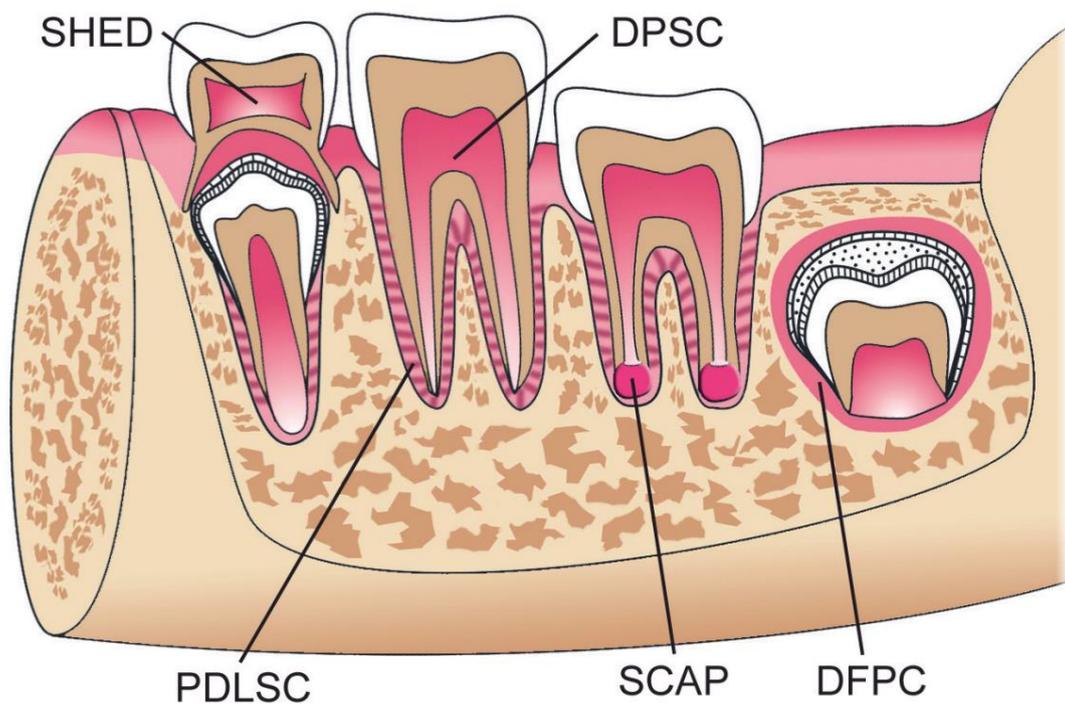
- Células madre totipotentes: son células con la capacidad de generar un embrión completo ya que pueden generar 200 tipos de tejido humano, y además pueden generar tejidos extraembrionarios.
- Células madre pluripotentes: pueden generar un embrión completo, pero no tejido extraembrionario.
- Células madre multipotentes: sólo pueden generar un subconjunto de tipos celulares de acuerdo con su localización.
- Células madre oligopotentes: son células capaces de generar un subconjunto de tipos celulares, pero mucho más limitado.
- Células madre unipotentes: son células capaces de generar un único tipo celular.

### **1.2.1. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDOS OROFACIALES**

Dentro de la cavidad oral existen diferentes tipos de CMs (Figura 2), que se pueden dividir en nueve categorías<sup>[23,25,26]</sup>:

- Células madre procedentes del ligamento periodontal (PDLSCs).

- Células madre procedentes del folículo dental (DFSCs).
- Células madre procedentes de la papila apical (SCAPs).
- Células madre procedentes del tejido gingival (GMSCs).
- Células madre procedentes del tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas (PL-MSCs).
- Células madre procedentes de la lámina propia de la mucosa oral (OMLP-PCs).
- Células madre procedentes de médula ósea de mandíbula (OMSCs).
- Células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs).
- Células madre procedentes de dientes deciduos (SHEDs).



**Figura 2:** Localización de las células madre en la cavidad oral. Tomado de *Dental stem cells-- characteristics and potential. Histol Histopathol*, Bojic, Sanja, y cols.<sup>[27]</sup>.

### 1.2.2. CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE LA PULPA DENTAL

La pulpa dental es un derivado mesenquimatoso de células multipotentes de la cresta neural craneal que migran al primer y segundo arco branquial durante el desarrollo embrionario temprano, lo que indica que las CMs de la pulpa dental tienen su origen en la cresta neural<sup>[28-32]</sup>.

Descubrieron inicialmente las DPSCs de terceros molares humanos impactados en el año 2000<sup>[33]</sup>. Tal descubrimiento abrió una nueva vía de investigación en las ciencias orales. En las últimas dos décadas hemos sido testigos de un tremendo avance en los estudios de las DPSCs desde la caracterización funcional e investigación mecanicista a los experimentos preclínicos y ensayos clínicos sobre regeneración de la pulpa dental<sup>[33-37]</sup>.

Las DPSCs se obtienen de las exodoncias de terceros molares, pero también de dientes extraídos por indicación ortodóncica y de dientes supernumerarios. Las CMs aisladas de la pulpa dental de estos dientes muestran propiedades altamente proliferativas y multipotenciales<sup>[38-41]</sup>.

Bajo condiciones de diferenciación óptimas tanto *in vitro* como *in vivo*, las DPSCs son capaces de diferenciarse en progenies de múltiples linajes, incluidos odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, melanocitos, células neurogliales, epitelocitos, hepatocitos, endotelocitos y células pancreáticas. Además, las DPSCs muestran una buena capacidad para la formación de neuroesferas, lo que enfatiza su aplicación en enfermedades neurológicas<sup>[42-44]</sup>.

Cuando estas células se trasplantan *in vivo* son capaces de formar tras cinco semanas un complejo dentinario semejante al del diente. Conseguir la obtención de la pulpa es un proceso relativamente sencillo, basta con cortar y separar el cemento del esmalte y a continuación separar cuidadosamente la pulpa de la corona y la raíz. Los marcadores celulares específicos que presentan son: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 Y CD271 siendo negativos para: CD3, CD8, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD71, CD117 y HLA-DR<sup>[43,45-51]</sup>.

### **1.2.2.1. APLICACIONES TERAPEUTICAS**

Las DPSCs se han utilizado ampliamente en la regeneración de tejidos orofaciales y de otros tipos, incluida la pulpa dental y el hueso largo. Se observa además que las DPSCs se caracterizan por presentar potentes propiedades inmunomoduladoras, ya que son capaces de inhibir a las células T-helper 17 y promover a las células T reguladoras para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico y la colitis

experimental<sup>[52-54]</sup>. Las DPSCs ejercen por tanto aplicaciones terapéuticas en múltiples niveles<sup>[38]</sup>:

- **Regeneración del complejo pulpa-dentina**

La aplicación más aparente y prometedora de las DPSCs es la regeneración del complejo dentino-pulpar. La pulpa vital, que actúa como órgano de formación y soporte para la dentina, es fundamental para la longevidad de los dientes. Sin embargo, el tratamiento de conductos como tratamiento no regenerativo no salva la pulpa dental ni la vitalidad del diente, sino que sustituye el tejido pulpar por materiales inorgánicos, lo que culmina con un diente debilitado y desvitalizado, que puede llevar a la fractura o incluso a la pérdida del mismo. La aparición de la endodoncia regenerativa se reconoce como un enfoque prospectivo para la conservación de los dientes. El propósito final de la endodoncia regenerativa es, por lo tanto, regenerar un complejo dentino-pulpar viable que histológicamente se asemeje al tejido original con funciones fisiológicas anticipadas, que incluyen inervación pulpar, inmunidad pulpar, perfusión vascular y formación de dentina tubular<sup>[38,55]</sup>.

En los últimos años, se han llevado a cabo grandes esfuerzos de investigación para avanzar en el proceso de endodoncia regenerativa en virtud del trasplante de células y el alojamiento de células. En la endodoncia regenerativa basada en el trasplante de células, el trasplante de células se considera como el trasplante de las DPSCs exógenas cargadas en andamios biocompatibles incorporados con moléculas de señalización biológica en los conductos radiculares. Para la endodoncia regenerativa se propone en primer lugar la estrategia de trasplante celular y se han logrado avances extraordinarios<sup>[56]</sup>.

También se ha propuesto el trasplante de células para la regeneración de la dentina pulpar, ya que como se ha comentado anteriormente existen estudios *in vivo* que demuestran que después de cinco semanas trasplantadas son capaces de originar un complejo dentinario similar al del diente. De esta manera, cuando el diente sufre una agresión, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a odontoblastos para producir dentina terciaria. No se conocen con exactitud los factores que participan en la diferenciación odontoblástica, aun así se cree que la BMP-2 (proteína

morfogénica ósea 2) favorece la aparición de marcadores como la sialoproteína dentinaria, la cual es fundamental para la formación de dentina<sup>[57,58]</sup>.

Por otro lado, se encuentra la endodoncia regenerativa basada en la búsqueda de células. Para conseguir la regeneración pulpar se aplica un tratamiento únicamente con citoquinas como el uso del factor de crecimiento de fibroblastos básico, el factor de crecimiento del endotelio vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento nervioso y la BMP-7 (proteína morfogénica ósea 7), con la intención de inducir la migración autóloga de células madre. A diferencia del trasplante de células, la estrategia de localización de células ejerce una capacidad regenerativa que depende de señales bioactivas, que se incrustan en andamios libres de células y se liberan posteriormente para reclutar células madre endógenas residentes. Sin embargo, aunque se forman tejidos conectivos con abundantes células, la estrategia de solo citoquinas es difícil de interpretar porque se reclutan células no identificadas con resultados impredecibles<sup>[58-62]</sup>.

- **Estudio de patologías de enfermedades genéticas**

Dada su multipotencia y antecedentes genéticos relacionados con la enfermedad, las SHEDs y DPSCs derivadas de pacientes pueden ser útiles como modelo celular para dilucidar la patología de la enfermedad genética. Se puede utilizar la capacidad de las SHEDs y DPSCs para diferenciarse en neuronas dopaminérgicas, osteoblastos y condrocitos para dilucidar los mecanismos patológicos de varios trastornos genéticos caracterizados por el sistema dopaminérgico del cerebro medio y defectos esqueléticos. El sistema dopaminérgico del mesencéfalo es un sistema modulador difuso que juega un papel vital en múltiples funciones cerebrales, incluidas las funciones motoras, cognitivas y de recompensa. La diferenciación, el desarrollo y la función alterados de las neuronas dopaminérgicas se han demostrado en muchos trastornos neuropsiquiátricos, aunque los mecanismos exactos siguen sin conocerse. Los defectos genéticos también pueden afectar al metabolismo óseo, dando como resultado fenotipos esqueléticos específicos. La disponibilidad de las SHEDs y DPSCs derivadas de pacientes con síndromes como el Síndrome de Rett o el Síndrome de Leigh, con displasia metatrópica, o con desórdenes de espectro autista pueden ayudar a explicar la fisiopatología de enfermedades causadas por variantes

monogenéticas o mutaciones de ácido desoxirribonucleico o ADN mitocondrial y trastornos poligénicos del neurodesarrollo<sup>[63–66]</sup>.

- **Reparación y regeneración de tejidos extraorales**

La caracterización funcional *in vivo* de las DPSCs está estrechamente relacionada con su origen y localización. Durante mucho tiempo se ha creído que las células madre mesenquimales orofaciales (OFMSCs) derivan de las células de la cresta neural en el desarrollo temprano de la cabeza que forman el tejido ectomesenquimatoso. Estudios recientes de rastreo de linaje han revelado además que las DPSCs se originan a partir de la glía asociada a los nervios periféricos. Por lo tanto, las DPSCs poseen la propiedad neural de diferenciarse en neuronas y glía e inducen potentemente la neurogénesis<sup>[67–69]</sup>.

Las DPSCs comparten por tanto características similares con las células madre mesenquimales de la médula ósea humana (BMSCs). Además, en comparación con las BMSCs, la recolección de las DPSCs a partir de dientes humanos extraídos es menos invasiva y más factible. En consecuencia, las DPSCs pueden representar una terapia prospectiva y un candidato atractivo para el trasplante de BMSCs para la ingeniería de tejidos extraorales y la medicina regenerativa<sup>[38,70]</sup>.

Además, las DPSCs residen en un nicho perivascular en el tejido de la pulpa dental posnatal y puede originarse a partir de pericitos, que están reconocidas como células perivasculares. Se ha documentado que las DPSCs contribuyen a la angiogénesis *in vivo*, demostrando propiedades vasculares<sup>[71–74]</sup>.

### **1.3. PATOLOGIA DE CARIES DENTAL**

La caries dental en la dentición permanente es la afección más prevalente entre todas las enfermedades humanas y afecta a más de 2500 millones de personas <sup>[75,76]</sup>. Así mismo, sigue siendo una de las enfermedades crónicas más frecuentes de la infancia y afecta al 60-90% de los niños en todo el mundo <sup>[77]</sup>.

La caries dental y las complicaciones derivadas de la misma pueden agravar o inducir enfermedades sistémicas, que disminuyen de manera considerable la calidad de vida del paciente, provocando además un gran impacto económico <sup>[78]</sup>.

Los estudios publicados en las últimas dos décadas mostraron el impacto negativo de la caries dental en todos los aspectos de la vida relacionados con la salud bucal en la infancia, la edad escolar, la adolescencia, la edad adulta y entre los ancianos <sup>[79]</sup>.

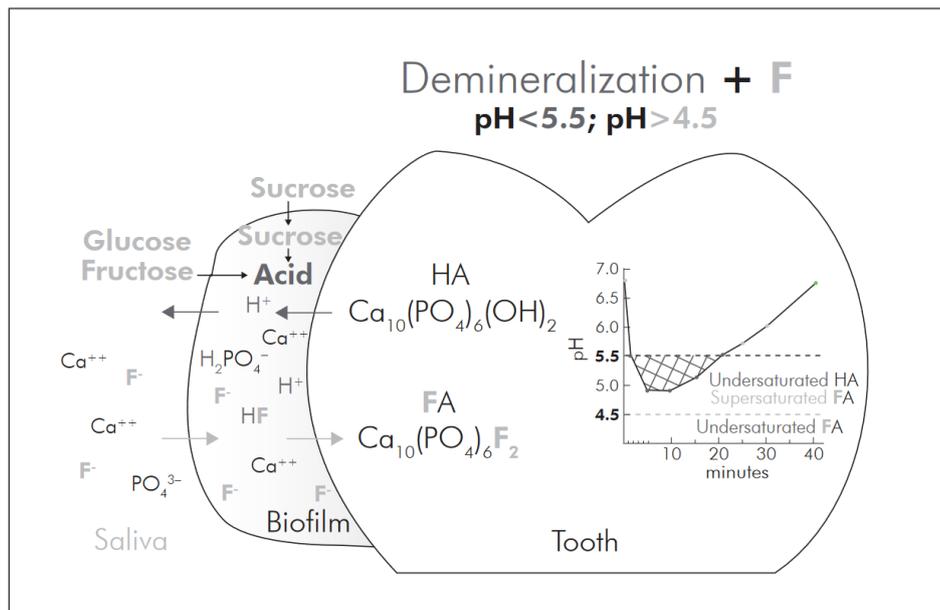
Además, la caries dental afecta el rendimiento académico, conduce a la pérdida de horas de trabajo y genera costos directos e indirectos para el individuo y la sociedad, incluida la pérdida de productividad <sup>[75]</sup>.

### **1.3.1. ETIOLOGÍA**

La caries es una enfermedad biofilm-azúcar dependiente que se encuentra modulada por múltiples factores y siendo por tanto no erradicable pero si controlable <sup>[80]</sup>. Por tanto, la presencia de placa bacteriana adherida a los dientes es un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de la caries, siendo la exposición frecuente a los azúcares el factor determinante. Además, también supondrán factores de riesgo un flujo de saliva reducido o una alteración en la composición de la misma<sup>[81]</sup>.

Los azúcares dietéticos suponen el principal aporte de nutrientes. Entre ellos se encuentra la sacarosa, la cual se considera el carbohidrato dietético más cariogénico ya que es fermentado a ácidos por el biofilm bacteriano, pero también porque puede metabolizarse a polisacáridos intracelulares y extracelulares<sup>[82]</sup>.

Las bacterias obtienen energía mediante la metabolización de los hidratos de carbono, de manera que ante la presencia de los mismos se produce un aumento del metabolismo y crecimiento de bacterias acidúricas y acidogénicas. A partir de la fermentación de los azúcares de la dieta estos microorganismos sacarolíticos y acidogénicos generan ácidos que inducen una reducción en el pH, la cual promoverá una pérdida de mineral de la estructura dental<sup>[80,82]</sup>.



**Figura 3:** Desmineralización del esmalte en presencia de flúor en el biofilm. Tomado de *Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?*, Jaime Cury <sup>[83]</sup>.

Cuando el pH del entorno oral cae por debajo de un valor crítico de 5,5 para el esmalte, los iones  $H^+$  aumentados se acoplan con los iones de calcio y fosfato libres para cambiar la ecuación a la desmineralización que provoca la disolución del cristal de hidroxiapatita y provoca la pérdida de calcio y fosfato de la estructura dental (Figura 3). Si esta situación se mantiene durante cierto período de tiempo se genera una lesión de caries incipiente<sup>[84–86]</sup>.

#### 1.4. TRATAMIENTO RESTAURADOR DE LA CARIES DENTAL

El tratamiento de las lesiones de caries dental puede ser mediante un abordaje convencional de perforación y obturación, usando instrumental rotatorio, o bien mediante un abordaje atraumático, usando únicamente instrumentos manuales. Se pueden utilizar diferentes materiales de restauración para estos dos enfoques <sup>[87]</sup>.

##### 1.4.1. TRATAMIENTO RESTAURADOR CONVENCIONAL

El abordaje más común para el tratamiento de la caries en la clínica dental se corresponde con el tratamiento convencional mediante la utilización de resinas compuestas<sup>[88]</sup>.

Este enfoque convencional implica el uso de instrumental rotatorio, siendo el ruido derivado del mismo un obstáculo para la relajación del paciente o incluso puede inducir miedo o ansiedad en pacientes pediátricos o con necesidades especiales <sup>[89]</sup>. Suele ser necesaria la utilización de anestesia local para la realización del procedimiento, con el objetivo de controlar la sensibilidad y el dolor asociado con la preparación de la cavidad <sup>[89,90]</sup>.

El material restaurador de elección suele ser la resina compuesta, por lo que la utilización de dique de goma es una condición imprescindible para afianzar el éxito de la restauración <sup>[91,92]</sup>.

Además, se ha demostrado que este enfoque tiene un mayor riesgo de exposición pulpar, síntomas pulpares posoperatorios y debilitamiento del diente como resultado de una extracción de caries más invasiva <sup>[93]</sup>.

#### **1.4.2. TRATAMIENTO RESTAURADOR MÍNIMAMENTE INVASIVO**

Los últimos avances en Odontología se han enfocado en la Odontología Mínimamente Invasiva (OMI) como alternativa al tratamiento restaurador convencional. La OMI aborda la caries desde el punto de vista biológico en vez de quirúrgico, el cual se basa en conocer el proceso de formación de la caries y el potencial de remineralización que posee el diente. La OMI tiene como objetivo conservar al máximo el tejido dentario, ya que es la mejor forma de afianzar la vida útil de un diente que va a ser restaurado en la cavidad oral <sup>[94]</sup>.

Las preparaciones cavitarias mínimamente invasivas están orientadas a la remoción selectiva de la dentina cariada, preservando así el esmalte y dentina sanos durante el tratamiento. Esta técnica se basa en la remoción únicamente de la dentina infectada, preservando la dentina afectada, dadas las diferentes características que presentan respecto a carga bacteriana y desnaturalización del colágeno. Esto permite limitar por un lado el posible aumento de la temperatura durante la remoción de la caries, que podría originar daños irreversibles en la pulpa dental, y por otro lado limitar los estímulos dolorosos que inciden negativamente en el nivel de estrés del paciente <sup>[95-98]</sup>.

La OMI adopta así una filosofía que integra varios conceptos: detectar y prevenir los factores de riesgo, controlar la susceptibilidad individual de cada paciente, diagnosticar de manera precoz la caries dental, remineralizar el esmalte, y colocar y sustituir restauraciones realizando una mínima intervención <sup>[99]</sup>.

Esta filosofía incluye técnicas como la abrasión por aire, la técnica de restauración atraumática (ART), la sono-abrasión, la eliminación de la caries mediante la utilización de láser y la eliminación químico-mecánica de caries (CMRC). A continuación describiremos las técnicas más frecuentemente empleadas en clínica <sup>[100]</sup>.

#### **A. TÉCNICA DE RESTAURACIÓN ATRAUMÁTICA**

El tratamiento restaurador atraumático de la caries dental tiene como objetivo la máxima conservación del diente con el menor impacto psicológico en el paciente <sup>[101]</sup>. Este abordaje mínimamente invasivo de la caries se basa en la eliminación del tejido cariado de manera manual únicamente, utilizando cucharillas de remoción de caries, por lo general sin el uso de anestesia ni instrumental rotatorio, utilizando un material adhesivo para restaurar la cavidad dental<sup>[102]</sup>.

De acuerdo con este enfoque, en la eliminación del tejido cariado con cucharillas de remoción de caries se busca la eliminación de la dentina infectada, preservando la dentina afectada <sup>[103]</sup>.

Los materiales de elección predominantes para ART son los cementos de ionómero de vidrio (GIC), pudiendo seleccionar un ionómero de vidrio puro, un ionómero de vidrio de alta densidad, o un ionómero de vidrio modificado con resina. Entre los materiales de restauración adhesivos para ART podemos encontrar también los compómeros <sup>[89,104,105]</sup>.

El manejo de la caries dental siguiendo el enfoque de ART da como resultado un comportamiento menos estresante, pudiendo experimentar menos ansiedad y dolor dental en comparación con los enfoques de atención estándar <sup>[91,103,106]</sup>.

#### **B. TÉCNICA DE ELIMINACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA**

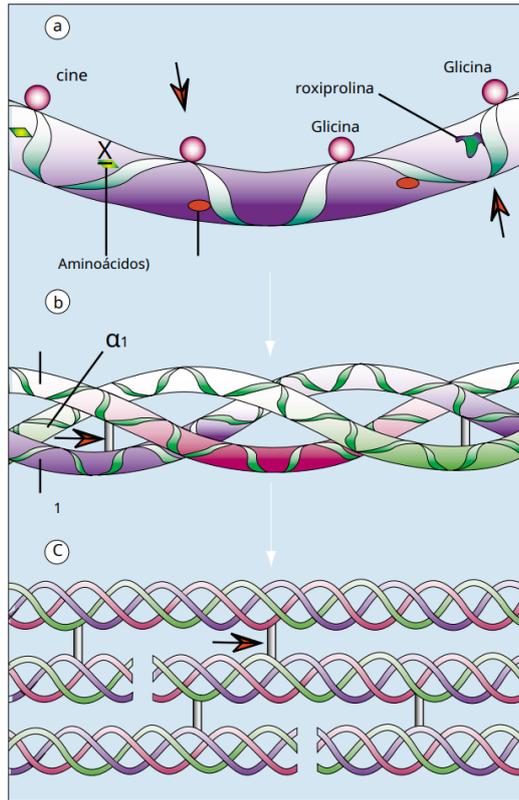
Dentro del concepto de mínima intervención podemos incluir la remoción de caries químico-mecánica. El principio de ésta técnica es la promoción de una intervención

mínimamente invasiva utilizando productos de diferentes agentes químicos sobre la dentina que provocan el ablandamiento del tejido cariado facilitando su eliminación con instrumentos manuales <sup>[107]</sup>.

