



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA**

**Estudio de Biocompatibilidad Celular de Distintos
Materiales Utilizados en los
Recubrimientos Pulpares**

**D. Diego Saura Miñano
2014**

Agradecimientos a mis directores de tesis Dra. Olga Cortés Lillo y Dr. Carlos
García Ballesta, que no pudo verla concluida, descansa en paz.
Gracias también Dra. Antonia Bernabéu Esclápez y todo su equipo en el SACE,
y Dr. Antonio López Maurandi, por el apoyo estadístico.

Dedicado a mis padres y hermano, por su paciencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Histofisiología de la pulpa	3
1.1. Funciones de la pulpa	5
1.2. Respuesta dentinogénica ante una lesión	6
1.2.1. Respuesta pulpar ante la caries	7
1.2.2. Respuesta pulpar ante procedimientos de operatoria	9
1.3. Fisiopatología pulpar	9
2. Tratamiento pulpar en odontopediatría	13
2.1. Diagnóstico	14
2.1.1. Particularidades anatómicas en dentición primaria	15
2.1.2. Historia médica	16
2.1.3. Historia dental	17
2.1.4. Examen clínico	17
2.1.5. Examen radiográfico	19
2.1.6. Exploración pulpar directa	21
2.1.7. Proximidad del diente definitivo	21
2.2. Tratamientos pulpares en dentición temporal	22
2.2.1. Tratamientos pulpares vitales	22
2.2.2. Tratamientos pulpares no vitales	27
2.3. Tratamientos pulpares en dentición permanente inmadura	28
2.3.1. Apexogénesis	30
2.3.2. Apexificación	31
3. Protección pulpar indirecta en dentición temporal	33
3.1. Indicaciones	37
3.2. Diagnóstico intraoperatorio	38
3.2.1. Métodos diagnósticos alternativos	39
3.3. Procedimiento	43
3.4. Resultados: respuesta clínica y radiográfica	44
3.5. Factores de éxito	48
3.6. Materiales	50
3.6.1. Ionómero de vidrio	53

3.6.2. Hidróxido de calcio	63
3.6.3. Hidroxiapatita	68
4. Biocompatibilidad	69
4.1. Modelos de ensayo	71
4.2. El cultivo celular	75
4.3. Test de contacto	77
4.4. Pruebas post-tóxico	78
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
5. Hipótesis	83
6. Objetivos	84
MATERIAL Y MÉTODO	
7. Material	87
8. Método	89
8.1. Ensayos previos	92
8.2. Ensayo experimental	96
8.3. Método estadístico	101
RESULTADOS	
9. Resultados, análisis estadístico y morfológico	105
9.1. Viabilidad celular interpretada	105
9.2. Dosis Letal 50	107
9.3. Influencia del Ph	108
9.4. Análisis morfológico	109
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO	175

INTRODUCCIÓN

La pérdida prematura de dientes en el niño conlleva problemas funcionales, de maloclusión, estéticos y fonéticos, los cuales podrán ser transitorios o permanentes.

Por eso, uno de los principales objetivos de la Odontopediatría es la preservación de los dientes temporales hasta su exfoliación fisiológica, que permitirá la correcta nutrición y alimentación del niño y actuarán como guía eruptiva de los dientes definitivos, previniendo así otros problemas (Pinkham y Berg. 2005).

En aquellos casos de dientes temporales afectados por caries, traumatismos u otras causas, lo deseable es poder mantener la vitalidad pulpar, aunque si no es posible, cabría la opción de eliminar la pulpa parcial o totalmente para preservar la función del diente (Cortés y Boj. 2011).

Los avances en investigación biomédica han permitido una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que intervienen durante la reparación y regeneración del complejo dentino-pulpar (Tziafas. 2004), de manera que actualmente podemos dar una mayor validez biológica a determinados procedimientos que suceden en la pulpa tras un tratamiento pulpar vital. Así, la protección pulpar indirecta, contrariamente a lo que se creía en el pasado, puede ser un tratamiento aceptable para dientes temporales (Fuks. 2008).