El mecanismo de acción de los agentes de remoción química de caries se basa en la degradación del colágeno. Se pueden distinguir dos zonas dentro de la lesión de caries: una capa interna que está parcialmente desmineralizada y puede remineralizarse y en la que las fibrillas de colágeno aún están intactas, y una capa externa donde las fibrillas de colágeno están parcialmente degradadas y no pueden remineralizarse <sup>[108]</sup>.

La idea de la eliminación de caries químico-mecánica fue desarrollada en la década de 1970 por el endodoncista Goldman usando hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl al 5%) para eliminar materiales orgánicos en los conductos radiculares<sup>[109]</sup>.

El reactivo involucrado se genera mezclando aminoácidos con hipoclorito de sodio, de manera que se forman N-monocloroaminoácidos que degradan selectivamente el colágeno desmineralizado de la dentina cariada. Este reactivo CMCR debe poder causar más degradación de este colágeno parcialmente degradado, por escisión de las cadenas polipeptídicas en la triple hélice y/o hidrolización de los entrecruzamientos (Figura 4) <sup>[110]</sup>.



**Figura 4:** a) Ruptura del colágeno por acción de un agente químico de remoción de caries. Cadena polipeptídica. Los posibles sitios de escisión por reactivos químico-mecánicos de eliminación de caries por degradación de glicina o hidroxiprolina se indican con flechas rojas. b) Triple hélice. Los sitios de escisión por degradación de enlaces cruzados intramoleculares se muestran con flechas rojas. c) Unidades de tropocolágeno ensambladas para formar una fibrilla de colágeno. Los sitios de escisión por degradación de enlaces cruzados intermoleculares se indican mediante flechas rojas. Tomado de *Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments*, Beeley JA, Yip <sup>[110]</sup>.

## 1.5. MATERIALES PARA LA REMOCIÓN QUÍMICO-MECÁNICA DE CARIES

Los avances en la odontología mínimamente invasiva, y en concreto en la remoción química de la caries se han enfocado en el desarrollo de materiales de remoción química de caries que contienen papaína como principal principio activo<sup>[111]</sup>.

La papaína es una endoproteína que se extrae del látex de hojas y frutos de la papaya verde adulta. Esta endoproteína es similar a la pepsina humana y actúa como agente

desbridante degradando las proteínas del tejido cariado, teniendo además acción bactericida, bacteriostática y antiinflamatoria<sup>[111]</sup>.

La papaína actúa degradando la unión entre las fibras de colágeno Tipo I no mineralizadas que se encuentran parcialmente destruidas por la acción de la caries, de manera que la ausencia de anti-tripsina en la dentina infectada permite a la papaína romper las moléculas de colágeno parcialmente degradadas, ayudando a la degradación y eliminación del “manto” de fibrina formado por un proceso carioso. La papaína ejerce su efecto únicamente en el tejido cariado al carecer de la antiproteasa plasmática denominada anti-tripsina. Ésta solo está presente en el tejido sano e inhibe la digestión de proteínas, impidiendo así la acción proteolítica en la dentina sana. <sup>[111-113]</sup>.

Con base en estos descubrimientos, se lanzó al mercado una nueva generación de productos CMRC basados en enzimas, entre los que se encuentran Papacárie Duo<sup>®</sup>, BRIX3000<sup>®</sup>, Cariesolut y NATURAL-CARE <sup>[111,114,115]</sup>.

De estos cuatro productos, tres comparten el mismo principio activo, la papaína. BRIX3000<sup>®</sup> es un gel cuyo principio activo es la papaína al 10%, presentando en su composición 30.000 U/mg. También tiene en su composición excipientes como el propilenglicol, la pectina cítrica, la tetranolamina y el azul de toluidina entre otros. Papacárie Duo<sup>®</sup> presenta en su composición papaína 6.000UI/mg, la cual le otorga propiedades bacteriológicas, bacteriostáticas y antiinflamatorias. También presenta en su composición cloramina, la cual es bactericida y desinfectante y ayuda a ablandar la dentina cariada, y azul de toluidina, el cual potencia la acción antibacteriana de los demás componentes. El agente de remoción química de caries NATURAL-CARE también está compuesto por papaína, cloraminas y azul de toluidina. Respecto a Cariesolut, el fabricante indica que está compuesto por gluconato de clorhexidina, ácido cítrico, hidroxipropilmetilcelulosa, agua pura, etc. <sup>[111,116,117]</sup>.

Todos estos materiales comparten un protocolo similar con algunas salvedades, aconsejando el fabricante en todos los casos preparar la cavidad previamente con instrumental manual o rotatorio hasta lograr una cavidad expulsiva. Posteriormente las instrucciones de los diferentes materiales aconsejan utilizar un aislamiento

relativo con rollos de algodón, aplicar el producto sobre la cavidad y esperar durante un tiempo determinado, el cual varía para cada material. El tiempo de aplicación del material es el paso en el que más se diferencian las instrucciones de uso de los diferentes materiales: en el caso de Papacárie Duo<sup>®</sup>, el fabricante aconseja dejar actuar el producto entre 30 y 60 segundos; BRIX3000<sup>®</sup> requiere un tiempo de actuación de 2 minutos; NATURAL-CARE indica una aplicación de 2 a 3 minutos; en el caso de Cariesolut el fabricante aconseja esperar hasta que el gel ablande completamente el tejido cariado. Pasado el tiempo de actuación recomendado en cada caso, se debe retirar el material con una cucharilla de remoción de caries con movimientos pendulares y sin presión. Según el fabricante, este procedimiento se puede repetir hasta lograr la presencia de dentina sana y poder así colocar inmediatamente el material de obturación.

Los productos utilizados para la CMCR cobran protagonismo ante la presencia del SARS-CoV-2 (COVID-19), ya que el riesgo potencial de infección cruzada durante la remoción de caries incita a evitar tratamientos convencionales con instrumentos rotatorios, para su sustitución por técnicas de baja producción de aerosoles como CMCR <sup>[118]</sup>.

A pesar de aumentar el tiempo de los tratamientos, la aplicación clínica de CMCR también ha demostrado reducir la ansiedad, el dolor, así como la necesidad de anestesia, y esto los convierte en materiales muy adecuados para el tratamiento de pacientes ansiosos o médicamente comprometidos, así como para la odontología pediátrica y domiciliaria <sup>[110,118]</sup>.

Sin embargo, existen algunas limitaciones en el sistema de remoción química de caries. Es posible que, aun utilizando este sistema, se necesiten instrumentos rotatorios para la eliminación de tejido o material que no sea colágeno dentinario degradado. Esto incluye el acceso a lesiones cariosas pequeñas o interproximales, la eliminación del esmalte que recubre la caries, la eliminación de restauraciones existentes, etc. También debe tenerse en cuenta que la utilización de CMRC supone añadir un paso en el proceso de la remoción de la caries, aumentando por tanto el tiempo total del procedimiento de restauración de la caries. Así mismo, la utilización

de agentes de remoción química de caries supone un encarecimiento del tratamiento<sup>[112]</sup>.

## **1.6. BIOCOMPATIBILIDAD**

La totalidad de los materiales dentales empleados en la consulta odontológica, de acuerdo con su aplicación, estarán en contacto con tejido óseo, gingival, muscular, mucoso y pulpar, y también con fluidos como sangre y saliva. Por lo tanto, como sustitutos artificiales que interaccionan con el organismo, se debe determinar la biocompatibilidad de los mismos mediante la realización de diferentes pruebas de laboratorio<sup>[119]</sup>.

Es imperativo tener en cuenta que existen ciertos estándares internacionales para las pruebas de biocompatibilidad, incluidas las series ISO 10993 (10993-5, 10993-12) e ISO 7405<sup>[120-122]</sup>, que incluyen pruebas conocidas y de uso común. Esta misma norma recomienda, siempre que sea posible, llevar a cabo ensayos *in vitro* previos. Como tipo celular pueden utilizarse fibroblastos, linfocitos, osteoblastos, etc. Es muy común la utilización de las líneas de células inmortales o continuas por su larga duración y disponibilidad, pero presentan el inconveniente del elevado coste, además de que pueden resultar menos sensibles a sustancias tóxicas que las células primarias o finitas. Por esta misma razón también se utilizan las células obtenidas de cultivos primarios adecuadamente obtenidos y caracterizados<sup>[123,124]</sup>.

Uno de los aspectos principales de las pruebas de biocompatibilidad es la evaluación de la toxicidad. La toxicidad del material revela su capacidad para dañar un sistema biológico. Dicha capacidad comienza a nivel celular, pudiendo la toxicidad tisular local dar lugar a efectos sistémicos. En la remoción química de la caries, las reacciones locales ocurren principalmente en la pulpa. La evaluación de toxicidad más común es la prueba de citotoxicidad que define el efecto del material sobre la viabilidad celular. Las pruebas de citotoxicidad son pruebas primarias de biocompatibilidad que especifican la lisis de las células y la inhibición de la proliferación celular<sup>[124]</sup>.



# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

### Objetivo principal:

Comparar las propiedades biológicas de cuatro materiales de remoción química de caries mediante la evaluación de la biocompatibilidad de los mismos.

### Objetivos secundarios:

- Determinar a qué concentración produce cada material de remoción química de caries la inhibición del crecimiento y metabolismo de las células madre de la pulpa dental de diente permanente humano al 50%.
- Evaluar la viabilidad celular de las células madre de la pulpa dental de diente permanente humano en contacto con los materiales de remoción química de caries seleccionados para el estudio.
- Estudiar la migración celular de las células madre de la pulpa dental en presencia de los materiales de remoción química de caries.
- Observar la morfología celular de las células madre de la pulpa dental en contacto directo con los materiales de remoción química de caries, mediante la obtención de imágenes de fluorescencia.
- Valorar el número de especies reactivas de oxígeno producidas tras la aplicación de los distintos materiales.
- Analizar las posibles alteraciones en las diferentes fases del ciclo celular de las células madre de pulpa dental tras aplicar los diferentes materiales de estudio, mediante el ensayo de citometría de flujo.

- Determinar el porcentaje de células de pulpa dental vivas, apoptóticas tempranas y necróticas apoptóticas tardías tras la aplicación de los materiales de remoción química de caries.

La hipótesis nula fue que estos materiales no mostrarían diferencias en su citotoxicidad.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Murcia (Anexo I), y por el Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia (Anexo II). Todos los participantes fueron informados por escrito y firmaron el consentimiento para participar en el proyecto de investigación (ANEXO II y III).

Este estudio se realizó de acuerdo con la Normativa Internacional de Estandarización (ISO 10993:2009) sobre la evaluación de la biocompatibilidad de los productos sanitarios usados en odontología, basándonos en los apartados de preparación de muestras y materiales de referencia (ISO 10993-12:2009)<sup>[120]</sup> y de ensayos de citotoxicidad *in vitro* (ISO 10993-5:2009)<sup>[121]</sup>.

Los materiales de remoción química de caries analizados en este estudio fueron BRIX3000®, Papacárie Duo®, Cariesolut y NATURAL-CARE, cuyas características muestra la Tabla 1.

Los procedimientos que se describirán a continuación para evaluar la biocompatibilidad de los materiales de remoción química de caries fueron realizados sobre células madre de pulpa dental de diente permanente (DPSCs).

**Tabla 1:** Especificaciones de los materiales de remoción química de caries.

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSICIÓN	NÚMERO DE LOTE
<b>BRIX3000®</b>	BRIX SRL. E.B.E. (Santa Fe, Argentina)	Papaína 30.000 U/mg 10 g, Excipientes (propilenglicol, pectina cítrica, trietanolamina, monolaurato de sorbitán, fosfato disódico, fosfato monopotásico, azul de toluidina, agua destilada	L49V10/21
<b>Papacárie Duo®</b>	F&A Laboratório Farmacêutico Ltda-Me Rua Machado de Assis, 470 - Vila Mariana São Paulo - Brasil	Papaína 6000 UI/mg, Cloramina T, tinción azul, Propilenglicol, Polietilenglicol	9637 9703
<b>NATURAL-CARE</b>	Dengen Dental (India)	Papaína, cloraminas y azul de toluidina	ND005
<b>Cariesolut</b>	Easyinsmile (China)	Gluconato de clorhexidina (0,2%-0,5%) (p/p), ácido cítrico, hidroxipropilmetilcelulosa, agua pura, etc.	Sin especificar

### **3.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

Los criterios de inclusión para la conformación de la muestra fueron los siguientes: dientes permanentes con ausencia de caries y patología pulpar, siendo éstos terceros molares con indicación de extracción por parte del Odontólogo o bien premolares con indicación de extracción ortodóncica.

No fueron incluidos en este estudio dientes temporales, tampoco dientes permanentes extraídos que presentaran patología de caries, patología pulpar y/o quistes asociados a las raíces de los mismos.

La muestra se conformó aislando células madre de la pulpa de los dientes permanentes recolectados con un tamaño muestral de n=5.

A continuación, se describen los procedimientos llevados a cabo para obtener los cultivos de células que utilizamos para el estudio.

### **3.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR**

Para la obtención de células de pulpa dental de diente permanente se procedió a la recolección de dientes permanentes tras su extracción.

Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos.

Para el almacenamiento de los dientes recolectados se preparó un tubo de 50 ml, el cual se conservó a una temperatura de entre 4°C y 7°C con el siguiente contenido:

- Medio de cultivo DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest, Nuaille, Francia).
- Solución de antibióticos y antifúngico (HyClone, Utah, EE.UU.):
  - 10 unidades/ml de penicilina G.
  - 10 unidades/ml de streptomina.
  - Antifúngico: 0.25 µg /ml de anfotericina B.
- Suero bovino fetal: 10% (Cytiva, Utah, EE.UU.).

Tras la extracción de cada diente, éste se colocó en una gasa estéril para introducirlo después en el tubo de 50 ml anteriormente mencionado. Los dientes se almacenaron un máximo de 48 horas.

### 3.2.1. EXTRACCIÓN DE LA PULPA DENTAL

Para la extracción celular, y para todos los procedimientos celulares realizados en este estudio, se trabajó en una cabina Tesltar BIO II A (Telstar, Terrasa, España), de seguridad nivel 2 (Figura 5).



**Figura 5:** cabina Tesltar BIO II A.

Para la extracción celular se utilizó el método químico, y para ello se preparó un tubo de 15 ml el cual contenía:

- 1 ml de medio DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest).
- 1 ml de colagenasa tipo I 2X (200 U/mL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- 80  $\mu$ l de dispasa 100mgr/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.)

Los dientes se depositaron en una placa Petri y se lavaron con tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4 estéril (PBS) (Gibco, Grand Island, EE.UU.). Con ayuda de limas manuales de endodoncia de calibres #10 y #15 y de cucharillas de remoción de caries estériles se extrajo la pulpa dental de cada diente y se hidrató con PBS (Gibco).

Con la ayuda de una pipeta los fragmentos de pulpa dental obtenidos se depositaron en el tubo que se preparó anteriormente, el cual contenía la colagenasa.

### 3.2.2. DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA

Se preparó un tubo para llevar a cabo la disgregación enzimática mediante la acción de la solución de proteasas. El tubo contenía:

- 1ml de medio DMEM (Biowest).
- 1 ml de colagenasa 200 U/ml (Roche Diagnostics).
- 80  $\mu$ l de dispasa 100mgr/ml (Thermo Fisher Scientific).

El tejido se incubó en un baño de agua (Ovan, Barcelona, España) a 37 °C (Figura 6) y se agitó cada 1-2 minutos, para optimizar la disgregación del tejido pulpar.

Para favorecer la disgregación enzimática de grandes fragmentos de tejido pulpar, en la cabina Telstar BIO II 500  $\mu$ l de la suspensión fueron sustituidos por 500  $\mu$ l de la preparación enzimática. Se volvió a introducir de nuevo el tubo en el baño de agua a 37 °C para continuar con la disgregación enzimática.



**Figura 6:** Tanque de agua a 37 °C.

Según se iba produciendo la disgregación enzimática, se iba extrayendo suspensión celular para inactivar la colagenasa mediante la adición de medio de cultivo y centrifugación. A los 500  $\mu$ l extraídos del tubo de disgregación se le añadieron 500  $\mu$ l de medio de cultivo en un nuevo tubo. La composición del medio de cultivo fue la siguiente:

- DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest).
- Suero bovino fetal al 10% (Cytiva)

- Antibióticos y antifúngico al 1% (10,000 unidades/ml de penicilina G; 10,000 unidades/ml de streptomina; 25 µg/ml de anfotericina B) (HyClone).
- Glutamina al 1% (glutamina 200mM en 0,85% de solución de cloruro de sodio) (Lonza, Verviers, Bélgica).

La suspensión celular con la colagenasa inactivada se introdujo en un microtubo tipo Eppendorf estéril y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos en la centrífuga (Heraeus, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) (figura 7). Una vez completado el proceso de centrifugación, en la cabina Telstar BIO II se descartó el sobrenadante y se añadieron 9 ml de medio de cultivo celular DMEM anteriormente descrito. Este procedimiento se repitió hasta conseguir disgregar todo el tejido pulpar.



**Figura 7:** Centrífuga.

### **3.2.3. SIEMBRA DE CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE COLONIAS**

Para la obtención de colonias, las células se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Para ello, tras centrifugar se resuspendió el pellet obtenido en medio de cultivo DMEM. Al frasco de cultivo se incorporaron 4,5 ml de medio de cultivo y 500 µl de la suspensión celular.

Los frascos de cultivo obtenidos se introdujeron en una estufa de cultivo (Estufa de cultivo Series 8000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) (Figura 8) y 8,5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 5-6 días.

A las células se les realizó un cambio de medio de cultivo cada 2-3 días, hasta que alcanzan una confluencia cercana al 80%.



Figura 8. Estufa de cultivo.

### 3.3. TRIPSINIZACIÓN

Con el objetivo de aislar las células del frasco de cultivo, se realizó el proceso de tripsinización. Para ello se retiró el medio de cultivo que contenían los frascos con ayuda del pipeteador automático. Se lavó cada frasco de manera independiente con 10 ml de PBS (Gibco) y se añadió la solución de tripsina (trypsin-EDTA 0.25%) (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.). La cantidad de tripsina depende del tamaño del frasco, siendo lo indicado 2 ml de tripsina para un frasco de 25 cm<sup>2</sup>, 3 ml de tripsina para un frasco de 75 cm<sup>2</sup>, y 5 ml de tripsina para un frasco de 175 cm<sup>2</sup>.

Los frascos se incubaron en la estufa a 37 °C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, los frascos se agitaron suavemente y se comprobó en el microscopio de contraste de fases invertido (Motic AE30 Series, Vancouver, Canadá) que las células se encontraban despegadas del fondo del frasco.

La tripsina se inactivó adicionando el doble de medio de cultivo DMEM completo que de tripsina, el cual contenía:

- DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest).
- Suero bovino fetal al 10% (Cytiva)

- Antibióticos (10,000 unidades/ml de penicilina G; 10,000 unidades/ml de streptomina) (Lonza, Verviers, Bélgica).
- Glutamina al 1% (glutamina 200mM en 0,85% de solución de cloruro de sodio) (Lonza, Verviers, Bélgica).

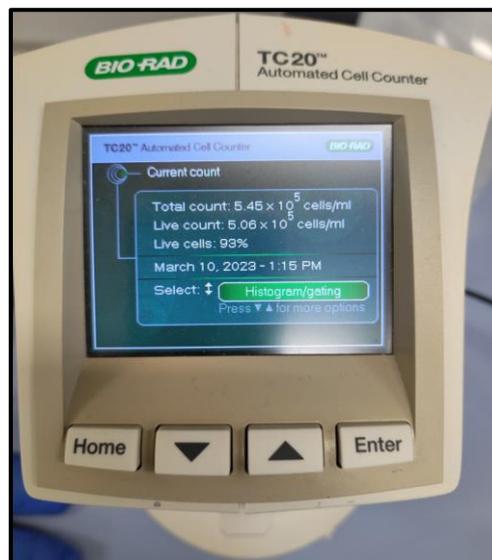
Finalmente se recogió el contenido del frasco y se centrifugó durante 5 minutos a 300 g, una vez centrifugado se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio DMEM completo. Las células se sembraron en frascos de 25cm<sup>2</sup> con 5mL de medio DMEM completo.

### 3.4. RECuento CELULAR

El recuento y estimación de la viabilidad celular se realizaron mediante la tinción con azul tripán.

Este método se basa en el principio de que el colorante penetra tanto en células vivas como en células muertas, pero las células vivas (viables) tienen la capacidad de expulsar dicho colorante, mientras que las células no viables son teñidas de azul.

El recuento se realizó en un contador automático de células (TC20 Automated Cell Counter, BIO-RAD, California, Estados Unidos) (Figura 9).



**Figura 9:** Contador automático celular.

Para realizar dicho proceso se utilizó una dilución 1:1 de suspensión celular y azul tripán, se cargó la cámara de conteo con la mezcla y se introdujo en el contador

automático. EL rango de tamaño celular utilizado fue de 4 a 34  $\mu\text{m}$ . El contador expresa en “células/ml” los resultados de células totales y viables.

### **3.5. ENSAYOS EXPERIMENTALES**

Para evaluar la biocompatibilidad de los cuatro materiales de remoción química de caries se llevaron a cabo los siguientes experimentos: medición de la concentración de inhibición media (IC50), medición de la actividad metabólica celular, ensayo de migración celular, ensayo de inmunofluorescencia, medición de la acumulación de ROS intracelular, análisis de la apoptosis y necrosis celular mediante el marcaje con Annexin-V-FITC y 7-AAD, y análisis del ciclo celular.

#### **3.5.1. MEDICION DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA**

Se realizó una medición de la concentración de inhibición media o IC50 para cada material, con el objetivo de determinar a qué concentración se producía la inhibición del crecimiento y metabolismo celular al 50%. Para ello, se aplicó el ensayo colorimétrico MTT ((3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio) (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.). El MTT es un compuesto que pertenece a la familia de sales de tetrazolio, el cual es soluble en agua y presenta un color amarillo<sup>[125]</sup>.

La acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en concreto a la succinato deshidrogenasa, capaz de reducir el MTT a un compuesto insoluble llamado formazán, el cual es de color morado<sup>[126]</sup>.

La absorbancia del formazán solubilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) se cuantifica midiendo a una cierta longitud de onda con ayuda de un espectrofotómetro. El grado de absorción de luz depende de la concentración de formazán acumulado tanto dentro de la célula como en la superficie celular, dependiendo por tanto de la actividad metabólica de las células vivas. De esta manera, la producción de formazán de MTT es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente viables<sup>[127]</sup>.

Para preparar el stock de MTT se realizó una dilución de MTT (Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/ml. Para ello, se disolvió MTT en polvo en medio de cultivo

DMEM sin suero ni rojo fenol, para evitar que éste interfiera en la lectura de absorbancia. Se filtró disolución de MTT 5mg/ml, se cubrió con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz y se almacenó a una temperatura de 4 °C.

Para este experimento se sembraron placas de 96 pocillos con 2.000-4.000 células y 180 µl de medio DMEM por pocillo, para permitir la adhesión celular se introdujeron las placas en la estufa a 37 °C y 8.5% CO<sub>2</sub> durante 24h.

Para la aplicación del tratamiento a las células madre sembradas anteriormente se siguió un procedimiento idéntico para los materiales de remoción química de caries BRIX3000<sup>®</sup>, Papacarie Duo<sup>®</sup>, Cariesolut y Natural-Care.

Se obtuvieron diferentes diluciones de cada material, aplicando cada tratamiento a las células madre a las siguientes concentraciones: 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% y 0,005%. Para ello, se sacaron de la estufa las placas que contenían las células sembradas, se observaron al microscopio de contraste de fases invertido (Motic AE30 Series, Vancouver, Canadá) para verificar su estado, y se introdujeron en la cabina Telstar Bio II. Una vez en la cabina, se retiraron 180 µl de medio con la pipeta multicanal y se añadieron 120 µl de la dilución que contenía el tratamiento a cada pocillo con la pipeta multicanal.

Una vez aplicado el tratamiento a todos los pocillos, se volvieron a introducir las placas en la estufa durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, la disolución de MTT se atemperó a 37 °C y se aplicó a las placas de 96 pocillos a las que se les administró previamente el tratamiento con los cuatro materiales de remoción química de caries además de los controles necesarios. El protocolo de adición del MTT fue el siguiente:

1. Se retiró medio de cultivo del cultivo celular.
2. Se lavaron los pocillos con PBS (Gibco) atemperado.
3. Se añadieron 200 µL de medio de cultivo sin suero ni rojo fenol.
4. Se añadieron 50 µL de la solución de Stock de MTT (5mg/ml) para conseguir una concentración final de 1 mg/ml.

5. Se cubrieron las placas con papel de aluminio para proteger de la luz, dejando aperturas laterales para permitir que las células pudieran hacer el intercambio gaseoso.
6. Se incubó en la estufa a 37 °C de 2 a 4 horas.
7. Una vez finalizado el tiempo de incubación en la estufa, se retiró el sobrenadante. Debido a la toxicidad del MTT este se desechó al contenedor especial para citotóxicos.
8. Se añadieron 100 µL de DMSO (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polonia) por pocillo y se agitó en un agitador orbital durante un minuto.
9. Se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro INFINITE 200 PRO (Tecan, Grödig, Austria), a 570 nm y 690 nm.
10. Se calculó la media y la desviación estándar de todas las repeticiones.

### **3.5.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR**

El ensayo de actividad metabólica celular, conocido comúnmente como MTT es un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica celular. Este método se utilizó para determinar el efecto citotóxico de los materiales objeto de estudio sobre cultivos de células en diferentes tiempos de exposición, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido que resulta en su actividad metabólica<sup>[128]</sup>.

Se realizó el experimento de medición de la actividad metabólica celular a las 24, 48 y 72 horas para cada material de manera independiente. Para ello se sembraron placas de 96 pocillos, con 1.500-3.000 células por pocillo. La siembra de estas placas se realizó de la misma manera que fueron sembradas las placas del experimento de IC50.

Teniendo como referencia los resultados obtenidos del IC50 se seleccionaron las concentraciones de los materiales de remoción química de caries para realizar los experimentos de MTT y migración celular. Siguiendo dicho razonamiento, las concentraciones a las que se prepararon los materiales para realizar los experimentos fueron el 0,01%, el 0,1% y el 2%.

El protocolo de adición del MTT fue el mismo que se describe anteriormente para la realización del experimento del IC50, con la salvedad de que las placas con el MTT incorporado se incubaron en la estufa durante 24, 48 y 72 horas.

### **3.5.3. EXPERIMENTO DE MIGRACIÓN CELULAR**

El experimento de migración celular se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o herida. Las células en el borde de la brecha se moverán y proliferarán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida. El experimento permite analizar tanto la velocidad de migración de la monocapa como el movimiento de células individualmente<sup>[129,130]</sup>.

El ensayo se realizó para cada material al 2%, 0,1 % y 0,01%, las células se sembraron en placas de 12 pocillos con 200.000 células por pocillo en un volumen total de 2 ml, preparando también grupos control sin tratamiento. Las placas se introdujeron en la estufa a 37 °C y 8.5 CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir el crecimiento y la adhesión celular.

El protocolo que se llevó a cabo para el experimento de migración celular fue el siguiente:

1. Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 100%.
2. Se le realizó a cada pocillo una brecha o herida con la ayuda de una punta de micropipeta en forma de cruz.
3. Se retiró la totalidad del medio de cultivo de los pocillos.
4. Se realizó un lavado con PBS estéril (Gibco), incorporando 2 ml a cada pocillo y agitando suavemente.
5. Se aplicó el tratamiento por triplicado para cada concentración y se preparó el control con solo medio de cultivo.
6. Tras aplicar el tratamiento, se utilizó un microscopio de contraste de fases invertido (Nikon Eclipse Ti-S, Japón), para la obtención de las imágenes iniciales con la capturadora de imágenes (Nikon Digital Sight, Japón), registrando una imagen de la brecha de cada pocillo.

Se registraron cuatro tiempos por experimento, de manera que las imágenes se capturaron a las 0, 24, 48 y 72 horas, seleccionando siempre la misma localización en el pocillo con el objetivo de poder comparar los cambios producidos en la brecha como consecuencia de la migración celular. Las imágenes fueron analizadas con ayuda del software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.).

### **3.5.4. EXPERIMENTO DE INMUNOFLORESCENCIA**

Para estudiar la morfología celular, se utilizó el experimento de inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia es una técnica que se utiliza para la detección y localización de antígenos celulares, mediante la tinción con fluorocromos. El microscopio de fluorescencia excita el fluorocromo con luz a una longitud de onda determinada y recoge la señal emitida generando una imagen<sup>[131]</sup>.

Para el estudio del núcleo celular se utilizó la tinción de células con 4,6- diclorhidrato de diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Este fluorocromo tiene la capacidad de, estando la célula fijada previamente, atravesar la membrana celular y unirse al ADN dando lugar a una fluorescencia con una longitud de onda de excitación/emisión máxima de 358/461 nm, obteniendo imágenes donde el ADN y por tanto el núcleo celular se visualizan de color azul<sup>[132]</sup>.

Para el estudio del citoesqueleto se llevó a cabo la tinción con Faloidina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), ya que es capaz de unirse a los filamentos actínicos del citoesqueleto, permitiendo así observar los polímeros de actina del citoesqueleto en color rojo al producir una longitud de onda de excitación/emisión máxima de 585/613 nm<sup>[132,133]</sup>.

Para el experimento de inmunofluorescencia se sembraron placas de 24 pocillos con una densidad de 10.000 células por pocillo y un volumen total de 500 µl por pocillo. Se introdujeron en la estufa a 37 °C y 8.5 CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir la adhesión de las células, transcurrido este tiempo se aplicó el tratamiento con los cuatro materiales al 2%, 0,1% y 0,01%.

Pasadas 72 horas de la aplicación del tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS (Gibco) tres veces. Las células se fijaron con

paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, tras lo cual se lavó tres veces con PBS. Para permeabilizar la membrana de las células se utilizó una dilución al 0.25% de Tritón X100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en PBS durante 5-15 minutos (0,125ml en 50ml de PBS). Para eliminar el Tritón se lavó con PBS tres veces. Las células se marcaron con Faloidina (ThermoFisher Scientific) (solución de 20µl de stock en 5,98ml de PBS) añadiendo 300 µl durante un período de tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó después mediante lavados con PBS. Posteriormente se marcaron las células con 4,6- diclorhidrato de diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ThermoFisher Scientific) añadiendo 500 µl de DAPI (dilución 1/500 en PBS, 20µl de stock en 10ml de PBS) durante un total de 5 minutos, para después lavar los pocillos con PBS. El DAPI se encontraba en una dilución de 1/500 en PBS, 20µl stock en 10ml de PBS.

Las placas se observaron en el microscopio de contraste de fases con fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania).

### **3.5.5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR**

Para analizar las posibles alteraciones en las diferentes fases del ciclo celular de las DPSCs tras aplicar los diferentes materiales se llevó a cabo la medición del ciclo celular mediante el ensayo de citometría de flujo. Este ensayo se basa en el análisis del contenido del ADN mediante la tinción de las células con yoduro de propidio (IP) (ThermoFisher Scientific), el cual es un fluorocromo que se unen a los ácidos nucleicos por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear<sup>[134]</sup>.

Por lo tanto, la medición de su intensidad de fluorescencia permite la identificación de las distintas fases del ciclo celular, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M, que difieren entre sí por su contenido de ADN<sup>[135]</sup>.

A la hora de interpretar los resultados han de tenerse en cuenta los cambios que se producen en cada fase, siendo la G<sub>0</sub> una fase de reposo celular, mientras que en la fase G<sub>1</sub> las células se preparan para sintetizar ADN, y la fase S es el período de síntesis de ADN, preparándose la célula para la división celular en la fase G<sub>2</sub>, y siendo finalmente en la fase M donde se produce la división celular<sup>[136]</sup>. Por tanto, las células

de las fases G1 y G0 tienen la mitad del contenido de ADN en comparación con las células de las fases G2 y M<sup>[135,136]</sup>.

Para este experimento se sembraron células en frascos de 25cm<sup>2</sup>. Se aplicó el tratamiento para cada material al 2%, 0,1% y 0,01% junto con un control sin tratamiento, con un tiempo total de exposición de 72 horas. El protocolo del experimento fue el siguiente:

1. Se preparó una suspensión celular en 200 µl de PBS (Gibco).
2. Se fijaron las células con etanol añadiendo 2 ml de una mezcla etanol-PBS (70%-30%).
3. Se incubaron a 4 °C durante 30 minutos.
4. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
5. Se resuspendió la suspensión celular en 800 µl de PBS.
6. Se observaron las muestras al microscopio para verificar la ausencia de células agregadas. En el caso de que las hubiera, se pasaron por una jeringuilla con aguja de calibre 25.
7. Se añadieron 100 µl de RNasa (1mg/ml) y 100 µl de IP (400 µl/ml).
8. La suspensión celular se incubó a 37 °C durante 30 minutos
9. Se realizó el análisis del ciclo celular en el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ X-20 (Figura 10) utilizando el software ModFit LT V5.0.9 (Verity Software House, Cytonome Verity, Oak Park Drive, Bedford).



**Figura 10:** Citómetro de flujo BD LSRFortessa™ X-20.

### **3.5.6. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO INTRACELULAR**

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas químicamente activas derivadas del oxígeno (incluyen superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, así como ion hidroxilo), las cuales son capaces de oxidar otras moléculas<sup>[137,138]</sup>.

En condiciones fisiológicas, la producción de pequeñas cantidades de ROS forma parte del metabolismo celular que actúa como regulador de procesos activados por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otros estímulos. Sin embargo, cuando las células se exponen a estímulos patológicos se genera continuamente un exceso de ROS como subproducto natural de las reacciones metabólicas aeróbicas en las mitocondrias. Como consecuencia, la producción incontrolada de ROS altera o destruye componentes celulares y modifica la expresión de genes<sup>[138-141]</sup>.

Por tanto, la medición de los niveles de ROS tiene como objetivo determinar la producción de especies reactivas del oxígeno generadas bajo distintas condiciones.

Para este experimento se sembraron células en placas de 6 pocillos (Figura 11), con el objetivo de obtener unas 100.000 células por pocillo, en un volumen de 2 ml. Las

placas se introdujeron en la estufa a 37 °C y 8.5 CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir el crecimiento y la adhesión celular.



**Figura 11.** Siembra de células en placas de 6 pocillos.

A las células se les aplicaron los diferentes tratamientos al 2%, 0,1%, 0,01% y se cultivaron durante 72 horas a 37 °C.

Los niveles de ROS intracelulares en las células de pulpa dental a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos, y en un control sin tratamiento, se cuantificaron mediante citometría de flujo utilizando el indicador de estrés oxidativo general 5-( $\gamma$ -6)-clorometil-2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM -H2DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.).

Las células se separaron con el reactivo de disociación TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se tiñeron con 5  $\mu$ mol/L de CM-H2DCFDA en condiciones de oscuridad durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se cuantificó la fluorescencia intracelular utilizando un citómetro de flujo LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) a una excitación de 492 nm y una emisión de 517 nm. Finalmente, las células positivas para CM-H2DCFDA se analizaron con el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EE. UU.). Todas las condiciones experimentales se analizaron de manera independientemente por triplicado.

### 3.5.7. MEDICIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS

Para determinar el porcentaje de células de pulpa dental vivas, apoptóticas tempranas y necróticas apoptóticas tardías tras la aplicación de los materiales de remoción química de caries se realizó el ensayo de apoptosis/necrosis.

Este ensayo mide en tiempo real la exposición de Fosfatidilserina (PS) en la superficie de las membranas celulares durante el proceso apoptótico. La fosfatidilserina es un fosfolípido que constituye el componente principal de la membrana plasmática que, en las células sanas, se encuentra en la hemicapa interna de la misma. Durante la apoptosis, la PS se desplaza a la lámina externa de la membrana plasmática, donde suele medirse mediante conjugados de anexina V marcados con fluorescencia, permitiendo esto identificar a las células en sus diferentes estadios<sup>[142-144]</sup>.

La anexina es un biomarcador efectivo en células apoptóticas ya que se une preferentemente a fosfolípidos cargados negativamente como la PS, lo que permite medir la exposición a fosfatidilserina en la membrana de dichas células apoptóticas<sup>[145]</sup>.

Los números dentro de los gráficos de densidad representan porcentajes de células vivas (Q4), apoptóticas tempranas (Q3) y necróticas apoptóticas tardías (Q1 y Q2) en diferentes concentraciones (2%, 0,1 % y 0,01 %) y son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado para cada material.

Para este experimento se cultivaron placas de 6 pocillos de manera idéntica a la descrita en el anterior experimento. Las células se cultivaron, por un lado, únicamente en medio de cultivo completo (control) y, por otro lado, en medio completo que contenía los diferentes tratamientos de remoción química de caries a concentraciones del 2%, 0,1 % y 0,01 % durante 72 horas a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron y tiñeron con anexina-V marcada con FITC y 7-AAD (Immunostep, Salamanca, España) durante 15 minutos a temperatura ambiente siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Finalmente, las células se introdujeron en un citómetro de flujo BD FACS Canto™ (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), y los porcentajes de células vivas y

apoptóticas/necróticas o células marcadas se analizaron con el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, O, EE. UU.). Todas las condiciones experimentales se replicaron independientemente por triplicado y se analizaron en tres experimentos separados.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

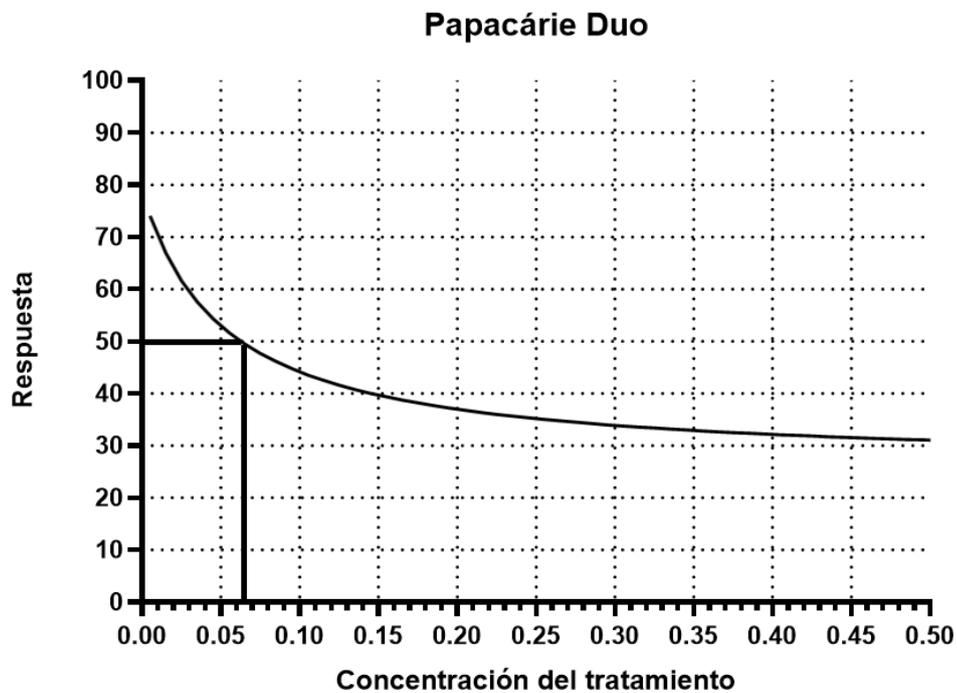
Todos los datos presentados son de experimentos realizados al menos 3 veces. Para la cuantificación, los datos se calcularon como medias y desviaciones estándar (DE). La normalidad en la distribución de los datos se confirmó previamente mediante un gráfico Q-Q. La significación estadística se probó usando ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey usando Graph-Pad Prism v8.1.0 (GraphPad Software). Cada dilución se consideró un tratamiento independiente, en las representaciones gráficas \* indica un valor P inferior a 0,05, \*\* indica un valor P inferior a 0,01 y \*\*\* indica un valor P inferior a 0,001.

# RESULTADOS



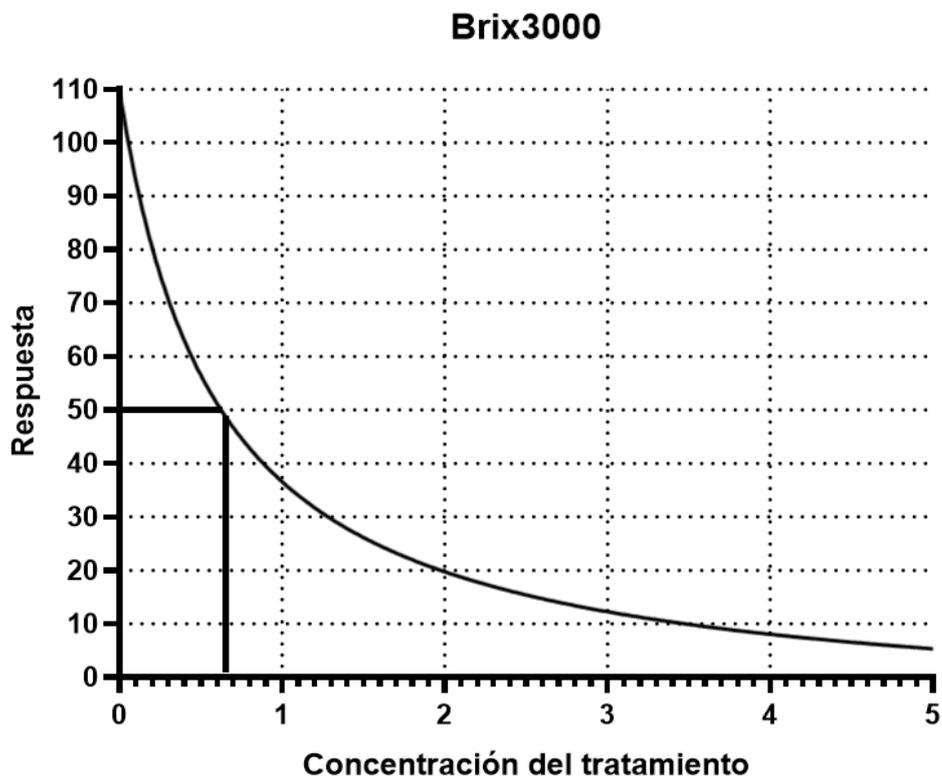
## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE IC 50



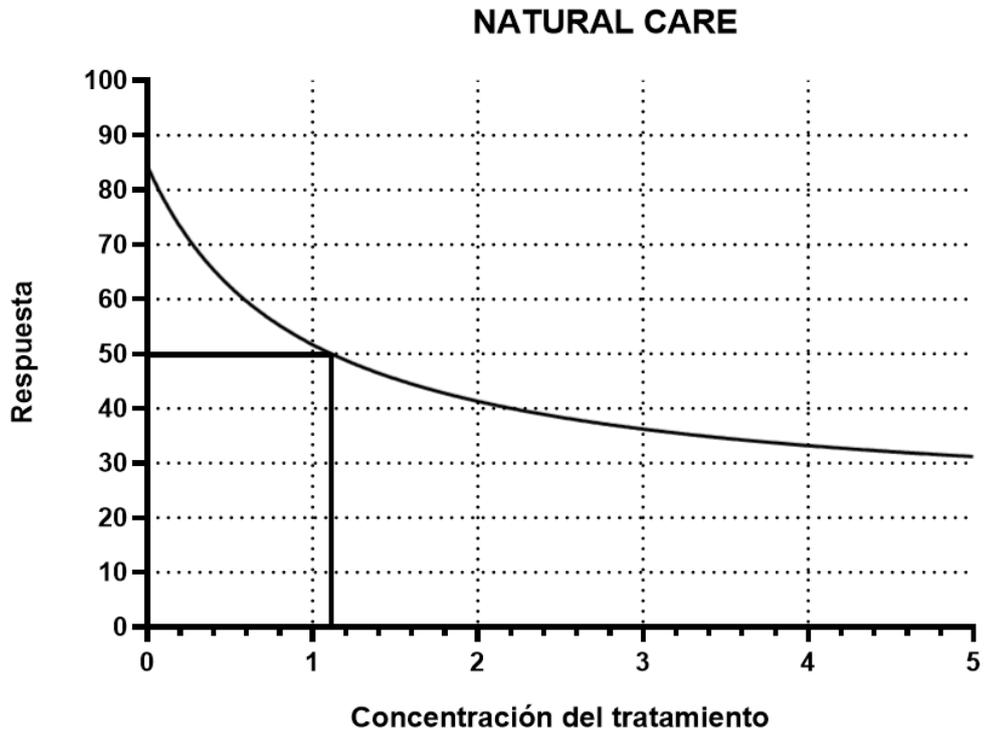
**Figura 12.** Concentración de inhibición media de Papacárie Duo®.

Con una concentración del 0,0524% de Papacárie Duo® se observa un 50% de actividad metabólica. A medida que aumentó la concentración del material, la viabilidad celular no disminuyó de manera proporcional, sino que se mantuvo en valores estables (Figura 12).



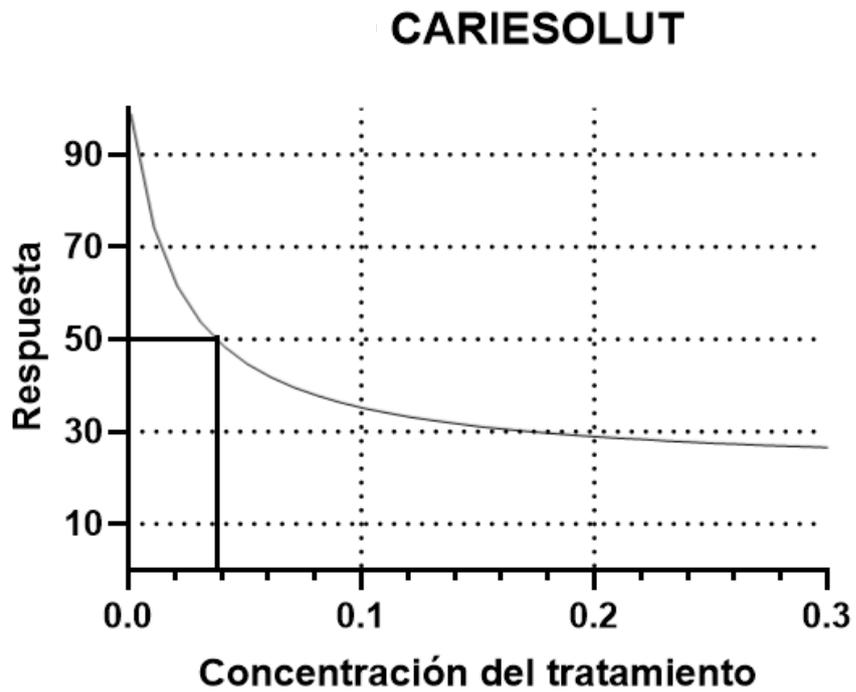
**Figura 13.** Concentración de inhibición media de BRIX3000®.