La protección pulpar indirecta, al igual que la pulpotomía, está indicada en casos de pulpitis reversible por caries profundas, sin signos clínicos ni radiográficos de inflamación irreversible, dolor o infección. La diferencia entre ambos procedimientos sucede cuando la

eliminación de caries resulta en una exposición pulpar, que nos llevará a hacer la pulpotomía. En cambio, con la protección pulpar indirecta evitamos la exposición pulpar dejando la capa más profunda de dentina hipomineralizada, considerando mediante criterios clínicos y radiográficos, que la pulpa tiene la posibilidad de curar.

Para que podamos realizar estos procedimientos utilizamos diversos materiales, como son los compuestos de ionómero de vidrio, el hidróxido de calcio, o la hidroxiapatita. Estos materiales cumplen con los requisitos clínicos necesarios para poder ser ubicados en el fondo de la cavidad y estimular la curación pulpar y la formación de un puente dentinario entre la restauración definitiva y la pulpa (Falster et al. 2002).

Pero deben además cumplir una condición de biocompatibilidad, para que no se interpongan ante los mecanismos naturales implicados en la curación. Para valorar la posible toxicidad disponemos de numerosos test directos e indirectos, que se realizan sobre dientes de animales vivos y sobre cultivos celulares.

A su vez, los ensayos sobre cultivos celulares podrán realizarse con cultivos primarios, que resultan del cultivo directo de células de un individuo, o con líneas celulares estandarizadas, que son células procedentes de animal o humano, tratadas para que se reproduzcan rápidamente y sobrevivan durante todo el tiempo que sea necesario para el estudio (Cortés et al. 2006).

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar y comparar varios materiales de uso clínico que podrían utilizarse en protección pulpar indirecta en dentición temporal, mediante un ensayo de biocompatibilidad, así como analizar los cambios morfológicos que dichos materiales causan sobre las células, y de este modo, atendiendo a su propiedad de biocompatibilidad, determinar cuál podría ser el más indicado.

1. HISTOFISIOLOGÍA DE LA PULPA

La pulpa es la materia orgánica del diente, responsable de toda la actividad metabólica y no se presenta como un tejido independiente, sino que forma parte del complejo dentinopulpar. Su origen embriológico está en la papila dental, que es un tejido ectomesenquimático derivado de la cresta neural. Las células de la papila se diferencian en odontoblastos, que son los encargados de formar la dentina, y ocurre una inducción recíproca con el órgano del esmalte para comenzar la fase secretora por parte de los ameloblastos (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz. 2001).

La pulpa tiene la particularidad de ser el único tejido blando del diente, aunque se encuentra contenida en una cavidad dura en el interior de la dentina (Zhang y Yelick. 2010). Ambos tejidos se interrelacionan a través de una prolongación de los odontoblastos llamada proceso odontoblástico, que se halla embutido en unos conductos propios de la dentina, los túbulos dentinarios, cuyo grosor es de unos 0,3 μm en la unión amelodentinaria, hasta 4 μm en las proximidades de la pulpa.

Los túbulos dentinarios, además de los procesos odontoblásticos, contienen fibras de colágeno y fluido dentinario rico en sodio y pobre en potasio. Este fluido es básico en la transmisión de estímulos desde la dentina a la pulpa pues, según la teoría hidrodinámica de Brännström, estimula las fibras A Delta provocando un dolor localizado, brusco y breve (Brännström. 1986).

La pulpa es un tejido conjuntivo de tipo laxo y como tal contiene células, fibras y sustancia fundamental distribuidas por zonas. La capa más periférica es la de los odontoblastos, que son unas células específicas del tejido pulpar que secretan y mineralizan la dentina a lo largo de toda la vida del diente a modo de protección. Se encuentran a nivel coronario con una densidad de unas 45.000 células/ mm^2 y disminuyen a nivel radicular (Caballín et al. 2010).