El material de remoción de caries BRIX3000® redujo al 50% la actividad metabólica celular a una concentración del 0,596%. Esta actividad metabólica disminuyó de manera proporcional al aumento de la concentración del material (Figura 13).



**Figura 14.** Concentración de inhibición media de NATURAL-CARE.

Como puede observarse en la Figura 14, NATURAL-CARE a una concentración del 1,034% disminuyó al 50% la actividad metabólica celular, disminuyendo ésta de manera progresiva según aumentó la concentración del material sin descender drásticamente, permitiendo a una concentración del 5% una actividad metabólica cercana al 30%.

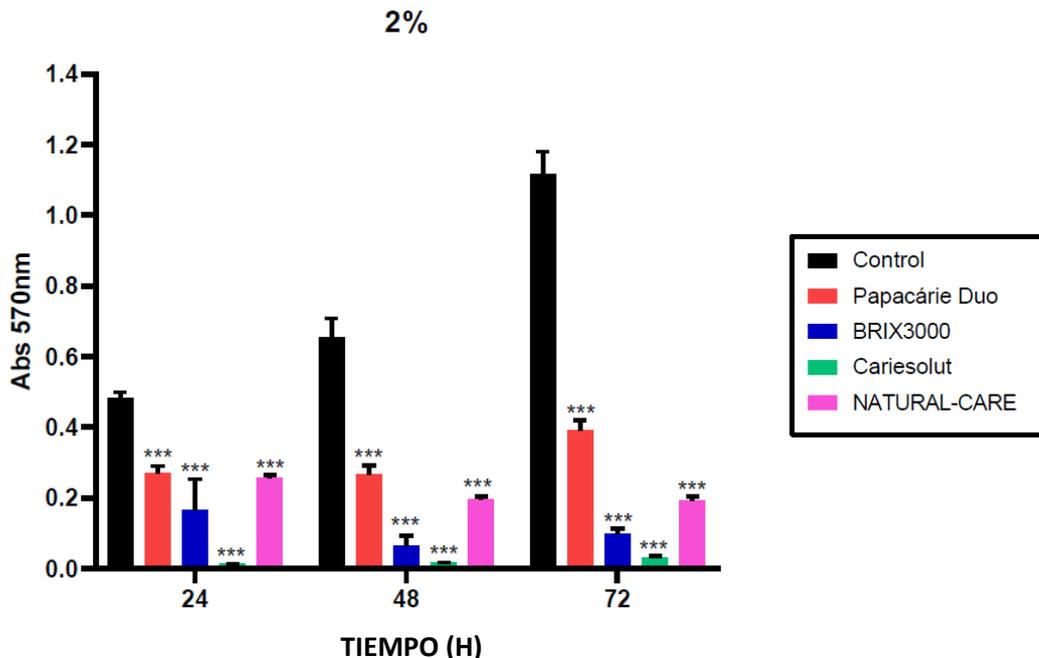


**Figura 15.** Concentración de inhibición media de Cariesolut.

En la Figura 15 se evidencia como la disminución de la actividad metabólica celular al 50% con el material de remoción de caries Cariesolut se produjo a una concentración del 0,020%. Esta actividad metabólica disminuyó de manera proporcional al aumento de la concentración del material.

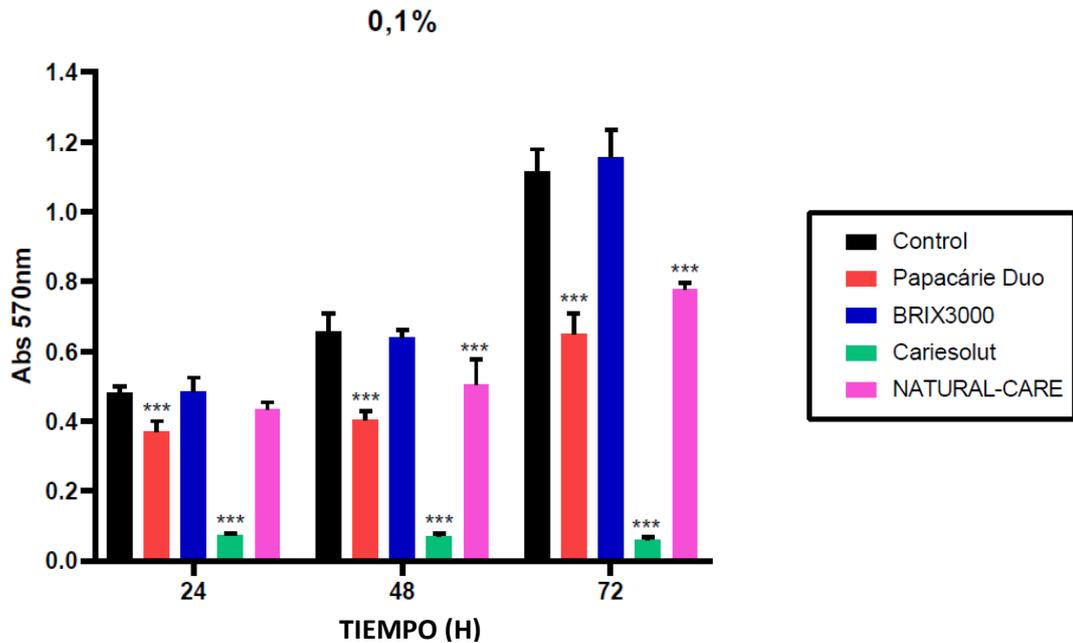
## 4.2. ENSAYO DE VIABILIDAD (MTT)

La actividad metabólica de las células de pulpa dental de dientes permanentes se analizó a las 24, 48 y 72 horas de cultivo tras aplicar cada tratamiento al 2%, 0,1% y 0,01%.



**Figura 16.** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 2%.

Los cuatro tratamientos a una concentración del 2% presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (\*\*\*) $p < 0,001$ ). En las células expuestas a Cariesolut no se observó actividad metabólica a las 24, 48 y 72 horas (Figura 16). En el caso de BRIX3000® y NATURAL-CARE se observó una acentuada disminución de la proliferación celular, progresiva en cada período de tiempo analizado. Papacárie Duo® presentó una disminución de la proliferación celular en comparación con el control, la cual se mantuvo prácticamente estática para los tres períodos de tiempo.



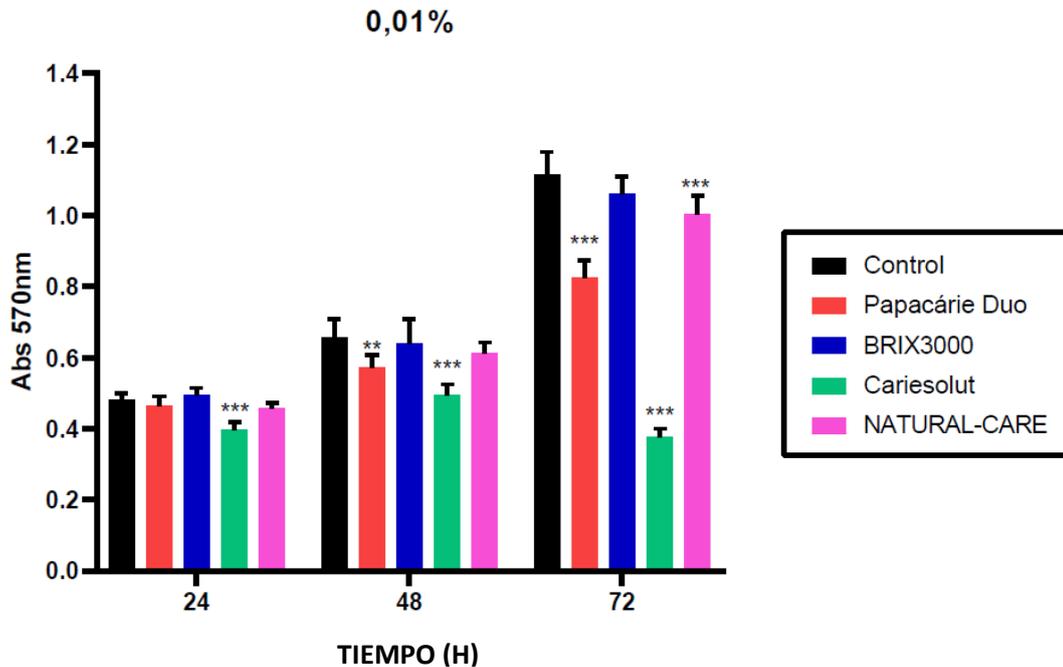
**Figura 17.** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 0,1%.

En la Figura 17 se muestra como una concentración del 0,1% el material de remoción química de caries BRIX3000® permitió una proliferación celular equiparable a la observada en el grupo control a las 24, 48 y 72 horas, no presentando diferencias estadísticamente significativas. El resto de los productos sí presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (\*\*p<0,001).

Cariesolut a una concentración del 0,1% evidenció muerte celular o bajada de la actividad metabólica casi total manteniéndose los mismos niveles de absorbancia desde las 24 hasta las 72 horas (\*\*p<0,001).

Papacárie Duo® al 0,1% entre las 24 y 48 horas el cultivo celular no presentó cambios en el crecimiento celular, sin embargo, a las 72 horas si se observó cierto crecimiento, existiendo células vivas que crecieron en menor medida que las células del control (\*\*p<0,001).

Para el tratamiento NATURAL-CARE al 0,1% se produjo una proliferación celular progresiva a las 24, 48 y 72 horas, pero siempre menor que la observada en las células del control, con diferencias estadísticamente significativas a las 48 y 72 horas (\*\*p<0,001).



**Figura 18.** Proliferación celular con los diferentes materiales aplicados al 0,01%.

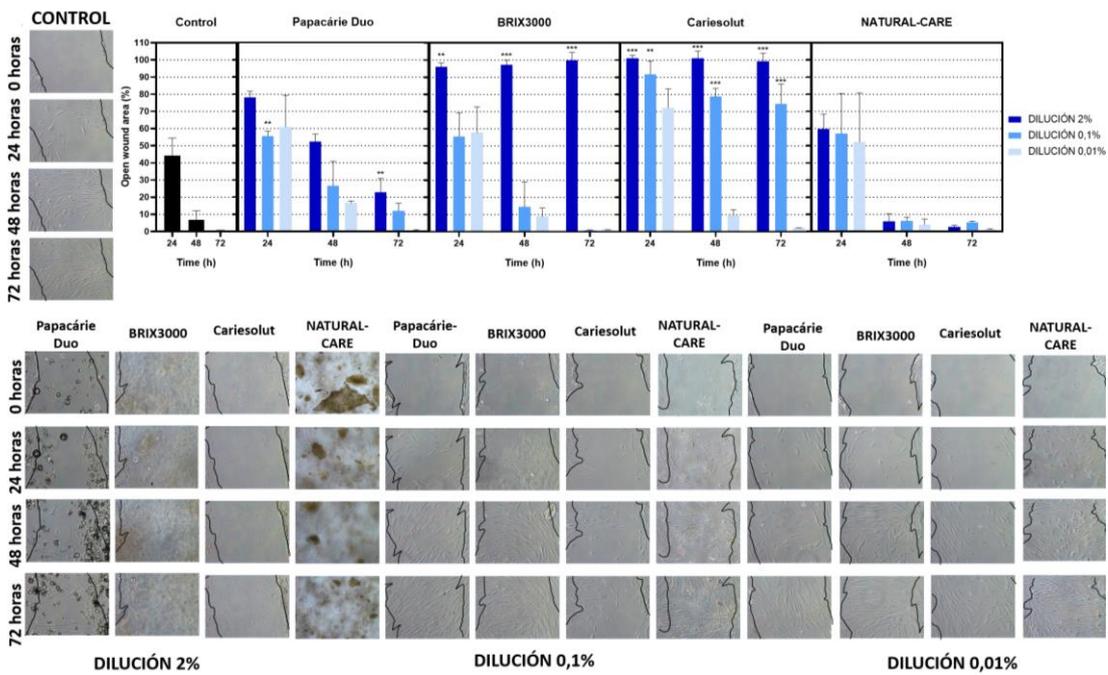
A una concentración del 0,01% de Cariesolut se observaron células vivas a las 24 y 48 horas, con cierta actividad metabólica la cual fue menor que la descrita en las células control (sin tratamiento), observándose una reducción de la viabilidad celular a las 72 horas del cultivo, la cual pudo indicar una muerte celular en mayor o menor medida o un descenso en la actividad metabólica (\*\* $p < 0,001$ ).

A las 24 horas, Papacárie Duo® al 0,01% permitió una proliferación celular muy similar a la observada en el grupo control, no mostrando diferencias estadísticamente significativas (Figura 18). A las 48 horas permitió la proliferación celular (\*\* $p < 0,001$ ), produciendo una mejora en la viabilidad celular a las 72 horas del cultivo (\*\* $p < 0,001$ ), la cual permaneció en ambos casos inferior a la viabilidad celular observada en el control.

NATURAL-CARE al 0,01 % evidenció una actividad metabólica muy próxima a la observada en el grupo control, y no presentó diferencias estadísticamente significativas ni a las 24 ni a las 48 horas de cultivo. A las 72 horas de cultivo permitió una buena proliferación celular compatible con una viabilidad celular aceptable y semejante a la que se observó en el control (\*\* $p < 0,001$ ).

Finalmente, el material de remoción química de caries BRIX3000® al 0,01% no mostró diferencias estadísticamente significativas de las 24 a las 72 horas de cultivo, permitiendo una proliferación celular equiparable a la del grupo control en los tres tiempos evaluados.

### 4.3. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR



**Figura 19.** Resultados del ensayo de cicatrización de heridas. El porcentaje de área de herida abierta se muestra gráficamente en tres momentos diferentes (24, 48 y 72 h) para cada uno de los eluatos de solventes probados (2 %, 0,1 % y 0,01 %) en relación con el porcentaje de área de herida abierta en 0 h. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . También se muestran imágenes del área abierta de la herida (barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ ).

La velocidad de migración en el cultivo de Papacárie Duo® al 2% fue más lenta que en el grupo control (Figura 19), encontrándose a las 72 horas una herida que no se ha cerrado del todo, más abierta que la del control, presentando diferencias estadísticamente significativas únicamente en este período de tiempo (\*\* $p < 0,01$ ).

Se observó una mejora en la velocidad de migración y por tanto en el cierre de la herida en el cultivo de Papacárie Duo® al 0,1%, sin que ésta llegara a cerrarse completamente como en el control pasadas las 72 horas. La herida tuvo un área abierta menor que la observada para este mismo tratamiento al 2%, con una

diferencia estadísticamente significativa respecto al control únicamente a las 24 horas (\*\*p<0,01).

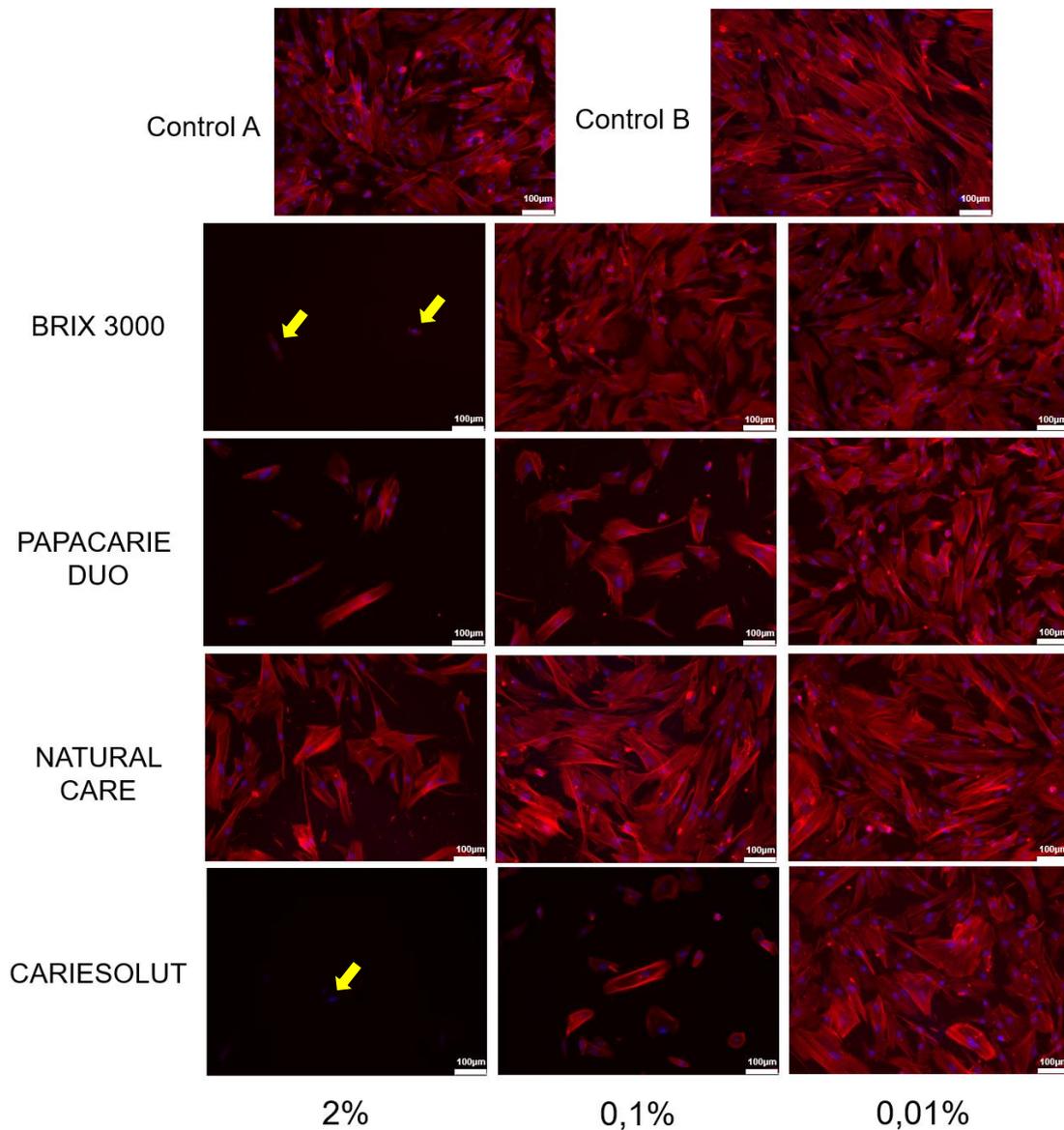
En el cultivo de Papacárie Duo® al 0,01% mostró pasadas las 72 horas un cierre total de la herida y por lo tanto una velocidad de migración equiparable a la del control, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los períodos de tiempo.

En el ensayo realizado con el material BRIX3000® al 2% no se produjo migración celular en ningún período de tiempo, con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 24 horas (\*\*p<0,01) como a las 48 y 72 horas (\*\*p<0,01). En los cultivos de BRIX3000® al 0,1% y 0,01% se observó una velocidad de migración similar a la del grupo control a las 48 y 72 horas, sin obtener diferencias estadísticamente significativas para estos tratamientos en ningún período de tiempo.

No se obtuvo cierre alguno de la herida en el cultivo de Cariesolut al 2% en ningún período de tiempo (\*\*p<0,01), existiendo un área de herida abierta mayor al 90% en el cultivo de Cariesolut al 0,1% a las 24 horas (\*\*p<0,01), y mayor al 70% a las 48 y 72 horas (\*\*p<0,01). La velocidad de migración en el cultivo de Cariesolut al 0,01% a las 48 y a las 72 horas fue similar a la observada en el control, sin diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, en los cultivos de NATURAL-CARE tanto al 2% como al 0,1% y 0,01% se obtuvieron una velocidad de migración equiparable a la del control a las 48 y 72 horas, con un cierre de la herida favorable existiendo un área de herida abierta menor al 10% para las diluciones de 0,1% y 0,01% en ambos períodos de tiempo, sin diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.4. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE FLUORESCENCIA



**Figura 20.** Morfología del citoesqueleto y núcleo de las células de pulpa dental de diente permanente a las 72 horas de cultivo en los cuatro tipos de materiales observada en microscopio de fluorescencia.

En la Figura 20 se observan las imágenes de las muestras analizadas donde aparecen los núcleos celulares teñidos en color azul, y los citoesqueletos en color rojo.

En las imágenes de los materiales de remoción química de caries BRIX3000® y Cariesolut al 2% se observó algún resto celular únicamente, tal y como indica la flecha de la Figura 20. A una concentración del 0,1% BRIX3000® permitió un crecimiento celular favorable y semejante al del control, evidenciándose además una morfología

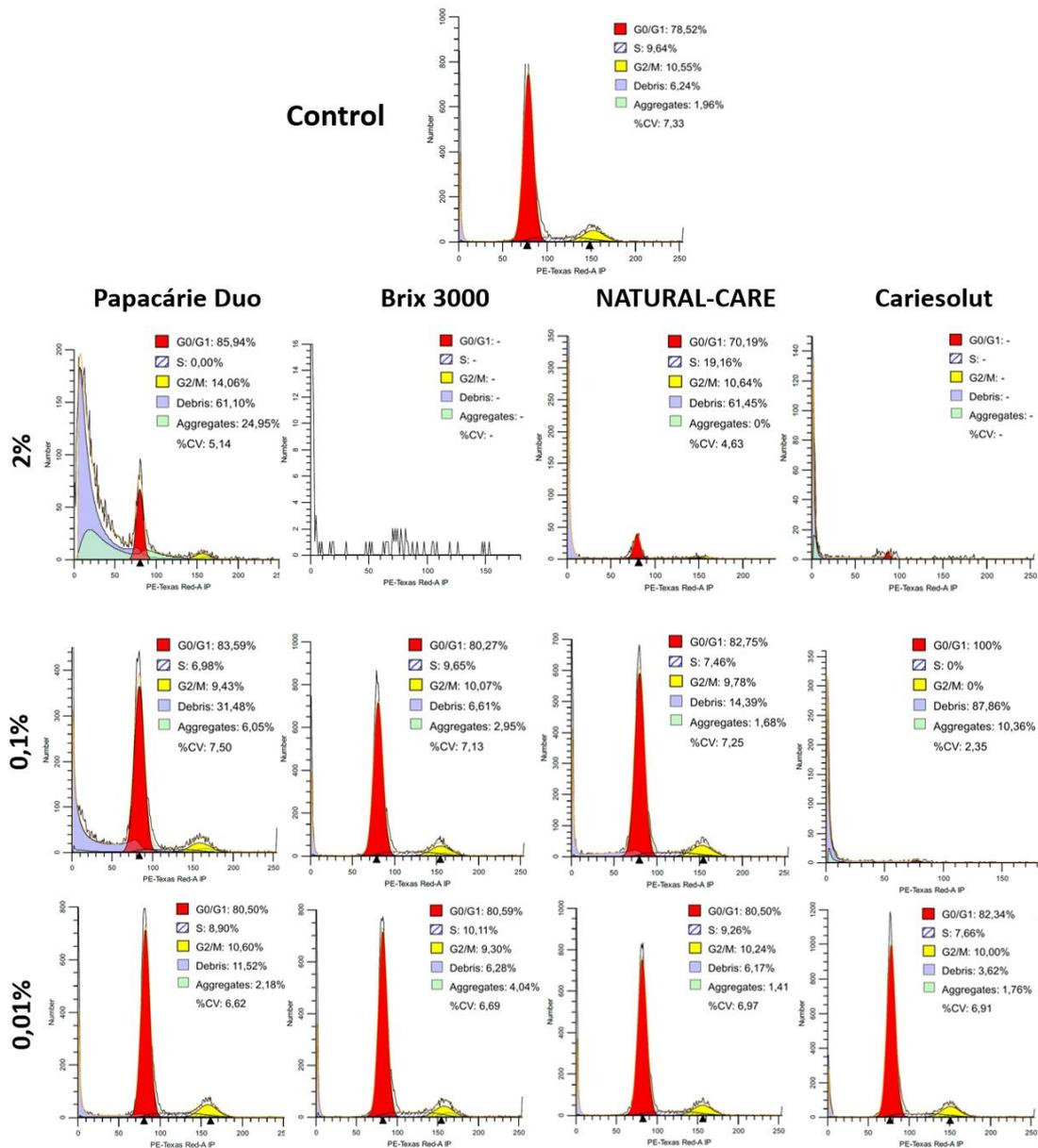
celular adecuada. Esto se percibió también en BRIX3000® al 0,01%, con unos resultados equiparables a los del control. Por el contrario, en el cultivo de CARIESOLUT al 0,1% se obtuvo una baja densidad de células viables, las cuales se apreciaron fusiformes y pequeñas, pareciendo estar levantadas de la placa por los extremos, presentando a esta concentración restos celulares mayoritariamente. Las células cultivadas en presencia de Cariesolut al 0,01% mostraron un crecimiento celular favorable y una morfología adecuada, con unos resultados que, si bien se acercaron en gran medida a los del control, evidenciaron una densidad celular menor que la observada para BRIX3000® y NATURAL-CARE a esta misma concentración.