El tamaño de los odontoblastos y el contenido de sus organelas citoplasmáticas varía a lo largo del ciclo de vida celular y está estrechamente relacionado con su actividad funcional. La relación entre el tamaño y la actividad secretora se puede observar en la diferencia de tamaño entre los odontoblastos de la raíz y los de la corona, que expresan diferentes tasas de actividad dentinogénica en dichas áreas (Smith. 2002).

Existen tres tipos de uniones intercelulares mediadas por la fibronectina (impermeables, adherentes y comunicantes) que permiten que los odontoblastos se comuniquen entre sí y con las otras células pulpares. Así una agresión a los odontoblastos puede originar una reacción pulpar.

Inmediatamente debajo de la capa odontoblástica se encuentra la zona oligocelular de Weil, que aporta abundante irrigación mediante el plexo capilar subodontoblástico, e inervación con el plexo nervioso de Raschkow. A continuación hay una zona rica en células, en la cual encontramos:

- Fibroblastos: son las células más numerosas del tejido pulpar, secretan la sustancia fundamental y los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas.
- Macrófagos del sistema fagocítico mononuclear.
- Células dendríticas (inmunidad inespecífica).
- Linfocitos T y B (inmunidad específica).
- Reserva de células ectomesenquimáticas indiferenciadas con potencial para convertirse incluso en odontoblastos.

Además existe un plexo arteriovenoso y vasos linfáticos que comunican con el resto del organismo y una red de nervios autónomos y sensitivos. Todos ellos son responsables de la sensación dolorosa cuando, ante un estímulo, los nervios autónomos transmiten señales a los capilares, que se vasodilatan, recibiendo mayor cantidad de sangre y comprimen a las fibras nerviosas sensitivas.

1.1. Funciones de la pulpa

La pulpa es el tejido responsable de todas las funciones metabólicas del diente, que son:

- Formación de dentina

Es la función más importante y primera en orden cronológico. De la papila dental (origen mesodérmico) surge la capa celular especializada de odontoblastos, en íntimo contacto con la cara interna del órgano del esmalte (ectodérmico), que interactúan para comenzar la formación de la dentina. Es un proceso rápido hasta que forma completamente la raíz y corona, y a partir de ahí se ralentiza mucho, aunque no se detiene completamente (Nitzan et al. 1986).

- Función nutritiva

A través del fluido tisular, los nutrientes y el oxígeno se intercambian desde los capilares hacia el líquido intersticial y alcanzan la dentina a través de los túbulos que contienen las prolongaciones odontoblásticas, siendo mayor la circulación en la periferia (plexo vascular subodontoblástico), que en el centro de la pulpa (Trowbridge et al. 2008). Esta circulación también es determinante para atraer el infiltrado inflamatorio ante estímulos lesivos y cuando el diente se ha recuperado abren camino para disminuir la inflamación. También encontramos vasos linfáticos que se unen a los del ligamento periodontal y drenan a los ganglios linfáticos regionales (Bishop y Malhotra. 1990).

- Función neurológica o sensitiva

La inervación pulpar está integrada por las fibras A Delta y las fibras C amielínicas, y cumple con dos funciones: control vasomotor mediado por el sistema simpático y defensa por el mecanismo del dolor. Las fibras A Delta reciben información de la unión dentinopulpar y de la dentina profunda, son responsables de la sensibilidad dentinaria, tienen bajo umbral de estimulación y rápida conducción, produciendo un dolor brusco y breve.

Sin embargo, el campo receptor de las fibras C amielínicas está localizado en toda la pulpa. Responden a mediadores inflamatorios por lesiones nocivas al tejido pulpar y por

aplicación prolongada de calor, son de lenta conducción y de alto umbral de excitación, siendo responsables del dolor espontáneo, intenso, constante y difícil de localizar. Se ha demostrado cierta superposición entre ambos tipos de fibras (Ikeda et al. 1997).

- **Función defensiva**

Las respuestas del odontoblasto a las agresiones externas son el dolor, la esclerosis dentinaria y la dentina reparativa, y están destinadas a disminuir la permeabilidad de la dentina y actuar de barrera ante dichas agresiones (Brännström. 1984). A su vez en la pulpa se origina un infiltrado crónico con vasodilatación mediado por linfocitos, plasmocitos y macrófagos, y si el estímulo lesivo es leve la inflamación será reversible y curará por sí sola (Trowbridge. 1981).

1.2. Respuesta dentinogénica ante una lesión

El complejo dentino-pulpar es un organismo vivo, los odontoblastos se comunican entre sí por uniones intercelulares mediadas por fibronectina, y son capaces de originar una reacción pulpar frente a un estímulo externo, según sea su naturaleza e intensidad, obteniendo como resultado la formación de dentina terciaria, que según su calidad podrá ser reactiva o reparativa.

Una lesión leve produce un aumento en la permeabilidad de los túbulos dentinarios cortados. Si actúa durante un periodo corto de tiempo la pulpa se recuperará adecuadamente, los odontoblastos sobreviven y son estimulados a formar dentina, y puesto que son estos mismos odontoblastos los responsables de la secreción, hay continuidad de los tubulillos de dentina nueva, con la existente previamente (Mjor et al. 1991). Esta es la dentina terciaria reactiva, y se considera una extensión de la dentina fisiológica, aumentando la distancia entre la lesión y la pulpa y disminuyendo la permeabilidad de la dentina, volviéndola esclerótica (Tziafas et al. 2000), pero que debe distinguirse de la dentina primaria y la secundaria.

Cuando una lesión es más grave puede llegar a provocar la vacuolización del núcleo

odontoblástico y la atrofia de la capa odontoblástica. (Zhang y Yelick. 2010). Si se dan las condiciones ideales, las células pulpares pueden diferenciarse en pseudo-odontoblastos y segregar una matriz de dentina terciaria reparativa (Fitzgerald et al. 1990), mientras que el contenido intratubular se calcifica sirviendo de método de defensa ante posteriores ataques. Puesto que la dentina se forma por células distintas a los odontoblastos que secretaron originalmente la dentina, habrá discontinuidad en los tubulillos dentinarios y una consiguiente pérdida de permeabilidad (Byers y Narchi. 1999).

La aparición de los pseudo-odontoblastos implica la migración y diferenciación de células indiferenciadas, mediado por el típico proceso de curación con aumento de la vascularización y quimiotaxis, para lo cual la pulpa debe estar en un estado saludable, sin inflamación previa (Nakashima et al. 1994).

Durante el desarrollo dental, los odontoblastos secretan factores de crecimiento, principalmente los TGF- β , permaneciendo algunos de ellos secuestrados en la matriz dentinaria, para posteriormente ser liberados en cualquier circunstancia que implique destrucción de dentina (Tziafas et al. 2000). Aunque aún se desconoce mucho sobre su mecanismo de acción, se ha demostrado que la familia de factores de crecimiento transformante (TGF- β) tiene efecto sobre las células mesenquimales del tejido conectivo, provocando la diferenciación de los progenitores en odontoblastos y la estimulación de la formación de una matriz dentinaria (Roberts-Clark y Smith. 2000), y también podría ser el desencadenante de la acción secretora de los neo-odontoblastos (Messagne. 1990).

Por último, si la agresión se prolonga en el tiempo los efectos se extienden a la zona subodontoblástica y a toda la pulpa. Cuando aumenta más la intensidad, la pulpa subyacente a la cavidad presentará infiltraciones celulares, cambios en la sustancia celular, trombosis, hemorragia, y finalmente necrosis.

1.2.1. Respuesta pulpar ante la caries

La agresión más común que sufren los dientes es la caries. Cuando la caries progresa lentamente hacia la dentina, se forma dentina esclerótica por depósito de minerales dentro

y entre los túbulos dentinarios. Esta es la dentina terciaria (Scott y Weber. 1977).

Como hemos visto anteriormente, la calidad de la dentina terciaria depende de la profundidad y progresión de la lesión cariosa, cuanto más rápida sea la lesión, tendremos una dentina más irregular y porosa, y si es demasiado rápida los procesos odontoblásticos degeneran y se forman los llamados "tractos muertos" (Fuks. 2005).