A una concentración del 2%, son las células a las que se les aplicó NATURAL-CARE las que presentaron mayor densidad celular en comparación con el resto de los materiales. Además, se produjo una expansión celular, que indicó un crecimiento celular ligeramente menor al del control, acompañado de una morfología celular adecuada. Esto se observa también al 0.1% y 0,01%, con unos resultados equiparables a los del control.

En el cultivo de Papacárie Duo® al 2% se hallaron células muy fusiformes en comparación con las del control, presentando además una baja confluencia ya que no se expandieron y no fueron capaces de cubrir la placa. Al 0,1% también se observaron células muy fusiformes las cuales no se expandieron en comparación con el control donde vemos células de mayor tamaño, existiendo por tanto también a esta concentración una baja confluencia. A una concentración del 0,01% pudimos observar para este tratamiento una mejora en la proliferación celular, con una morfología celular adecuada, y densidad celular muy similar a la que se observó en el control.

#### **4.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR**

Mediante el ensayo de citometría de flujo se monitorizaron las posibles alteraciones en las diferentes fases del ciclo celular de las DPSCs tras aplicar 72 horas los diferentes materiales de remoción química de caries al 2%, 0,1% y 0,01% (Figura 21).



**Figura 21.** Resultados del análisis del ciclo celular.

Papacárie Duo® a una concentración del 2% dio lugar a un porcentaje de células en las fases G0/G1 y G2/M similar al observado en el control, con un porcentaje de debris o fragmentos de ADN por la existencia de células dañadas del 61,10%. Mostró además una detención del ciclo celular en la fase G2, ya que las células que estaban en S antes del tratamiento han avanzado hasta G2 y aparecen estancadas en esta fase. Papacárie Duo® al 0,1% permitió la división celular y la síntesis de ADN, mostrando un 31,48% de debris. Con este mismo material a una concentración del 0,01%, las DPSCs presentaron una distribución de las fases del ciclo celular

equiparables a las del grupo control pero con mayor porcentaje de fragmentos de ADN.

En el caso de BRIX3000® al 2% no se observan células. Las células tratadas con BRIX3000® al 0,1% y 0,01% presentaron unas distribuciones de ciclo celular muy similares a las obtenidas en el control, así como un porcentaje de debris o núcleos fragmentados inferior al 7% en ambos casos.

A una concentración del 2% del material NATURAL-CARE se observa un menor número de células en comparación con el control. La mayoría de estas células se encontraron en la fase G0/G1 (70,19%), con un porcentaje de células en la fase S mayor que el observado en el control (19,16% y 9,64% respectivamente) que muestra la presencia de síntesis de ADN pero de manera más ralentizada al permanecer las células en esta fase un mayor tiempo. Así mismo, muestran un porcentaje de células en fase G2/M equiparable al del control (10,64% y 10,55% respectivamente), presentando un porcentaje de núcleos fragmentados del 61,45%. Este porcentaje de núcleos fragmentados o debris disminuyó progresivamente según aumentaba la dilución del material, dando lugar en una concentración del 0,01% a un porcentaje de debris muy similar al del grupo control (6,17% y 6,24% respectivamente).

Por último, con Cariesolut al 2% no se observan células, observando a una concentración del 0,1% que la totalidad de las células estaban en la fase G0/G1. Cariesolut al 0,01% pareció no afectar a las diferentes fases del ciclo celular de las DPSCs.

#### **4.6. RESULTADOS DEL ENSAYO DE APOPTOSIS/NECROSIS**

Como se muestra en la Figura 22, BRIX3000® presentó tanto al 0,1% como al 0,01% un porcentaje de células vivas superior al 99%, observando al 2% un 68,4% de células vivas, un 3,69% de células apoptóticas tempranas y un 27,9% de células apoptóticas tardías.

El resto de los materiales si mostraron incluso a bajas concentraciones células apoptóticas en mayor o menor porcentaje. Las muestras de Pacárie Duo al 0,01% y 0,1% presentaron un 92,8% y un 91,2% de células vivas respectivamente, existiendo

un porcentaje de células apoptóticas tempranas (2,76% y 2,62% respectivamente), apoptóticas tardías y necróticas muy similar en ambas concentraciones (4,46% y 6,18% respectivamente).

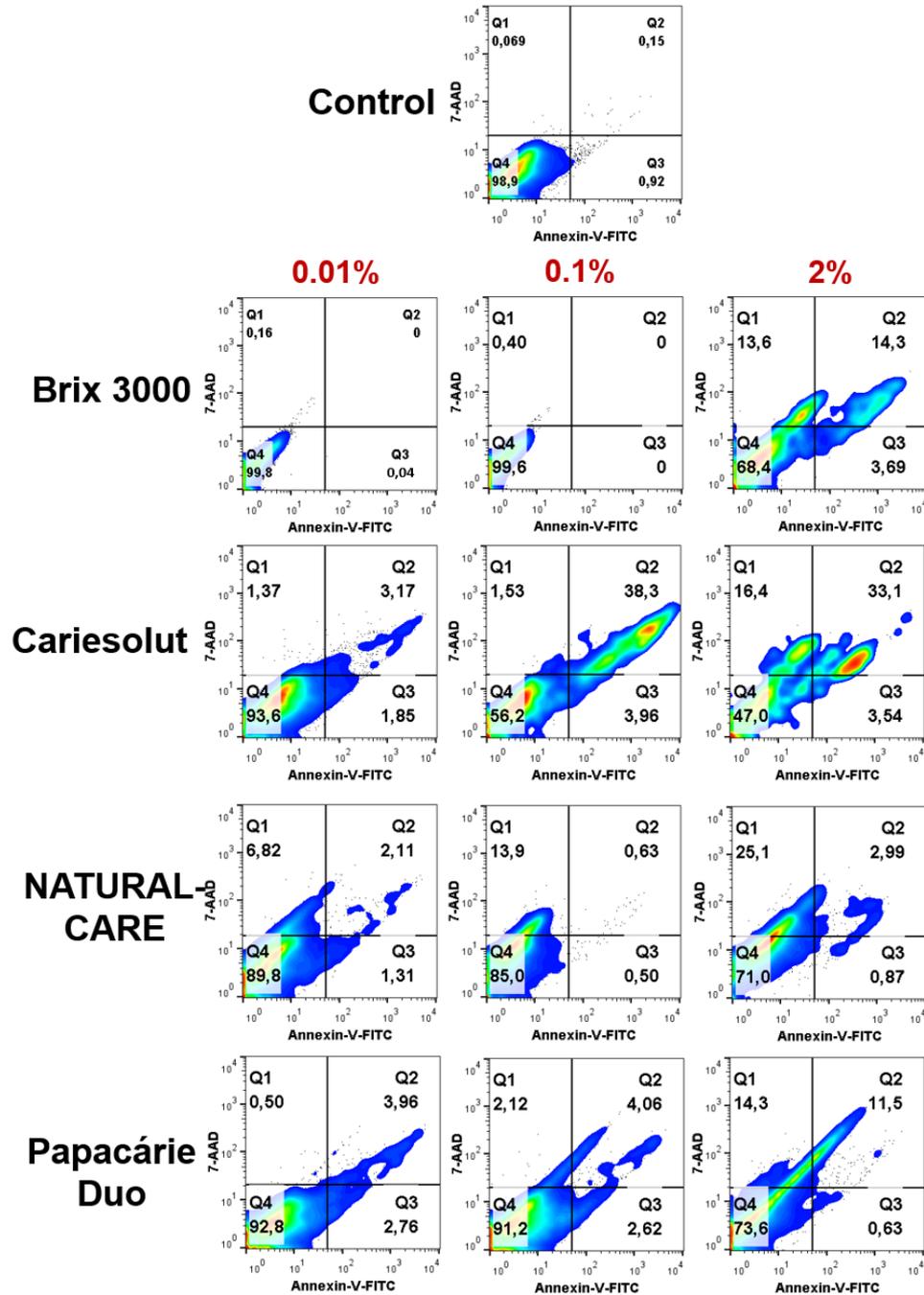


Figura 22. Análisis de citometría de flujo de la apoptosis celular y necrosis inducida por los cuatro materiales de remoción química de caries en SHED por tinción con Anexina-V-FITC y 7-AAD.

El porcentaje de células vivas en la dilución de Cariesolut al 0,01%, fue de un 93,6%. Este porcentaje descendió drásticamente al aumentar la concentración del material. Cariesolut reveló tanto al 2% como al 0,1% un porcentaje aproximadamente similar tanto de células vivas como de células apoptóticas tardías y necróticas, presentando al 2% un 47% de células vivas y un 49,5% de células apoptóticas tardías y necróticas, y a una concentración del 0,1% un 56,2% de células vivas y un 39,83% de células apoptóticas tardías y necróticas.

El material de remoción química de caries NATURAL CARE mostró al 0,01% un porcentaje de células vivas del 89,8%, el cual descendió levemente según aumentó la concentración del material, sin que existiera una reducción severa de este porcentaje, presentando al 0,1% un 85% de células vivas e incluso al 2% y un 71% de células vivas.

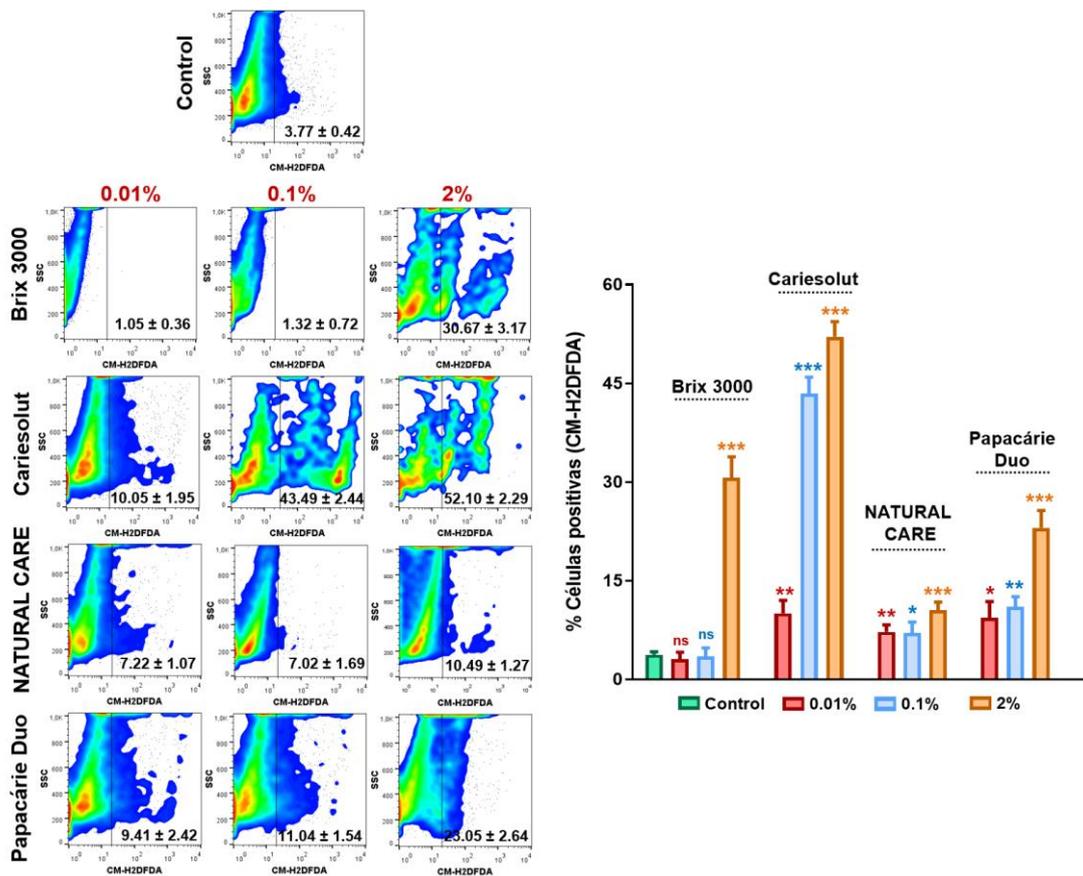
#### **4.7. RESULTADOS DE LA LIBERACIÓN DE ROS**

Los niveles intracelulares de ROS se midieron en cultivos de las DPSCs en presencia de BRIX3000®, Papacárie Duo®, NATURAL-CARE y Cariesolut en diferentes concentraciones (2%, 0,1 % y 0,01%), tal y como muestra la Figura 23. Cuando se cultivaron las DPSCs con BRIX3000® al 0,1 % y 0,01 los niveles de ROS fueron iguales a los observados en las células del grupo control, sin diferencias estadísticamente significativas. BRIX3000® solo incrementó los niveles de ROS en la concentración más alta (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Los niveles de ROS en las DPSCs expuestas a Cariesolut a una concentración del 2% y del 0,1 % fueron muy altos en comparación con las células del control (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). La liberación de ROS intracelular con Cariesolut mejoró considerablemente en su concentración más diluida, al 0,01%, doblando aun así los niveles de ROS en comparación con el grupo control (\*\*  $p < 0,01$ ).

NATURAL-CARE fue el material que menores niveles de ROS intracelular produjo a una concentración del 2% (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Dichos niveles de ROS disminuyeron en las DPSCs tratadas con NATURAL-CARE al 0,1% y 0,01%, y fueron más elevados que los observados en las células del control (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ).

Finalmente, las DPSCs tratadas con Papacárie Duo® al 2% mostraron un aumento significativo en la producción de ROS en comparación con las células de control (\*\* $p < 0,001$ ). La liberación de ROS intracelular mejoró considerablemente con Papacárie Duo® al 0,1% y 0,01%, sin alcanzar en ningún caso los niveles de ROS observados en las células del control (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ).



**Figura 23.** Resultados de liberación de ROS sobre el porcentaje de células positivas para CM-H2DCFDA. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. REMOCIÓN QUÍMICA DE CARIES EN PACIENTES ESPECIALES

En la práctica odontológica con pacientes con necesidades especiales se prioriza un enfoque centrado en el paciente, buscando minimizar los procedimientos invasivos. Se ha demostrado que la principal fuente de miedo y ansiedad para los pacientes tiene su origen en las presiones y vibraciones mecánicas y el ruido asociados a estos métodos, ya que todos estos factores están altamente relacionados con la experiencia de dolor o con la posibilidad de su ocurrencia, así como con la incomodidad y molestias que el paciente pueda percibir durante el tratamiento<sup>[146,147]</sup>.

En este contexto la remoción química de caries juega un papel fundamental dentro de la OMI, ya que supone una alternativa para la remoción de la caries más respetuosa tanto con la conservación del tejido dentario como con el manejo del estrés del paciente.

La aceptación del tratamiento por parte del paciente resulta más favorable al utilizar materiales de remoción química de caries que consiguen una dentina cariada más blanda, ya que permiten la remoción de la misma mediante la utilización de instrumentos manuales sin aplicar una gran presión, lo que se traduce en una menor percepción de molestia o dolor por parte del paciente. De esta manera, numerosos estudios evidencian como con la utilización de estos materiales se logra reducir o incluso eliminar la ansiedad que comúnmente acompaña al tratamiento dental, aunque su aplicación conlleve un mayor tiempo de tratamiento<sup>[146,148-150]</sup>.

De la mayor aceptabilidad de estos procedimientos por parte de los pacientes surge la necesidad de conocer el comportamiento de los materiales de remoción química de caries sobre las células de la pulpa dental para así seleccionar en la práctica clínica diaria de entre todos ellos el que mayor beneficio/riesgo aporte.

## 5.2. DISCUSIÓN DEL MÉTODO *IN VITRO*

La característica esencial que distingue a un biomaterial de cualquier otro material es su capacidad para subsistir en contacto con los tejidos del cuerpo humano sin causar un grado inaceptable de daño a ese huésped<sup>[151]</sup>.

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un biomaterial para realizar una determinada función de acuerdo con un tratamiento médico, sin producir ningún efecto adverso, ocasionando a la vez la respuesta biológica más favorable en esa situación en concreto. Además, el potencial de citotoxicidad es definido como la capacidad de un material para dar lugar a variaciones negativas en la viabilidad celular. De esta manera, las pruebas de citotoxicidad se corresponden con ensayos de biocompatibilidad que comprueban los efectos nocivos de los materiales sobre las células, como la lisis y la inhibición del crecimiento celular. Por consiguiente, la biocompatibilidad debe ser analizada previamente a la incorporación de un nuevo material en el mercado, ya que un biomaterial no es una sustancia inerte y cuando entra en contacto con los tejidos vivos se desencadenan interacciones y respuestas biológicas. Dichas respuestas están condicionadas por diversos factores como son el tipo de material y las funciones que ejerce, así como el tipo del tejido del huésped [152–154].

Los materiales con buena biocompatibilidad no deberían inducir efectos tóxicos notables y continuos en las células y tejidos circundantes. Dado que el tejido pulpar y la dentina están íntimamente relacionados, los CMCR deben ser biocompatibles. La mayoría de los materiales dentales son biocompatibles con el complejo dentina-pulpa cuando se usan en cavidades de tamaño pequeño a mediano, pero cuando se aplican en cavidades más profundas, pueden lesionar el tejido pulpar o dificultar el proceso de cicatrización<sup>[155–157]</sup>.

Las pruebas *in vitro* resultan muy útiles para evaluar los efectos biológicos de los materiales. Para ello, los materiales se exponen a cultivos celulares en un laboratorio, pudiendo así analizar: morfología celular, alteración en la síntesis de proteínas, respiración mitocondrial y diversas actividades metabólicas y enzimáticas. Las pruebas *in vitro* presentan múltiples ventajas, entre las que destacan su relativa

rapidez de ejecución, su bajo coste y su fácil estandarización. Además, reducen las tasas de fracaso en pruebas *in vivo*, las cuales pueden resultar de mayor coste, y no es necesaria la utilización de animales [158,159].

En las últimas décadas, los cultivos celulares *in vitro* han tenido un papel fundamental en la investigación, siendo la técnica de elección para el estudio de la toxicidad de la mayoría de los materiales de manera previa a la realización de estudios *in vivo*. Si bien es cierto que el uso de animales es aún indispensable para algunos tipos de experimentación en el área biomédica, hay múltiples situaciones en las que la tecnología *in vitro* pueden sustituir de manera eficiente los estudios *in vivo* [160].

El mayor inconveniente de los test *in vitro* radica en que las condiciones que se reproducen no son exactamente todas las que se pueden reproducir *in vivo*, y por tanto las respuestas de estas pruebas no son extrapolables del todo a las reacciones *in vivo*. No obstante, se han realizado trabajos de validación que han demostrado que existe una alta correlación (97 %) entre los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* [159–161]. Esta correlación entre estudios *in vivo* y *ex vivo* queda evidenciada en el trabajo de Pedano y cols. [162], donde observaron la misma capacidad de remineralización de dos materiales biocerámicos tanto para la muestra de dientes *in vivo* como para el estudio de animales *in vivo* que realizaron.

En nuestro estudio se siguió estrictamente la normativa internacional anteriormente explicada (ISO 10993:2009) sobre la evaluación de la biocompatibilidad de los productos sanitarios utilizados en odontología [120,121]. Realizamos en base a esta normativa ISO test *in vitro* de citotoxicidad de los materiales con cultivos de células de origen humano, con el objetivo de simular una situación clínica y confirmar su utilización de manera segura en la práctica diaria, método que es comúnmente utilizado en los estudios de citotoxicidad [163].

### **5.3. MATERIALES DE REMOCIÓN QUÍMICA DE CARIES**

La mayoría de los artículos disponibles en la literatura que estudian los materiales de remoción química de caries se centran en su comportamiento y su eficacia terapéutica, siendo muy limitados los estudios que analizan su biocompatibilidad. Por ello, el presente estudio evaluó la biocompatibilidad de diferentes materiales a través

del análisis de la viabilidad y proliferación celular, migración celular, morfología celular, análisis del ciclo celular y por último análisis de apoptosis y necrosis celular y producción de especies reactivas de oxígeno.

Además, la literatura actual se ha centrado únicamente en el estudio de tres materiales: Carisolv, BRIX3000® y Papacárie Duo®, siendo el material más antiguo y por tanto más estudiado el primero de ellos<sup>[164]</sup>.

En la literatura existe unanimidad respecto a la biocompatibilidad aceptable de Carisolv<sup>[163,165-167]</sup>. Únicamente Sepet et al<sup>[168]</sup> defienden que, aunque Carisolv no afecta a la viabilidad celular, tuvo un efecto reductor del crecimiento celular. Esto puede deberse a que este estudio está realizado en células de carcinoma mamario de ratón, mientras que el resto de los estudios que analizan Carisolv aplican el tratamiento a células de pulpa dental humana o de ligamento periodontal humano. Por otro lado, este material de remoción química de caries entró en desuso por las limitaciones que presentaba su compuesto reactivo, entre las que destacan su corta vida útil, su alta corrosividad y su alto costo<sup>[169]</sup>. En base a esto, se han seleccionado para este estudio cuatro materiales de remoción de caries diferentes a Carisolv.

#### **5.4. SOBRE EL USO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL**

Este estudio fue realizado sobre las DPSCs, ya que son de fácil acceso, presentan escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular<sup>[170]</sup>. Además, bajo condiciones de diferenciación óptimas tanto *in vitro* como *in vivo*, las DPSCs son capaces de diferenciarse en progenies de múltiples linajes, incluidos odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, melanocitos, células neurogliales, epitelios, hepatocitos, endotelios y células pancreáticas<sup>[42-44]</sup>.

La capacidad de diferenciación de las DPSCs ha sido evidenciada en estudios experimentales realizados en ratas, en los cuales se pudo demostrar su potencial terapéutico para la reparación de un infarto de miocardio inducido mediante la ligadura de las arterias coronarias. Tras una semana, a las ratas se les inyectó estas

células intramiocárdicamente, manifestando a las cuatro semanas una mejoría en su función cardíaca<sup>[171]</sup>.

En nuestro caso, al someter a estudio materiales que se van a aplicar en la práctica clínica sobre dentina cariada, debemos tener en cuenta que las preparaciones cavitarias profundas o las lesiones por caries pueden producir la destrucción de los odontoblastos. Es por ello que de nuevo las DPSCs son las más indicadas para la realización de este estudio, ya que la secreción de dentina de reparación es un proceso complejo que requiere la presencia de células progenitoras. Además, los factores de crecimiento liberados bajo el estímulo de lesiones de caries (TGF-B1, FGF-2 y el BMP-2 y BMP-4) desempeñan un papel fundamental en la secreción de dentina de reparación y parecen estar involucrados en la proliferación y diferenciación de las DPSCs ante esta situación<sup>[172]</sup>.

En concordancia con nuestros criterios de inclusión, la mayor parte de los estudios que han utilizado las DPSCs se han llevado a cabo con una muestra obtenida a partir de dientes permanentes con ausencia de caries, siendo éstos terceros molares con indicación de extracción por parte del odontólogo o bien premolares con indicación de extracción ortodóncica, teniendo siempre un diagnóstico pulpar de pulpa sana<sup>[173]</sup>.

## **5.5. SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA (IC50)**

Para la evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo el experimento de IC50, con el objetivo de conocer la concentración de cada material que inhibía al 50% la actividad metabólica de las DPSCs. En la misma línea, otros autores han utilizado el experimento de IC50 para evaluar la citotoxicidad de materiales aplicados sobre dentina<sup>[174]</sup>. En nuestro estudio, en el análisis de medición de la concentración de inhibición media, NATURAL-CARE presentó un IC50 de 1,034%, siendo el material que menos hubo que diluir para producir la inhibición del crecimiento celular al 50%. BRIX3000® también obtuvo resultados favorables con un IC50 de 0,596%. Sin embargo, a medida que aumentó la concentración de BRIX3000® la actividad metabólica disminuyó de manera gradual hasta alcanzar valor 0 al 5%, mientras que con el aumento de la concentración de NATURAL-CARE la actividad metabólica descendió hasta el 30% manteniéndose en esos valores, aunque la concentración del

material continuara aumentando. Papacárie Duo® y Cariesolut obtuvieron los resultados más desfavorables para IC50, considerando a Cariesolut el material con mayor citotoxicidad de acuerdo al experimento de IC50, ya que reduce al 30% la actividad metabólica con tan solo un 0,2% de concentración, y según las recomendaciones de seguridad de la ISO 10993-5: 1999 (E), para ser considerado citotóxico, debe haber una reducción de al menos un 30% de células viables<sup>[121]</sup>.

La información sobre la citotoxicidad pulpar por la aplicación de materiales de remoción química de caries es escasa, especialmente cuando los materiales se aplican en cavidades profundas que presentan riesgo de exposición pulpar<sup>[175]</sup>. Es por ello que este estudio realizó el resto de experimentos aplicando los materiales a diferentes concentraciones directamente a las células pulpares, para simular que a mayor profundidad de la lesión de caries, mayor concentración del producto va a llegar a la pulpa dental<sup>[151]</sup>. La elección de las concentraciones para llevar a cabo los siguientes experimentos se realizó en concordancia con los resultados de IC50, observando en qué concentraciones se producían mayores diferencias entre los diferentes materiales.

## **5.6. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR**

El ensayo MTT se basa en la idea de que la mayoría de las células vivas tienen una actividad mitocondrial estable, por lo que el aumento o disminución del porcentaje de células vivas es proporcional a la acción mitocondrial. La conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán, que pueden solubilizarse para un cálculo homogéneo, representa la función mitocondrial de las células<sup>[176]</sup>. Las células expuestas a fármacos durante un máximo de 72 horas se evalúan para determinar la potencia y eficacia máximas del fármaco<sup>[177]</sup>. Por lo tanto, el presente estudio evaluó el ensayo MTT a intervalos de 24, 48 y 72 horas.

Nuestro análisis de MTT reveló como a altas concentraciones (2%) los cuatro materiales presentaban una alta citotoxicidad con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (\*\*\*) $p < 0,001$ ). BRIX3000® al 0,1% y 0,01% fue el único que permitió una mejora drástica de la proliferación celular, alcanzando unos valores equiparables a los observados en el grupo control y permitiendo una buena

viabilidad celular para todos los períodos de tiempo analizados. Esta mejora radical de los resultados podría suponer que BRIX3000 a altas concentraciones podría favorecer la pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis, hipótesis que se argumentará con los resultados de los sucesivos experimentos.

Papácarie Duo® mejoró su citotoxicidad al 0,1 y 0,01% sin permitir en ningún caso la proliferación celular observada en el grupo control. El comportamiento observado para BRIX3000® difiere con lo observado en el estudio de Guedes y cols.<sup>[175]</sup>, quienes probaron dos agentes químico-mecánicos para la eliminación de la caries (Papácarie Duo® y BRIX3000®) en células de pulpa dental de diente temporal. En este estudio, teniendo en cuenta que aplican los tratamientos a una dilución exacta a la nuestra (0,01%) e incluso a una mayor dilución (0,001%), afirman que BRIX3000® reducía el metabolismo celular y la viabilidad celular incluso a bajas concentraciones. Esta discrepancia puede deberse a que en dicho estudio se realizó el experimento de MTT únicamente en un período de tiempo, a las 24 horas, no permitiendo un tiempo de exposición amplio para observar la respuesta celular ante dicho tratamiento. Aun así, en concordancia con el estudio de Guedes y cols.<sup>[175]</sup>, los resultados de BRIX3000® fueron más favorables que los obtenidos para Papacárie Duo® para todas las diluciones. Los hallazgos de nuestro estudio para Papacárie Duo® concuerdan con los observados en el estudio de García-Contreras y cols.<sup>[165]</sup> y con el estudio de Lima Santos y cols.<sup>[178]</sup>, quienes afirman que este material a altas concentraciones muestra una alta citotoxicidad y reduce significativamente el número de células viables, mejorando los valores de citotoxicidad según aumenta la dilución del material, sin alcanzar en ningún caso los valores observados en el grupo control. Bastos y cols.<sup>[179]</sup> también afirma que Papacárie Duo® reduce la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis ( $p > 0,05$ ). Papacárie Duo® al 5% muestra en el estudio de Bastos y cols.<sup>[179]</sup> una gran toxicidad y una baja viabilidad celular, estos resultados los observamos también en nuestro estudio a concentraciones del 2% y 0,1%. En el estudio de Bastos y cols.<sup>[179]</sup> se evidencia una mejoría en la citotoxicidad y viabilidad celular con Papacárie Duo® al 0,5% ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en nuestro estudio observamos una mejora de estos parámetros a concentraciones más diluidas (0,01%). Estas diferencias pueden deberse a las limitaciones del estudio de Bastos y

cols.<sup>[179]</sup>, el cual está realizado con células de pulpa dental de ratón, además evalúa Papacárie Duo® al 5% y 0,5% únicamente, y realiza el experimento de MTT solo a las 24 horas. En contraposición, Maru y cols.<sup>[163]</sup> afirman en su estudio que Papacárie Duo® tanto al 5% como al 0,5% no es citotóxico. Además, en el experimento de migración celular de este estudio Papacárie Duo® al 0,5% presenta un porcentaje de herida abierta a las 72 horas de seguimiento similar al observado en nuestro estudio a una dilución mayor, al 0,1%, para el mismo período de tiempo. Estos resultados favorables para Papacárie Duo® no han sido registrados en ningún otro estudio hasta el momento.

NATURAL-CARE presentó el mismo comportamiento que Papacárie Duo® en el experimento de MTT, el cual reveló que NATURAL-CARE resulta citotóxico al 2%, mejorando la proliferación celular según aumenta la dilución del material, observando al 0,01% tras 72 horas de seguimiento una proliferación equiparable a la del control. Por tanto, NATURAL-CARE mostró una mayor citotoxicidad en comparación con BRIX3000®, siendo sus resultados equiparables a los observados para Papacárie Duo®, ya que ambos resultaron citotóxicos a altas concentraciones y mejoraron considerablemente su biocompatibilidad al aumentar su dilución. Por último, Cariesolut evidenció una gran citotoxicidad incluso a bajas concentraciones.

Estos resultados sugieren que el uso de este tipo de materiales en cavidades profundas podría comprometer a la vitalidad pulpar, con lo que el espesor dentinario será clave. Así, numerosas investigaciones han demostrado que la dentina puede actuar como una barrera protectora contra los efectos citotóxicos de los materiales dentales<sup>[151]</sup>.

En la tabla 2 se describen diversos estudios que analizan la viabilidad celular tras la aplicación del tratamiento con diferentes materiales de remoción química de caries, en concreto de Carisolv, BRIX3000® y Papacárie Duo®, mediante la realización de ensayos de MTT, lo que avala la utilización de este experimento para el estudio de la citotoxicidad de dichos materiales.

**Tabla 2:** Resumen de los estudios cuyo objetivo fue evaluar la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries mediante el ensayo de MTT.

<b>Autor y Año</b>	<b>Título</b>	<b>Línea Celular</b>	<b>Materiales estudiados</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusiones</b>
<b>Guedes y cols.</b> <sup>[175]</sup> <b>2021</b>	Cytotoxicity and dentin composition alterations promoted by different chemomechanical caries removal agents: A preliminary <i>in vitro</i> study	SHEDs	BRIX3000®  Papacárie Duo®	Se observaron disminuciones en la viabilidad celular y en el número de células viables para ambos materiales, en todas las diluciones, en comparación con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).	Ambos materiales mostraron citotoxicidad en contacto directo con las SHEDs. BRIX3000® presentó menor citotoxicidad que Papacárie Duo®
<b>García-Contreras y cols.</b> <sup>[165]</sup> <b>2014</b>	Cytotoxicity and pro-inflammatory action of chemomechanical caries-removal agents against oral cells	Células de carcinoma de células escamosas orales humanas  GMSCs  DPSCs  PDLSCs	Carisolv  Papacárie Duo®	Carisolv no mostró citotoxicidad ni estimulación del crecimiento hormético. Papacárie Duo® redujo significativamente el número de células viables en 30 min. Papacárie Duo® estimuló las células HGF para producir PGE2 de forma sinérgica con la interleucina-1 $\beta$ .	Carisolv presentó una biocompatibilidad aceptable con células orales normales y cancerosas. Papacárie Duo® tuvo una citotoxicidad rápida pero leve y una acción proinflamatoria contra las células orales.
<b>Santos y cols.</b> <sup>[178]</sup> <b>2020</b>	Comparison between conventional and chemomechanical approaches for the removal of carious dentin: an <i>in vitro</i> study	DPSCs	Papacárie Duo®  BRIX3000®	Papacárie Duo® mostró mayor citotoxicidad y menor capacidad celular en todas las diluciones (1:1, 1:2, 1:4), ( $p < 0,05$ ). BRIX3000® mostró una viabilidad celular superior al 60% para todas las diluciones, sin mostrar citotoxicidad. La eliminación del tejido cariado fue más rápida con BRIX3000®.	Papacárie Duo® disminuyó la viabilidad celular en comparación con BRIX3000®. BRIX3000® puede ser una buena opción debido a su menor tiempo de eliminación y menor citotoxicidad en comparación con las otras opciones de tratamiento.

**Tabla 2:** Continuación

Autor y Año	Título	Línea Celular	Materiales estudiados	Resultados	Conclusiones
Maru y cols. <sup>[163]</sup>  2022	Evaluation and comparison of cytotoxicity and bioactivity of chemomechanical caries removal agents on stem cells from human exfoliated deciduous teeth	SHEDs	Carisolv  Papacárie Duo®	Carisolv al 0,5 % mostró mayor proliferación celular y formación de matriz de calcio, mientras que Papacárie Duo® al 0,5 % mostró mayor porcentaje de células vivas y de migración celular.	Los agentes CMCR son biocompatibles y bioactivos cuando se cultivan en células madre derivadas de dientes primarios exfoliados.

## 5.7. SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Los resultados de citotoxicidad concordaron con los obtenidos en el experimento de migración celular. La migración celular y la curación de los tejidos heridos son indispensables para la homeostasis de los tejidos<sup>[180]</sup>. Por lo tanto, los agentes CMCR deben promover o no obstaculizar el movimiento de las células para restaurar o preservar la dentina<sup>[181]</sup>.

En el presente estudio BRIX3000® al 2% dio lugar a un área de herida abierta del 100% incluso a las 72 horas, pero al 0,1% dio lugar a un área abierta de la herida inferior al 15%, observándose al 0,01% una velocidad de migración similar a la del grupo control a las 48 y 72 horas, lo que vuelve a sugerir que BRIX3000 a altas concentraciones podría favorecer la pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis, quedando las células en suspensión de manera que no se verían en las imágenes obtenidas.

NATURAL-CARE y Papácarie Duo® permitieron una migración celular similar y muy escasa al 2% a las 24 horas. Sin embargo, la velocidad de migración de NATURAL-CARE mejoró considerablemente a las 48 y 72 horas, con un área de herida abierta inferior al 10% tanto al 2% como al 0,1 y 0,01%, mientras que Papácarie Duo® alcanzó esa velocidad de migración únicamente al 0,01% y pasadas 72 horas, demostrando

una velocidad de migración inferior. Cariesolut al 2% y 0,1% no permitió la migración celular, observando únicamente un cierre de la herida favorable al 0,01% tras 72 horas. Ningún otro autor ha estudiado la velocidad de migración de estos materiales hasta el momento.

Por otro lado, numerosos autores también han utilizado el ensayo de migración celular sobre las DPSCs para evaluar la citotoxicidad de otros materiales que se aplican en contacto directo con la pulpa dental, mayoritariamente de materiales de recubrimiento pulpar<sup>[182-184]</sup>. Gracias a la aplicación de este experimento Manaspon y cols. <sup>[184]</sup> demuestran en su estudio la biocompatibilidad *in vitro* favorable de ProRoot<sup>®</sup> MTA y Biodentine<sup>™</sup> en las DPSCs, en comparación con DyCal<sup>®</sup> y TheraCal<sup>™</sup>, ya que la migración celular se vio comprometida en estos dos últimos materiales.

Cabe destacar el hecho de que nuestro estudio analiza la velocidad de migración celular abarcando un intervalo de tiempo más amplio que el comúnmente utilizado por otros autores, ya que mientras que nosotros realizamos el registro de las imágenes a las 24, 48 y 72 horas, el resto de los autores, hasta el momento, registra imágenes de este ensayo a las 24 horas únicamente<sup>[182-184]</sup>.

## **5.8. SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS**

En el estudio actual, se utilizó un análisis morfológico por inmunofluorescencia para el análisis inicial de biocompatibilidad *in vitro*, ya que con los sistemas fluorescentes se obtiene una resolución de imagen superior en comparación con otros sistemas de marcaje inmunocitoquímico<sup>[185]</sup>.

El citoesqueleto es el centro integrador y organizador de la mayoría de estructuras y funciones celulares ya que relaciona entre sí los diferentes compartimientos citoplasmáticos y relaciona a la célula con su entorno, por lo que a partir de las imágenes obtenidas con el citoesqueleto y núcleo teñidos se puede analizar la interacción de las células con los diferentes eluatos de los materiales estudiados, mediante la observación de la distribución y dinámica del citoesqueleto celular<sup>[185]</sup>.

La tinción con DAPI es ampliamente utilizada para estudiar los efectos de los diferentes materiales sobre los núcleos celulares. <sup>[132,133,186]</sup>.

Del mismo modo, la faloidina supone el fluorocromo de elección para el estudio del citoesqueleto celular para numerosos autores<sup>[132,133,187]</sup>.

La relevancia de este experimento radica en que los componentes citotóxicos de los materiales dentales inducen pérdida de integridad celular, núcleos picnóticos y alteración de la organización del citoesqueleto<sup>[188]</sup>.

Este fenómeno se evidenció con Cariesolut especialmente al 2% de concentración, que mejoró proporcionalmente con el aumento de la dilución de los materiales. En BRIX3000® al 2%, solo se observaron algunos residuos celulares como con Cariesolut, pero a diferencia de Cariesolut, BRIX3000® mejoró el crecimiento celular a concentraciones de 0,1 % y 0,01 % con resultados similares al control. Esto continúa argumentando la hipótesis de que BRIX3000® a altas concentraciones podría favorecer la pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis, dando como consecuencia resultados desfavorables en aquellos experimentos cuyo protocolo incluía la retirada de la suspensión celular.

El comportamiento de NATURAL-CARE y Papacárie Duo® en el experimento de inmunofluorescencia confirmó lo observado tanto en nuestro experimento de MTT como en los estudios que apoyaban nuestros resultados, existiendo una baja confluencia celular al 2% en ambos casos, la cual mejoró de manera proporcional al aumento de la dilución de los materiales.

Como ya se ha mencionado, la tinción del citoesqueleto celular es un experimento utilizado por diversos autores para evaluar las variaciones en la morfología y estructura del citoesqueleto de actina de las DPSCs que se puedan producir al exponerlas a materiales dentales a distintas concentraciones<sup>[187,189]</sup>. San y cols. <sup>[187]</sup> observaron en su estudio sobre las DPSCs como Theracal LC daba lugar a una baja confluencia de células con, además, morfología aberrante, a diferencia de Theracal PT para las mismas diluciones, lo que avala el uso de esta técnica en estudios *in vitro*.

## 5.9. SOBRE EL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

La hipótesis de que BRIX3000® a altas concentraciones podría favorecer la pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis se reafirma con los resultados obtenidos en el análisis del ciclo celular, ya que con BRIX3000® al 2% no se observaban células, pero al 0,1% y 0,01% permitió un porcentaje de núcleos fragmentados inferior al 7% y una mejora radical en las distribuciones de ciclo celular equiparables a la del grupo control.

Este experimento corrobora el comportamiento observado para Cariesolut hasta el momento, ya que debido a su alta citotoxicidad al 2% no se observaban células al haberse producido apoptosis, siendo las células incapaces de dividirse al aplicar el tratamiento al 0,1%, observándose todas las células detenidas en la fase G1, con desaparición de las fases S y G2 como consecuencia. Además, aunque se diluya al 0,01% las fases G0/G1 se muestran ralentizadas, existiendo en consecuencia menor síntesis de nuevo ADN al haber menos células en la fase S de síntesis, siendo por tanto el material que más afectó al ciclo de las células. A pesar de la falta en la literatura de estudios similares realizados con agentes de eliminación de caries químico-mecánicos, es de suma importancia que estas pruebas se realicen en combinación porque hacen que los resultados relacionados con la citotoxicidad sean más reales y representativos.

NATURAL-CARE y Papacárie Duo® afectaron al ciclo celular de manera similar, produciendo al 2% un alto porcentaje de fragmentos celulares, superior al 60%, con la salvedad de NATURAL-CARE no afecta a la fase G2, permitiendo la fase S pero de manera ralentizada, pues las células sintetizan ADN pero les lleva mayor tiempo permaneciendo más en esta fase. Por el contrario, Papacárie Duo® produce directamente la completa detención de la fase G2 que sugiere que las células estaban dividiéndose antes de aplicar el tratamiento y se detienen todas en esta fase, lo que explica que no se observe nueva síntesis de ADN, produciendo como consecuencia la desaparición de la fase S en el análisis del ciclo celular. En concordancia con los resultados de los anteriores experimentos, al disminuir la concentración de ambos materiales al 0,1% y 0,01% mejoró de manera proporcional la distribución de fases

del ciclo celular y por tanto su biocompatibilidad. NATURAL-CARE y Papacárie Duo® se comportaron de manera similar, sin embargo, cabe destacar que NATURAL-CARE produjo un menor porcentaje de fragmentos celulares para ambas diluciones.

El análisis de las distribuciones del ciclo células de las DPSCs mediante la tinción con yoduro de propidio ha sido realizado anteriormente por otros autores para analizar el efecto biológico que diferentes materiales puedan tener sobre las mismas<sup>[190,191]</sup>. Es el caso del estudio de Chang y cols. <sup>[192]</sup>, donde analizaron la biocompatibilidad del metacrilato de bisfenol-glicidil (BisGMA) sobre las DPSCs mediante el análisis del ciclo celular de las mismas, encontrando que la exposición de las células a BisGMA producía la detención de las fases G2/M, y concluyendo por tanto que es importante proteger la pulpa dental contra la toxicidad de los monómeros presentes en la resinas compuestas y los agentes adhesivos.

Así mismo, la evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada para analizar la biocompatibilidad de diversos materiales bioactivos de recubrimiento pulpar, ya que la biocompatibilidad de los materiales de protección pulpar es el factor más importante cuando éstos tienen contacto directo o indirecto con la pulpa. Gracias a este ensayo numerosos autores observaron el mismo efecto de Theracal LC sobre el ciclo celular de diferentes líneas celulares (células de sangre periférica, células de la pulpa dental humana y DPSCs) encontraron que Theracal LC inducía un aumento significativo de las fases G0/G1, indicando la presencia de un mayor número de células muertas en comparación con el resto de materiales que estudiaban<sup>[157,184,187,193]</sup>. Esto se debe a que la citometría de flujo es la técnica de referencia para analizar las células en las fases G0/G1, S y G2/M de forma rápida y reproducible<sup>[194]</sup>.

## **5.10. SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR**

En nuestro ensayo de apoptosis/necrosis celular, BRIX3000® al 2% presentó un 68,4% de células vivas, estos resultados sugieren que a altas concentraciones este material podría favorecer la pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis, ya que para el ensayo de apoptosis/necrosis se utilizó la totalidad de la suspensión

celular, mientras que para los anteriores se trabajó únicamente con células adheridas a las diferentes superficies de las placas utilizadas, desechando la suspensión restante donde estarían aquellas células que BRIX3000® despegó del fondo sin llegar a producir su apoptosis. Los resultados de este experimento confirmarían la hipótesis que se fundó al interpretar los resultados de inmunofluorescencia sobre BRIX3000® al 2%, ya que los resultados del experimento de apoptosis celular demuestran que al 2% BRIX3000® produce levantamiento celular y no una muerte celular masiva; esto explicaría por qué en el experimento de inmunofluorescencia no vemos células al 2% al encontrarse despegadas.

En este ensayo se evidenció como a una concentración del 0,01% NATURAL-CARE presentó un porcentaje de células vivas equiparable al del control, el cual descendió al aumentar la concentración del material, pero nunca de manera drástica. En este sentido, tanto BRIX3000® como Papacárie Duo® y NATURAL-CARE se comportaron de manera similar, disminuyendo únicamente el porcentaje de células vivas a la mitad con Cariesolut al 2% e incluso al 0,1%.

Este ensayo corrobora los resultados obtenidos en el análisis del ciclo celular para Cariesolut al 0,1%, donde produjo un 87,86% de debris, que concuerda con el alto porcentaje (39,83%) de células apoptóticas tardías y necróticas que produce a dicha concentración.

El ensayo de apoptosis celular ha sido comúnmente utilizado en los estudios presentes en la literatura para el análisis *in vitro* de la biocompatibilidad de materiales dentales como resinas compuestas y adhesivos dentales sobre todo<sup>[195-198]</sup>.

Kunert y cols. <sup>[193]</sup> utilizaron este ensayo para evaluar la citotoxicidad de diferentes materiales bioactivos de recubrimiento pulpar (Theracal LC, ProRoot MTA, MTA Angelus, Biodentine, ACTIVA BioACTIVE y Predicta Bioactive) encontrando que únicamente Theracal LC aumentó significativamente el porcentaje de células en las etapas tempranas y tardías de la apoptosis. De nuevo, el uso de esta técnica mediante citometría de flujo está avalada para estudios de citotoxicidad.

## **5.11. SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS**

Aunque a una concentración del 0,01% Cariesolut mostró un porcentaje de células vivas similar al del control, los niveles de ROS intracelular que presentan las células a las que se les aplicó este tratamiento son el doble de lo observado en el grupo control. BRIX3000® fue el único material que produjo unos niveles de ROS intracelular al 0,1% y 0,01% equiparables a los del grupo control.

En concordancia con el resto de los experimentos, NATURAL-CARE a bajas concentraciones mostro una biocompatibilidad muy favorable, la cual fue menor que la observada para BRIX3000®, pero resultó equiparable a la que presentó Papacárie Duo®, un material de remoción química de caries más comúnmente conocido y estudiado.