Cuando la caries progresa más rápidamente que la secreción de dentina terciaria, los vasos sanguíneos se dilatan, y se hacen evidentes algunas células inflamatorias aisladas en las proximidades de la lesión, es el estado transicional. Si no se trata la caries puede aparecer una exposición pulpar, ante la cual habrá una reacción con infiltrado de células inflamatorias y la pulpitis se volverá aguda, llegando a formar un pequeño absceso en la zona de la lesión. El remanente pulpar puede permanecer sin inflamación (pulpitis parcial crónica con exacerbación aguda), aunque conforme progresa la exposición se puede transformar en necrosis parcial y posteriormente total (Camp. 2008).

Un factor determinante es el drenaje en los casos de necrosis parcial o total. Si la pulpa está abierta y puede drenar, favorece que el tejido apical permanezca sin inflamación, o con pulpitis crónica. Si se impide el drenaje por comida impactada o una restauración, toda la pulpa se puede volver necrótica rápidamente y aparecer bruscamente los síntomas.

Se ha estudiado la relación entre profundidad de la caries y cambios histopatológicos para dientes permanentes:

- Mientras la caries estuviera a 1,1mm de la pulpa, no habría cambios significativos, y mantendría una muy buena capacidad reparativa.
- En cambio, cuando está a 0,5mm y se ha formado dentina reparativa, sí que aparecen los primeros cambios histopatológicos (Reeves y Stanley. 1996).
- Shovelton mostró que cuando la caries se aproxima entre 0,3 y 0,25 mm hasta la pulpa ya aparecen hiperemia y pulpitis. (Shovelton. 1968).
- En caso de existir exposición pulpar el diente tiene una baja probabilidad de ser totalmente vital (Eidelman et al. 1992).

1.2.2. Respuesta pulpar ante procedimientos de operatoria

En tratamientos restauradores del diente, se produce una respuesta pulpar a causa del corte sobre los túbulos de dentina, por calor y por desecación. Al igual que ocurre cuando la lesión es por caries, se forma dentina esclerótica mediante mineralización inter e intratubular, y se forma dentina terciaria. La formación de la dentina depende de la profundidad de la preparación cavitaria, siendo más irregular cuanto más próxima está a la pulpa. Como hemos comentado previamente, a partir de 0,5mm la calidad de la dentina queda seriamente comprometida (Reeves y Stanley. 1966), y especialmente a partir de 0,3-0,25 mm, situación en la que la pulpa mostrará hiperemia y pulpitis (Shovelton. 1968).

Una técnica cuidadosa en la que se utiliza una refrigeración adecuada y el uso de fresas nuevas para no ejercer mucha presión favorecen una respuesta leve, con alteraciones menores en los procesos odontoblásticos y de curación. Si se deseca mucho con la jeringa de aire, o se aumenta mucho la temperatura, tendremos una respuesta mayor de la dentina, llegando incluso a sufrir cambios pulpares irreversibles y necrosis (Fuks. 2000).

Es necesario conocer y evaluar los cambios biológicos que se dan en el diente, para optimizar el tratamiento, y para usar, promover o aumentar los procesos regenerativos naturales. Para favorecer la curación se debe evitar el trauma operatorio, así como las lesiones causadas por el uso de materiales o procedimientos incongruentes con la actividad regenerativa natural del diente (Murray et al. 2002).

1.3. Fisiopatología pulpar

Como hemos comentado, existen agentes externos que pueden irritar y dañar al complejo dentino-pulpar, el cual reacciona ante estos diferentes estímulos. En base a esto podemos diferenciar tres condiciones fisiopatológicas en el borde dentino-pulpar:

1. En caso de lesiones leves, como en caries dentinal de lenta progresión, los

odontoblastos no se ven dañados y son estimulados para formar una barrera de dentina terciaria reactiva por debajo de la lesión. Es una dentina bastante similar a la primaria y secundaria y supone una valiosa barrera para defenderse del estímulo (Smith et al. 2002).