Del mismo modo, otros autores también han utilizado la medición de ROS intracelular con el objetivo de comparar las características químicas y biológicas de diferentes compuestos dentales<sup>[174,199,200]</sup>. Es el caso del estudio de Chen y cols. <sup>[201]</sup> donde gracias a la medición de ROS intracelular concluyeron que los geles blanqueadores inducían citotoxicidad y conducción del dolor en las células madre de la pulpa dental.

Para el estudio de la biocompatibilidad de estos cuatro materiales para la remoción química de caries la citometría de flujo ha desempeñado un papel primordial. En la literatura más reciente además de las pruebas de citotoxicidad se ha utilizado ampliamente la citometría de flujo para el estudio de la biocompatibilidad de los materiales dentales, ya que permite analizar la apoptosis, la necrosis y la progresión del ciclo celular<sup>[196,202-204]</sup>. Además la citometría de flujo ha demostrado ser una técnica rápida (con una duración media de una a dos horas), de gran precisión, y que permite realizar mediciones cuantitativas simultáneas de la generación de superóxido mitocondrial preservando al máximo las funciones celulares<sup>[140]</sup>.

## **5.12. PAPAÍNA COMO PRINCIPIO ACTIVO**

Es un dato reseñable, y consideramos oportuno discutir que BRIX3000®, Papacárie Duo® y NATURAL-CARE comparten el mismo principio activo, la papaína. Sin embargo, mientras que BRIX3000® no produjo la muerte celular por completo a altas

concentraciones, Papacárie Duo® y NATURAL-CARE si lo hicieron. Esto puede deberse al hecho de que la papaína que contenga BRIX3000® sea una enzima proteolítica más estable la cual produce el levantamiento de las células de la placa de cultivo sin llegar a producir su apoptosis. También podría explicarse por el hecho de que en la composición de Papacárie Duo® y NATURAL-CARE podemos encontrar cloramina-T, mientras que BRIX3000® no contiene dicho excipiente. La cloramina es un compuesto formado por cloro y amonio con propiedades bactericida y desinfectante, y se utiliza para ablandar químicamente la dentina cariada. La utilización de la cloramina da como resultado túbulos dentinarios abiertos en la capa externa de la dentina cariada<sup>[116,148]</sup>. La ausencia de este excipiente en BRIX3000® podría explicar por tanto la biocompatibilidad más favorable observada en este material.

### **5.13. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

En lo que a las limitaciones del estudio se refiere, cabe destacar el hecho de que se trata de un estudio *in vitro*, con los condicionamientos inherentes que conllevan este tipo de método científico. Debemos tener en cuenta que las condiciones simuladas en el laboratorio no reproducen de manera exacta las condiciones del medio oral, lo que dificulta la extrapolación de las conclusiones obtenidas. En concreto, la concentración del material que pueda llegar a la pulpa depende del espesor de dentina presente, y aunque se analizó la biocompatibilidad de los cuatro materiales a diferentes concentraciones para simular distintos espesores de dentina, se hace complejo dilucidar de manera precisa la cantidad de producto que llegaría a la pulpa dental de acuerdo con la profundidad de la cavidad, lo que obliga a interpretar los resultados a grandes rasgos, y deja al descubierto la necesidad de estudios en animales para que los resultados del presente estudio obtengan mayor repercusión científica.

Por otro lado, este estudio analiza únicamente propiedades biológicas, por lo que se requerirán estudios futuros que abarquen otros aspectos como son la eficacia terapéutica, el posible efecto de estos materiales sobre la adhesión de la posterior restauración, o la medición de la reducción de la ansiedad por parte del paciente con la utilización de estos materiales.

Otra limitación del presente estudio fue la dificultad de comparar nuestros resultados con los de otros estudios realizados previamente en la mayoría de los experimentos. Ningún autor hasta el momento ha realizado experimentos de velocidad de migración celular, de inmunofluorescencia, de análisis del ciclo celular, de apoptosis celular, ni de liberación de ROS para estudiar la biocompatibilidad de estos cuatro materiales para la remoción química de la caries dental.

Además, hasta donde es conocido, este es el primer estudio que analiza las propiedades biológicas tanto de NATURAL-CARE como de Cariesolut en condiciones controladas de laboratorio.

#### **5.14. PERSPECTIVAS FUTURAS**

De las limitaciones del presente estudio surge la necesidad de llevar a cabo futuros estudios *in vivo* de experimentación animal que validen los resultados obtenidos hasta el momento. En concreto, el diseño de un estudio realizado con ratas sería la progresión más lógica ya que la rata, después del ratón, es el animal de experimentación más utilizado en investigaciones biomédicas. Sería la rata el animal de elección por su mayor tamaño, mejor manipulación y visualización dentaria<sup>[205,206]</sup>.

# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

El presente estudio reveló que el material más adecuado para la eliminación química de la caries dental es BRIX3000® porque presentó resultados de biocompatibilidad *in vitro* más favorables en las DPSCs. La biocompatibilidad observada para Papacárie Duo® y NATURAL-CARE hace que éstas sean opciones menos preferentes, pero también aceptables, mejorando dicha biocompatibilidad de manera proporcional al aumento de la dilución del material. Los resultados de biocompatibilidad derivados de ese trabajo desaconsejaron el uso de Cariesolut como material para la remoción químico-mecánica de caries. En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos deducir las siguientes conclusiones específicas:

- La concentración de inhibición media (IC50) fue mayor para BRIX3000®, seguido de NATURAL-CARE, Papacárie Duo® y Cariesolut.
- La viabilidad celular fue mayor en presencia de BRIX3000® al 0,1 y 0,01%, seguido de NATURAL CARE, Papacárie Duo® y Cariesolut.
- La velocidad de migración celular fue favorable en presencia de BRIX3000® a bajas concentraciones, seguido de NATURAL-CARE, Pacárie Duo y Cariesolut.
- La morfología del citoesqueleto se vio más alterada con BRIX3000® y Cariesolut al 2%, mejorando únicamente en el caso de BRIX3000® al diluir los materiales. A bajas concentraciones la mejor confluencia de células se observa en BRIX3000®, seguido de NATURAL-CARE, Papacárie Duo®, y Cariesolut en último lugar.
- Los niveles de especies reactivas de oxígeno fueron considerablemente mayores en presencia de Cariesolut en comparación con Papacárie Duo®, NATURAL-CARE y BRIX3000®.
- Las fases del ciclo celular de las DPSCs se vieron menos afectadas en presencia de BRIX3000®, seguido de NATURAL-CARE y Papacárie Duo®. Cariesolut fue el material que más afectó al ciclo de las células.
- BRIX3000® a bajas concentraciones fue el material que menos indujo la apoptosis celular, seguido de NATURAL-CARE, Papacárie Duo® y Cariesolut.

- Los resultados sugieren que BRIX3000® produce a altas concentraciones pérdida de adhesión celular sin llegar a producirse apoptosis.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García Barbero J. Patología y terapéutica dental. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 1014.
2. Soares I, Goldberg F. Endodoncia. Técnica y fundamentos. 2ª ed. Argentina: Panamericana; 2012.
3. Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. Endodoncia. Tecnicas Clinicas Bases Cientificas. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
4. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. Front Biosci Elite Ed. 2011;3:711-35.
5. Gotliv BA, Veis A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. Calcif Tissue Int. 2007;81(3):191-205.
6. Kagayama M, Sasano Y, Sato H, Kamakura S, Motegi K, Mizoguchi I. Confocal microscopy of dentinal tubules in human tooth stained with alizarin red. Anat Embryol. 1999;199(3):233-8.
7. Fuentes VM. Propiedades mecánicas de la dentina humana. Av En Odontoestomatol. 2004;20(2):79-83.
8. Goldberg M, Molon Noblot M, Septier D. Effect of 2 methods of demineralization on the on the preservation of glycoproteins and proteoglycans in the intertubular and peritubular dentin in the horse. J Biol Buccale. 1980;8(4):315-30.
9. Weiner S, Veis A, Beniash E, Arad T, Dillon JW, Sabsay B, et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. J Struct Biol. 1999;126(1):27-41.

10. D'Ortenzio L, Kahlon B, Peacock T, Salahuddin H, Brickley M. The rachitic tooth: Refining the use of interglobular dentine in diagnosing vitamin D deficiency. *Int J Paleopathol.* 2018;22:101-8.
11. Obón Nogués JA, Whyte Orozco J. Atlas de embriología y anatomía dental. 1ªed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza; 2016.
12. Badavannavar AN, Ajari S, Nayak KUS, Khijmatgar S. Abfraction: Etiopathogenesis, clinical aspect, and diagnostic-treatment modalities: A review. *Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dent Res.* 2020;31(2):305-11.
13. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1480.
14. Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellermann O, Goldberg M, Dr ès Sciences Naturelles. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S13-18.
15. Berman LH, Hargreaves KM. Cohen. Vías de la Pulpa. Elsevier Health Sciences; 2022.
16. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.
17. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to Control Inflammation and Facilitate Dental Pulp Regeneration. *J Endod.* 2014;40(4 0):S6-12.
18. 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 Dayt Ohio.* 2012;30(6):1277-85.
19. Mortada I, Mortada R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur J Med Genet.* 2018;61(2):114-8.

20. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2017;74(13):2345-60.
21. Baker CL, Pera MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):25-34.
22. Bhartiya D. Pluripotent Stem Cells in Adult Tissues: Struggling To Be Acknowledged Over Two Decades. *Stem Cell Rev Rep*. 2017;13(6):713-24.
23. Li J, Tian W, Song J. Proteomics Applications in Dental Derived Stem Cells. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1602-10.
24. Mirzaei H, Sahebkar A, Sichani LS, Moridikia A, Nazari S, Sadri Nahand J, et al. Therapeutic application of multipotent stem cells. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2815-23.
25. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, Gervois P, Vangansewinkel T, Ratajczak J, et al. Cryopreservation and Banking of Dental Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951:199-235.
26. Goswami M, Kumar G, Sharma S. Dental Stem Cells: Awareness, knowledge, and attitude of dental professionals-A cross-sectional study. *Spec Care Dent Off Publ Am Assoc Hosp Dent Acad Dent Handicap Am Soc Geriatr Dent*. 2020;40(1):90-6.
27. Bojic S, Volarevic V, Ljujic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. *Histol Histopathol*. 2014;29(6):699-706.
28. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev Camb Engl*. 2000;127(8):1671-9.
29. Motohashi T, Kunisada T. Extended multipotency of neural crest cells and neural crest-derived cells. *Curr Top Dev Biol*. 2015;111:69-95.

30. Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Dev Camb Engl.* 2013;140(11):2247-51.
31. Dupin E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM, Le Douarin NM. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol.* 2018;444 Suppl 1:S47-59.
32. Hall BK. Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genes Dev.* 2000 2018;56(6-7):e23103.
33. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(25):13625-30.
34. 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 USA.* 2003;100(10):5807-12.
35. Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res.* 2005;84(11):994-8.
36. Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials.* 2011;32(29):7053-9.
37. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):61.
38. Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9(4):445-64.
39. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:99-113.

40. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?. *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439-58.
41. Rodas-Junco BA, Villicaña C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue Eng Regen Med.* 2017;14(4):333-47.
42. Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini A, Lo Muzio L, et al. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1237:47-52.
43. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZAC, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* 2010;36(9):1504-15.
44. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007;14(6):1162-71.
45. Huang GTJ, 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.
46. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):329-35.
47. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* 2008;17(6):1175-84.
48. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for

- tissue engineering. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2009;60 Suppl 7:167-75.
49. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(1):95-112.
  50. Patel M, Smith AJ, Sloan AJ, Smith G, Cooper PR. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. *Arch Oral Biol.* 2009;54(10):898-908.
  51. Alvarez R, Lee HL, Hong C, Wang CY. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *Int J Oral Sci.* 2015;7(4):205-12.
  52. Huang GTJ, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(2):605-15.
  53. Sui B, Wu D, Xiang L, Fu Y, Kou X, Shi S. Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application. *J Endod.* 2020;46(9):S46-55.
  54. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):5.
  55. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-90.
  56. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003;82(12):976-81.

57. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(1):90-3.
58. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(10):3023-31.
59. Lee CH, Cook JL, Mendelson A, Moioli EK, Yao H, Mao JJ. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet Lond Engl*. 2010;376(9739):440-8.
60. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004;83(8):590-5.
61. Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng*. 2006;12(11):3097-105.
62. Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ, et al. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res*. 2011;90(8):1013-8.
63. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 2019;39(1):31-59.
64. Faruqi T, Dhawan N, Bahl J, Gupta V, Vohra S, Tu K, et al. Molecular, phenotypic aspects and therapeutic horizons of rare genetic bone disorders. *BioMed Res Int*. 2014;2014:670842.
65. Cheung AYL, Horvath LM, Carrel L, Ellis J. X-chromosome inactivation in rett syndrome human induced pluripotent stem cells. *Front Psychiatry* 2012;3:24.

66. Masuda K, Han X, Kato H, Sato H, Zhang Y, Sun X, et al. Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2269.
67. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res* 2012;22(2):288-304.
68. Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A, et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*. 2014;513(7519):551-4.
69. Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*. 2013;34(8):1888-97.
70. Barros MA, Martins JFP, Maria DA, Wenceslau CV, De Souza DM, Kerkis A, et al. Immature Dental Pulp Stem Cells Showed Renotropic and Pericyte-Like Properties in Acute Renal Failure in Rats. *Cell Med*. 2015;7(3):95-108.
71. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.
72. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(16):6503-8.
73. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13.
74. 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.

75. Righolt AJ, Jevdjevic M, Marcenes W, Listl S. Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *J Dent Res*. 2018;97(5):501-7.
76. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96(4):380-7.
77. Knapp R, Marshman Z, Gilchrist F, Rodd H. The impact of dental caries and its treatment under general anaesthetic on children and their families. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2021;22(4):567-74.
78. Cheng L, Zhang L, Yue L, Ling J, Fan M, Yang D, et al. Expert consensus on dental caries management. *Int J Oral Sci*. 2022;14:17.
79. Feldens CA, Pinheiro LL, Cury JA, Mendonça F, Groisman M, Costa RAH, et al. Added Sugar and Oral Health: A Position Paper of the Brazilian Academy of Dentistry. *Front Oral Health*. 2022;3:869112.
80. Fernández CE. Una de las enfermedades más prevalentes del mundo no es transmisible y puede ser controlada. *Rev Clínica Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2016;9(2):175-6.
81. Ferreira-Nóbilo N de P, Sousa M da LR de, Cury JA. Conceptualization of dental caries by undergraduate dental students from the first to the last year. *Braz Dent J*. 2014;25(1):59-52.
82. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017;44(S18):S5-11.

83. Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. *Braz Oral Res.* 2009;23:23-30.
84. O'Hagan-Wong K, Enax J, Meyer F, Ganss B. The use of hydroxyapatite toothpaste to prevent dental caries. *Odontology.* 2022;110(2):223-30.
85. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol.* 2014;5(3):108-14.
86. Featherstone JD. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent.* 2004; 2 Suppl 1:259-64.
87. Dorri M, Martinez-Zapata MJ, Walsh T, Marinho VC, Sheiham A, Zaror C. Atraumatic restorative treatment versus conventional restorative treatment for managing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 12(12):CD008072.
88. Qvist V, Poulsen A, Teglers PT, Mjör IA. The longevity of different restorations in primary teeth. *Int J Paediatr Dent.* 2010;20(1):1-7.
89. Frencken JE, Peters MC, Manton DJ, Leal SC, Gordan VV, Eden E. Minimal intervention dentistry for managing dental caries - a review: report of a FDI task group. *Int Dent J.* 2012;62(5):223-43.
90. Banerjee A, Watson TF, Kidd EA. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J.* 2000;188(9):476-82.
91. Schriks MCM, van Amerongen WE. Atraumatic perspectives of ART: psychological and physiological aspects of treatment with and without rotary instruments. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(1):15-20.
92. Heintze SD, Rousson V. Clinical effectiveness of direct class II restorations - a meta-analysis. *J Adhes Dent.* 2012;14(5):407-31.

93. Ricketts D, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(3): CD003808.
94. Caicedo MV, Raffan-Sanabria F, Duarte-Romero M. Manejo perioperatorio del paciente hemofílico. *Rev Mex Anesthesiol.* 2009; 32(3):177-185.
95. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):58-67.
96. Kidd E a. M. How «clean» must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004;38(3):305-13.
97. Banerjee A, Frencken JE, Schwendicke F, Innes NPT. Contemporary operative caries management: consensus recommendations on minimally invasive caries removal. *Br Dent J.* 2017;223(3):215-22.
98. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979;4(2):63-70.
99. Pruthi RK. Hemophilia: a practical approach to genetic testing. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(11):1485-99.
100. Jayandharan GR, Srivastava A, Srivastava A. Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(1):64-78.
101. Cianetti S, Pagano S, Nardone M, Lombardo G. Model for Taking Care of Patients with Early Childhood Caries during the SARS-Cov-2 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(11):3751.
102. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry- -a review. *FDI Commission Project 1-97. Int Dent. J* 2000;50(1):1-12.

103. de Menezes Abreu DM, Leal SC, Mulder J, Frencken JE. Pain experience after conventional, atraumatic, and ultraconservative restorative treatments in 6- to 7-yr-old children. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(2):163-8.
104. Hu JY, Li YQ, Smales RJ, Yip KHK. Restoration of teeth with more-viscous glass ionomer cements following radiation-induced caries. *Int Dent J.* 2002;52(6):445-8.
105. Yip HK, Smales RJ. Glass ionomer cements used as fissure sealants with the atraumatic restorative treatment (ART) approach: review of literature. *Int Dent J.* 2002;52(2):67-70.
106. Phantumvanit P, Songpaisan Y, Pilot T, Frencken JE. Atraumatic restorative treatment (ART): a three-year community field trial in Thailand--survival of one-surface restorations in the permanent dentition. *J Public Health Dent.* 1996; 56:141-5.
107. Hamama HHH, Yiu CKY, Burrow MF, King NM. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on Chemomechanical Caries Removal. *Oper Dent.* 2015;40(4):E167-178.
108. Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975;54(5):1019-26.
109. Jawa D, Singh S, Somani R, Jaidka S, Sirkar K, Jaidka R. Comparative evaluation of the efficacy of chemomechanical caries removal agent (Papacarie) and conventional method of caries removal: an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2010;28(2):73-7.
110. Beeley, J., Yip, H. & Stevenson, A. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *Br Dent J.* 2000; 188(8):427-30.
111. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;30(2):115-9.

112. Ganesh, M., & Parikh, D. Chemomechanical caries removal (CMCR) agents: Review and clinical application in primary teeth. *J Dent Oral Hyg.* 2011; 3(3), 34-45.
113. Denise SM, Carolina CG, Bruno H, Lara JM, Elaine MS, Sandra KB. Análisis clínico y radiográfico de las técnicas ART y remoción químico- mecánica de caries - estudio piloto. *Int J Odontostomat.* 2011; 13(18): 29-35.
114. Hamama H, Yiu C, Burrow M. Current update of chemomechanical caries removal methods. *Aust Dent J.* 2014;59(4):446-56.
115. Ismail MMM, Al Haidar AH. Evaluation of the Efficacy of Caries Removal Using Papain Gel (Brix 3000) and Smart Preparation Bur (in vivo Comparative Study). *J Pharm Sci.* 2019;11(2):444-449.
116. Tonami K ichi, Araki K, Mataka S, Kurosaki N. Effects of chloramines and sodium hypochlorite on carious dentin. *J Med Dent Sci.* 2003;50(2):139-46.
117. Kattan HF. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in reducing cariogenic bacteria in primary deciduous dentine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;36:102600.
118. Souza TF, Martins ML, Magno MB, Vicente-Gomila JM, Fonseca-Gonçalves A, Maia LC. Worldwide research trends on the use of chemical-mechanical caries removal products over the years: a critical review. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent.* 2022;23(6):869-83.
119. Ríos V, Romero N, Valencia C, Balanta J. Methods for determining the biocompatibility of dental materials. *Rev Estomatol.* 2017;22(2):7-12.
120. International Organization for Standardization. ISO 10993-12. Biological evaluation of Medical Devices—Part 12: Sample Preparation and Reference Materials. 2007.
121. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Test for in vitro cytotoxicity. 2009.

122. International Organization for Standardization. ISO 7405. Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. 2008.
123. Rach J, Halter B, Aufderheide M. Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Toxikol Pathol*. 2013;65(7-8):973-8.
124. Hosseinpour S, Gaudin A, Peters OA. A critical analysis of research methods and experimental models to study biocompatibility of endodontic materials. *Int Endod J*. 2022;55(S2):346-69.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1):55-63.
126. Escobar M L, Rivera A, Aristizábal G FA. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y mtt en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*. 2010;17(1):67-74.
127. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.
128. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12827.
129. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol*. 2017;137(2):e11-6.
130. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:107.

131. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1897:299-311.
132. Simancas-Escorcia V, Diaz-Caballero A, Simancas-Escorcia V, Diaz-Caballero A. Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales. *Entramado*. 2019;15(1):276-84.
133. Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, Benjamin M. Cytoskeleton of the mesenchymal cells of the rat dental papilla and dental pulp. *Connect Tissue Res*. 1995;32(1-4):71-6.
134. Figueiredo MVD, Alexiou GA, Vartholomatos G, Rehder R. Advances in Intraoperative Flow Cytometry. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(21):13430.
135. Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3674.
136. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*. 2001;38(2):179-93.
137. Soragni C, Rabussier G, Lanz HL, Bircsak KM, de Windt LJ, Trietsch SJ, et al. A versatile multiplexed assay to quantify intracellular ROS and cell viability in 3D on-a-chip models. *Redox Biol*. 2022;57:102488.
138. Wang Q, Zou MH. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1732:507-17.
139. Song P, Zou MH. Redox regulation of endothelial cell fate. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3219-39.
140. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2295-301.

141. Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(7):499-515.
142. Kupcho K, Shultz J, Hurst R, Hartnett J, Zhou W, Machleidt T, et al. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis.* 2019;24(1):184-97.
143. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):962-78.
144. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.
145. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 1990;265(9):4923-8.
146. Hermida Bruno L, Cardoso Guedes C, Jansiski Motta L, Marcílio Santos E, Bussadori S. Comparación entre la utilización de elementos rotatorios de baja velocidad y tratamiento químico mecánico de caries dentinal en dentición decidua. *Acta Odontol Venez.* 2009;47(4):22-30.
147. Ammari MM, Moliterno LFM. Remoção químico-mecânica da cárie: evidências atuais. *Rev Bras Odontol.* 2005;62(1-2):125-7.
148. Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Clinical evaluation of chemomechanical caries removal in primary molars and its acceptance by patients. *Caries Res.* 2001;35(3):205-10.
149. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. A multi-centre study. *Caries Res.* 1999;33(3):171-7.

150. Munshi AK, Hegde AM, Shetty PK. Clinical evaluation of Carisolv in the chemico-mechanical removal of carious dentin. *J Clin Pediatr Dent.* 2001;26(1):49-54.
151. Franca CM, Balbinot G de S, Cunha D, Saboia V de PA, Ferracane J, Bertassoni LE. In-vitro models of biocompatibility testing for restorative dental materials: From 2D cultures to organs on-a-chip. *Acta Biomater.* 2022;150:58-66.
152. Villegas Á, Naranjo E, Gómez D. Tests of biocompatibility for dental materials. Review of the literature. *Rev Estomatol.* 2017;16(2).
153. Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46(3):195-7.
154. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008;29(20):2941-53.
155. Costa CA de S, Ribeiro APD, Giro EMA, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater.* 2011;27(7):e158-170.
156. Garrido M, Morales D, Saldías MP, Fernández C, Villalobos V, Cerda O, et al. Cellular response of human apical papilla cells to calcium hydroxide and tricalcium silicate-based cements. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):106.
157. Rodríguez-Lozano FJ, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Lozano A, Pecci-Lloret MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. *Clin Oral Investig.* 2021;25(8):5009-24.
158. Vajrabhaya L ongthong, Pasaasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent.* 2003;28(4):440-4.
159. Rodríguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda JM. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(4):979-88.