2. Ante lesiones mayores por caries en dentina, de rápida progresión y sin exposición pulpar, o si esta exposición se produce por la preparación cavitaria, se destruyen los odontoblastos subyacentes a la dentina afectada (Bjørndal y Mjor. 2001). Entonces se diferencia una nueva generación de “pseudo-odontoblastos” a partir de los fibroblastos pulpares, que secretan dentina terciaria reparativa (Baume et al. 1980).
3. En caso de exposición pulpar, siempre que no se haya infectado, se puede estimular a la pulpa para que cure, sola o mediante el uso de materiales de recubrimiento (Nyborg. 1955). Si la exposición es por caries, la pulpa va a tener una capacidad de reacción muy escasa a causa de la presencia de bacterias (Bergenholtz. 2001). Como parte del proceso curativo, las células pulpares indiferenciadas proliferan, migran y se diferencian a células formadoras de dentina, restituyendo la solución de continuidad en el borde de la lesión (Fitzgerald et al. 1990; Mjor et al. 1991).

Así pues, en base al grado de afectación pulpar podemos distinguir los siguientes estadios de patología pulpar:

Pulpitis reversible

Se caracteriza por hiperemia y vasodilatación causadas por una respuesta pulpar, que será reversible si eliminamos el agente causante (Shovelton. 1968). Presentará dolor sólo provocado y de corta duración, que se explica porque el agente agresor no genera un estímulo doloroso espontáneo, pero sí disminuye el umbral de las fibras A Delta, dejando la dentina hipersensible.

Pulpitis irreversible

Es el resultado de los cambios vasculares y celulares producidos como respuesta a la agresión al tejido pulpar. Aumenta la presión intrapulpar por aumentar el caudal de sangre que trae consigo las proteínas del exudado inflamatorio y células del sistema de defensa (Lin y Langeland. 1981). Los linfocitos emigran a la lesión por diapédesis y al realizar la fagocitosis liberan metabolitos y proteasas tóxicas que provocan daño tisular. Además aumenta el CO₂ y disminuye el pH, lo cual genera zonas de necrosis que actúan como nuevos centros de inflamación. Alrededor de esta zona aparece una fase proliferativa que genera fibroblastos y tiene función reparativa. Todo esto se traduce en una sintomatología muy dolorosa.

Cambios regresivos pulpares

Son los cambios producidos por irritantes leves pero de larga duración, como bruxismo, enfermedad periodontal o repeticiones de operatoria dental. No pueden ser considerados inflamatorios sino regresivos o degenerativos. Consiste en la deshidratación de la sustancia fundamental y disminución en número y tamaño de las células, que serán sustituidas por fibras colágenas maduras (fibrosis). Las células pierden el aporte sanguíneo con lo cual pierden oxígeno y nutrientes y no se pueden defender.

No siempre es correlativo a la edad del paciente pues el trauma crónico disminuye el tamaño de la cámara pulpar a costa de generar dentina secundaria y terciaria. Puede mostrarse con dos cuadros:

- Atrofia y fibrosis con un tejido pulpar poco sensible (Bernick y Nedelman. 1975).
- Degeneración cálcica o calcificaciones sin que el paciente note molestia (Scott y Weber. 1977).

Reabsorción dentinaria interna

Es la destrucción de las paredes dentinarias por los odontoclastos, y se puede encontrar tanto en la cámara pulpar como en los conductos. Su etiología es controvertida, se

relaciona con la inflamación pulpar crónica que puede estar causada entre otros por caries, por tratamientos pulpares o por movimientos ortodóncicos. Los odontoclastos reabsorben primero la predentina dejando unos huecos llamados lagunas de Howship, pudiendo alcanzar el cemento. Normalmente no son dolorosas y el hallazgo es casual, o porque el paciente acude a la consulta al observarse un cambio de color en el diente. El tratamiento es la pulpectomía, que deberá ser lo más precoz posible para aumentar la viabilidad del diente (Trope et al. 2008).

Reabsorción dentinaria externa

Al contrario que la interna, esta es centrípeta. El tejido periodontal sustituye al cemento y la dentina provocando la muerte pulpar. La pulpectomía no garantizará