160. Dueñas LA, Criollo WD, Bernal AJM de, Piamba JE. Enfermedad perinatal y viabilidad celular renal postmortem in vitro en el Hospital Universitario del Valle, Cali. *Colomb Médica*. 1996;27(3,4):110-6.
161. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009;2(2):514-48.
162. Pedano MS, Li X, Camargo B, Hauben E, De Vleeschauwer S, Yoshihara K, et al. Injectable phosphopullulan-functionalized calcium-silicate cement for pulp-tissue engineering: An in-vivo and ex-vivo study. *Dent Mater*. 2020;36(4):512-26.
163. Maru V, Madkaikar M, Shabrish S, Kambli P, Dalvi A, Setia P. Evaluation and comparison of cytotoxicity and bioactivity of chemomechanical caries removal agents on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2022;23(5):787-96.
164. Bulut G, Zekioglu O, Eronat C, Bulut H. Effect of Carisolv on the human dental pulp: a histological study. *J Dent*. 2004;32(4):309-14.
165. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Kanda Y, Nakajima H, Sakagami H. Cytotoxicity and pro-inflammatory action of chemo-mechanical caries-removal agents against oral cells. *In vivo*. 2014;28(4):549-56.
166. Bussadori SK, Amancio OM, Martins MD, Guedes CC, Alfaya TA, Santos EM, et al. Production of extracellular matrix proteins by human pulp fibroblasts in contact with papacárie and carisolv. *Oral Health Prev Dent*. 2014;12(1):55-9.
167. Martins MD, Fernandes KPS, Motta LJ, Santos EM, Pavesi VCS, Bussadori SK. Biocompatibility analysis of chemomechanical caries removal material Papacárie on cultured fibroblasts and subcutaneous tissue. *J Dent Child*. 2009;76(2):123-9.
168. Sepet E, Bilir A, Akçin O, Aytepe Z. The effects of a caries-removing gel (Carisolv) on FM3A cell-line in vitro. *J Dent*. 2004;32(3):213-8.

169. Sharma N, Sisodia S, Jain A, Bhargava T, Kumar P, Rana KS. Evaluation of the Efficacy of Recent Caries Removal Techniques: An In Vitro Study. *Cureus*. 2023;15(1):e34432.
170. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):21-6.
171. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008;26(3):638-45.
172. Silva CMI. Características funcionales y propiedades inmunomoduladoras de células madre mesenquimales de origen pulpar para el desarrollo de un modelo de regeneración tisular: estudio experimental in vitro [tesis doctoral]. Barcelona, Universidad Internacional de Cataluña;2018.
173. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003;102(10):3483-93.
174. García-Bernal D, Pecci-Lloret MP, López-García S. The Cytocompatibility of Silver Diamine Fluoride on Mesenchymal Stromal Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: An In Vitro Study. *Mater Basel Switz*. 2022;15(6):2104.
175. Guedes FR, Bonvicini JFS, de Souza GL, da Silva WHT, Moura CCG, Paranhos LR, et al. Cytotoxicity and dentin composition alterations promoted by different chemomechanical caries removal agents: A preliminary in vitro study. *J Clin Exp Dent*. 2021;13(8):e826-34.
176. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-67.

177. Niepel M, Hafner M, Mills CE, Subramanian K, Williams EH, Chung M, et al. A Multi-center Study on the Reproducibility of Drug-Response Assays in Mammalian Cell Lines. *Cell Syst.* 2019;9(1):35-48.e5.
178. Santos TML, Bresciani E, Matos F de S, Camargo SEA, Hidalgo APT, Rivera LML, et al. Comparison between conventional and chemomechanical approaches for the removal of carious dentin: an in vitro study. *Sci Rep.* 2020;10:8127.
179. Bastos LA, Silva FL, Thomé JPDQ, Arnez MFM, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Effects of Papain-Based Gel Used For Caries Removal on Macrophages and Dental Pulp Cells. *Braz Dent J.* 2019;30(5):484-90.
180. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration. *Compr Physiol.* 2012;2(4):2369-92.
181. Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhes Migr.* 2014;8(5):440-51.
182. Sun Y, Liu J, Luo T, Shen Y, Zou L. Effects of two fast-setting pulp-capping materials on cell viability and osteogenic differentiation in human dental pulp stem cells: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2019;100:100-5.
183. 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):1118-23.
184. Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-lam N, Mahanonda R, Pavasant P, et al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. *BMC Oral Health.* 2021;21:209.
185. Joo C, Balci H, Ishitsuka Y, Buranachai C, Ha T. Advances in singlemolecule fluorescence methods for molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77: 51-76.

186. Simancas–Escorcía VH, Díaz–Caballero AJ, Vergara–Hernández CI. Diferencias fenotípicas de fibroblastos gingivales en sujetos con hiperplasia gingival idiopática frente a sujetos periodontalmente sanos: estudio piloto. *Acta Odontol Colomb*. 2021; 11(2):25-38.
187. Sanz JL, Soler-Doria A, López-García S, García-Bernal D, Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, et al. Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2021;47(12):1896-906.
188. Rohr N, Bergemann C, Nebe JB, Fischer J. Crystal structure of zirconia affects osteoblast behavior. *Dent Mater*. 2020;36(7):905-13.
189. Wang J, Fangteng JZ, Liu H. Effect of iRoot BP Plus on biological behavior of deciduous tooth pulp stem cells and human pulp stem cells. *Shanghai J Stomatol*. 2019;28(3):251-8.
190. Luo H, Liu W, Zhang Y, Yang Y, Jiang X, Wu S, et al. METTL3-mediated m6A modification regulates cell cycle progression of dental pulp stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:159.
191. Chen CC, Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell responses to new calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J*. 2011;44(9):836-42.
192. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, et al. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*. 2010;31(32):8164-71.
193. Kunert M, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Sauro S, Bourgi R, Hardan L, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. *Cells*. 2022;11(20):3238.
194. Betters DM. Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J Adv Pract Oncol*. 2015;6(5):435-40.

195. Wawrzynkiewicz A, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Lukomska-Szymanska M, Lapinska B, Sokolowski J, et al. The Toxicity of Universal Dental Adhesives: An In Vitro Study. *Polymers*. 2021;13(16):2653.
196. Lee Y, An SY, Park YJ, Yu FH, Park JC, Seo DG. Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning*. 2016;38(1):36-42.
197. Wawrzynkiewicz A, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Lukomska-Szymanska M, Lapinska B, Sokolowski J, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Dental Universal Adhesives-An In Vitro Study. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3950.
198. Ilisulu SC, Oztop NE, Akkoc T, Seymen F. In vitro evaluation of pediatric restorative materials on human dental pulp stem cells. *Tissue Cell*. 2022;77:101871.
199. Jiang ES, Moon W, Lim BS, Chang J, Chung SH. Cytotoxicity and reactive oxygen species production induced by different co-monomer eluted from nanohybrid dental composites. *BMC Oral Health*. 2023;23:55.
200. Yoshino F, Yoshida A, Okada E, Okada Y, Maehata Y, Miyamoto C, et al. Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *J Photochem Photobiol B*. 2012;114:73-8.
201. Chen C, Huang X, Zhu W, Ding C, Huang P, Li R. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gel bleaching induces cytotoxicity and pain conduction in dental pulp stem cells via intracellular reactive oxygen species on enamel/dentin disc. *PLoS ONE*. 2021;16(9):e0257221.
202. Lukomska-Szymanska M, Konieczka M, Zarzycka B, Lapinska B, Grzegorzczak J, Sokolowski J. Antibacterial Activity of Commercial Dentine Bonding Systems against *E. faecalis*-Flow Cytometry Study. *Mater Basel Switz*. 2017;10(5):481.
203. Lapinska B, Konieczka M, Zarzycka B, Sokolowski K, Grzegorzczak J, Lukomska-Szymanska M. Flow Cytometry Analysis of Antibacterial Effects of Universal

- Dentin Bonding Agents on Streptococcus mutans. Mol Basel Switz. 2019;24(3):532.
204. Tuncer S, Demirci M, Schweikl H, Erguven M, Bilir A, Kara Tuncer A. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. Clin Oral Investig. 2012;16(6):1635-46.
205. Atchley WR, Fitch WM. Gene trees and the origins of inbred strains of mice. Science. 1991;254(5031):554-8.
206. Moñivas Palomero C, García López P, Arias Sanz P, Izquierdo Hernández A, López Carrizosa C, Guijarro Sánchez D. Estudio experimental para la valoración de la cicatrización ósea con Ácido Zoledrónico en ratas Wistar. Sanid Mil. 2015;71(4):232-8.



# **ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### ANEXO I

#### INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Investigación

CEI Comisión de  
Ética de  
Investigación

euni  
well European  
University for  
Well-Being

CMM  
CAMPUS MARE NOSTRUM

#### INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia,

CERTIFICA:

Que D<sup>a</sup> Nuria Pérez Guzmán ha presentado la memoria de trabajo de la Tesis Doctoral titulada "*Evaluación de la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries*", dirigida por D<sup>a</sup> María Pilar Pecci Lloret y D. Sergio López García a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día dieciocho de mayo de dos mil veintitrés<sup>1</sup>, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan firmo esta certificación con el visto bueno de la Presidenta de la Comisión.

Vº Bº  
LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN  
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA  
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 4562/2023

<sup>1</sup>A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación



Código seguro de verificación: RUXFMMMO-x04hxWgT-8r6W/JXL-MJxsH9fk

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

## ANEXO II

# INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

<p>Firmante: LUCIA PERIAGO GARCIA. Fecha/hora: 04/07/2023 11:33:46. Emisor del certificado: CN=CA SIBUR, SERIALNUMBER=4312123E, OU=QUALIFICACION, OU=SECRETARIA DE INVESTIGACION, OU=UNIVERSIDAD DE MURCIA, Email del certificado: CN=CA SIBUR, SERIALNUMBER=4312123E, OU=QUALIFICACION, OU=SECRETARIA DE INVESTIGACION, OU=UNIVERSIDAD DE MURCIA</p> <p>Firmante: MARIA SENENA CORBALAN GARCIA. Fecha/hora: 03/07/2023 11:42:21. Papel: Lucía Perriago, VICERRECTORA DE INVESTIGACION DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA</p>	 <b>INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA</b>
<p>Lucía Perriago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.</p>	
<p><b>CERTIFICA:</b></p>	
<p>Que D<sup>a</sup> Nuria Pérez Guzmán ha presentado la memoria de trabajo de la Tesis Doctoral titulada "<i>Evaluación de la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries</i>", dirigida por D<sup>a</sup> María Pilar Pecci Lloret y D. Sergio López García al Comité de Bioseguridad en Experimentación.</p>	
<p>Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día doce de junio de dos mil veintitrés<sup>1</sup>, por unanimidad, se emite <b>INFORME FAVORABLE</b>, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.</p>	
<p>Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno de la Presidenta de la Comisión.</p>	
<p>Vº Bº <b>LA PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA</b></p>	
<p>Fdo.: María Senena Corbalán García</p>	
<p>ID: 560/2023</p>	
<p><sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación</p>	
	<p>Código seguro de verificación: RUxPMkkI-W+e2XzDK-EeCfoPLG-+aoplq9r</p>
<p>COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1</p>	
<p>Nota: es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <a href="https://sede.um.es/validador/">https://sede.um.es/validador/</a></p>	

## ANEXO III

### HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Investigación

CEI Comisión de  
Ética de  
Investigación

euni  
well European  
University for  
Well-Being

CAMPUS MARE NOSTRUM

## ANEXO I

### HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES MAYORES DE EDAD

Hoja informativa de la tesis doctoral titulada "Evaluación de la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries"

Estimado Sr./Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio tesis doctoral sobre la citotoxicidad de cuatro materiales de remoción de caries sobre células de pulpa dental de diente permanente. Para que pueda valorar la pertinencia o interés de dicha participación, le facilitamos toda una serie de información detallada al respecto.

El propósito es que tras su lectura –y en el caso de estar conforme con su participación–, pueda darnos su consentimiento –con su firma– en el otro documento que –junto a este– se le hace entrega (denominado *Declaración de consentimiento informado*).

La presente *hoja de información* podrá usted conservarla (para participar, solo deberá devolver –con su firma– la *Declaración de consentimiento informado*).

Como responsable del equipo investigador que llevará a cabo este estudio, confío en que resulte de su interés y pueda –finalmente– contar con su consentimiento a esta participación.

En cualquier caso, reciba anticipadamente mi agradecimiento por su dedicación a la lectura de esta información.

#### TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

"Evaluación de la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries"

#### PROMOTOR O FINANCIADOR DE LA TESIS DOCTORAL

#### LUGAR DONDE SE PROCESARÁ LA MUESTRA O TOMA DE DATOS

#### OBJETIVOS Y FINALIDAD

DETERMINAR QUÉ MATERIAL DE REMOCIÓN QUÍMICA DE CARIES ES EL MENOS TÓXICO PARA LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL

Se trata de un proyecto que cuenta con el informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

#### DATOS DEL INVESTIGADOR

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en el presente estudio TESIS DOCTORAL, puede dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

- **Nombre:** Nuria
- **Cargo:** Doctoranda Pérez Guzmán
- **Dirección de contacto:** Gerodontología y Pacientes Especiales, Hospital Morales Meseguer, Universidad de Murcia
- **Correo electrónico:** nuria.perez5@um.es
- **Teléfono de contacto:** 868888575

En el caso de Tesis Doctoral, Trabajo Fin de Máster o Trabajo Fin de Grado, los datos del **director/directora** son los siguientes:

- **Nombre:** María Pilar Pecci Lloret
- **Cargo:** Profesora Asociada
- **Dirección de contacto:** Gerodontología y Pacientes Especiales, Hospital Morales Meseguer, Universidad de Murcia
- **Correo electrónico:** mariapilar.pecci@um.es
- **Teléfono de contacto:** 868888575

#### DATOS REFERENTES AL PARTICIPANTE

- **Motivos de su participación**
  - Se le ha convocado a participar en este estudio porque **cumple los requisitos para participar**. Sus opiniones resultarán esenciales para esta investigación.
- **Naturaleza voluntaria de la participación**
  - La participación en esta actividad es libre y totalmente voluntaria.
  - En cualquier momento puede negarse a seguir participando del estudio sin que deba dar razones para ello, ni recibir ningún tipo de sanción (y en tal caso, todos los datos facilitados podrán ser borrados si así lo solicita).
- **Requerimientos de la participación**
  - Si usted da su consentimiento para participar en este estudio, debe saber que su participación consistirá en **donar sus dientes extraídos por el profesional sanitario que lo atienda**.
- **Duración del estudio**
  - El estudio tendrá una duración total de un año.
  - No existe la posibilidad de que los datos que nos facilite puedan ser utilizados (en el futuro) en nuevos estudios.
- **Tipo de participación del sujeto**
  - El tiempo contemplado para prestar su participación es de **duración mínima, únicamente donar su diente**.
  - Los datos obtenidos tendrán carácter confidencial, asegurándose el anonimato.

1

- Estos datos serán codificados con un número asignado a cada participante, y su correspondencia solo estará a disposición del investigador principal del proyecto a los efectos de poder establecer correlaciones, manteniéndose este aspecto de forma completamente confidencial.
- Los datos recogidos **no serán cedidos a terceros**. Los datos estarán a cargo del investigador principal para el posterior desarrollo de informes parciales y finales (de modo anonimizado en cuanto a participantes), así como para divulgación científica en revistas y publicaciones.
- Finalizado el proceso de investigación, los participantes podrán recibir un informe con los resultados globales (igualmente sin posibilidad alguna de identificar a los participantes).
- **Beneficios para los participantes**
  - Los beneficios (directos o indirectos) que recibirá a través de su participación, se traducen en los siguientes aspectos: **no presenta beneficios**
  - No se contempla ningún otro tipo de beneficios.
- **Contraprestaciones para los participantes**
  - Las contraprestaciones previstas para los participantes, son las siguientes: **no presenta**.
  - Los participantes **no contarán con un seguro** vinculado a dicha participación.
  - En el caso de que el equipo investigador transformase los hallazgos de esta investigación en resultados de interés comercial, con la participación en la investigación el informante clave expresa su conformidad en la renuncia –como participante– a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con la muestra cuya información cede para investigación.

**RIESGOS E INCONVENIENTES PARA EL PARTICIPANTE**

- No presentan

**DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES**

- Los participantes tienen derecho a la plena revocación del consentimiento y sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción o de la anonimización de la muestra y de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo.
- Para ejercer ese derecho de revocación del consentimiento, para atender cualquier efecto adverso derivado de la participación, para responder cualquier pregunta que los participantes deseen formular durante el proceso de investigación, o para resolver cualquier duda, los participantes deben contactar con María Pilar Pecci Lloret formulando su solicitud por correo electrónico ([mariapilar.pecci@um.es](mailto:mariapilar.pecci@um.es)). En un plazo no superior a **7 días** recibirán su respuesta y –en su caso– la confirmación de revocación del consentimiento.
- Los participantes tienen derecho a revocar el consentimiento en cualquier momento, sin que eso les afecte de ningún modo (personal, profesional o socialmente).
- En el caso de que los datos facilitados por los participantes de este estudio volviesen a ser utilizados en estudios posteriores (para el avance del conocimiento científico en este campo), no volvería a pedirse el consentimiento informado a tales participantes.
- Queda garantizada la confidencialidad de la información obtenida. A pesar de que este estudio no recogerá datos de carácter personal, todos los datos de los informantes clave que otorguen su consentimiento a participar de este estudio serán registrados y almacenados en un fichero con base a lo establecido por la legislación vigente en materia de protección de datos y en garantía de confidencialidad. Para ejercer el derecho de acceso, rectificación, cancelación u oposición, los participantes podrán contactar en la dirección [protecciondedatos@um.es](mailto:protecciondedatos@um.es) (propiedad de la Universidad de Murcia).

Tras toda esta información, se le **solicita** que firme y entregue la hoja de **declaración de consentimiento informado** que se adjunta para poder validar su participación en este estudio. Muchísimas gracias por su valiosa contribución.

Firmado por PEREZ GUZMAN  
NURIA - 48696970J el día  
20/03/2023 con un

Fdo. D./Dña. \_\_\_\_\_  
(Firma del investigador/estudiante responsable)

## ANEXO IV

### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Investigación

CEI Comisión de  
Ética de  
Investigación

euni  
well European  
University for  
Well-Being

CMM  
CAMPUS MARE NOSTRUM

## ANEXO II

### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MAYORES DE EDAD

D./Dña. \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad manifiesto que:

- He sido informado sobre los beneficios que podría suponer mi participación para cubrir los objetivos de la tesis doctoral titulada "Evaluación de la citotoxicidad de diferentes materiales de remoción química de caries", y cualquier investigación derivada del mismo, dirigido por la Dra. Maria Pilar Pecci Lloret de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia (contactable en el teléfono 86888575 y correo mariapilar.pecci@um.es)
- Me han informado que la finalidad general de la tesis doctoral es determinar qué material de remoción química de caries es el menos tóxico para las células de pulpa dental.
- He sido informado de que se trata de una tesis doctoral que cuenta con el visto bueno del Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia y que está financiado por el Instituto de Salud Carlos III.
- Una vez que he leído la hoja de información al participante que me ha sido entregada, afirmo haber comprendido los posibles efectos indeseables que podría comportar –en mi bienestar– la participación en este proyecto.
- He sido informado de que mis datos serán sometidos a tratamiento en virtud de mi consentimiento con fines de investigación científica y desde la Universidad de Murcia. El plazo de conservación de los datos será de 12 meses (mínimo indispensable para asegurar la realización del estudio o proyecto). No obstante, y con objeto de garantizar condiciones óptimas de privacidad, mis datos identificativos serán sometidos a anonimización total o parcial cuando el procedimiento del estudio así lo permita. En todo caso, la información identificativa que se pudiese recabar será eliminada cuando no sea necesaria.
- También he sido informado de que para cualquier consulta relativa al tratamiento de mis datos personales en este estudio o para solicitar el acceso, rectificación, supresión, limitación u oposición al tratamiento, podré dirigirme a la dirección [protecciondedatos@um.es](mailto:protecciondedatos@um.es).
- He sido informado de mi derecho a presentar una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos.
- He sido informado de que puedo revocar mi consentimiento y abandonar en cualquier momento la participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello suponga perjuicio alguno (en tal caso, todos los datos cedidos podrían ser borrados si así lo expreso).
- Me ha sido entregada una hoja de información al participante, así como una copia de la declaración de consentimiento informado (que también he firmado).
- Me han explicado las características y el objetivo del estudio, sus riesgos y beneficios potenciales.

Y en virtud de todas las manifestaciones anteriores, confirmo que otorgo mi consentimiento a que esta recogida de datos tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en la tesis doctoral.

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Fdo. D./Dña. \_\_\_\_\_  
(Participante)

Firmado por PEREZ GUZMAN  
NURIA - 48696970J el día  
20/03/2023 con un  
certificado emitido por AC

Fdo. D./Dña. FNMT Usuarios  
(Firma del investigador/estudiante responsable que devuelve firmada la hoja de consentimiento informado)

**ANEXO V**  
**PÓSTER VIII JORNADAS DOCTORALES**



NURIA PEREZ GUZMAN  
Universidad de Murcia  
Av. de los Dolores nº30 2ª escalera 2ºD  
300011 MURCIA  
España

Escuela Internacional de Doctorado (EIDUM)  
Universidad de Murcia  
Edificio Rector Soler, sótano  
Campus de Espinardo  
30100 Murcia (España)

Murcia, 07/07/2023

**Certificado de Asistencia**

*A Quien Corresponda*

Confirmamos que **NURIA PEREZ GUZMAN** asistió a las VIII Jornadas Doctorales EIDUM-EINDOC-CMN 2023, celebradas del 26 - 28 de junio de 2023 en la Universidad de Murcia (España), con una duración de 32 horas.

NURIA PEREZ GUZMAN es autor/coautor de la(s) siguiente(s) contribución(es):

Evaluación de la Biocompatibilidad de Cuatro Materiales de Remoción Química de Caries.

**Autor(es):** Pérez Guzmán, Nuria; Lopez García, Sergio; Pecci Lloret, Mª Pilar; Rodríguez Lozano, Francisco Javier

**Grupo de trabajo/Tipo de contribución:** POSTERS

Reciba un cordial saludo,

Mª Pilar Martínez García  
(Secretaria Académica de EIDUM)



**XVI CONGRESO NACIONAL III INTERNACIONAL SEOENE**  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ODONTOLÓGIA Y ESTOMATOLOGÍA EN PACIENTES CON NECESIDADES ESPECIALES

Murcia 27/28 octubre 2023

**Certificado de Comunicación tipo Póster**

OTORGADO A:

Pérez Guzmán Nuria, Pecci Lloret Miguel, Mora Martínez Alejandro, Pecci Lloret Mª Pilar, Guerrero Gironés Julia, López García Sergio.

*"Citotoxicidad y Biocompatibilidad de Cuatro Materiales de Remoción Química de Caries Aplicados en Pacientes Especiales"*

Fdo.: Presidente SEOENE  
Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano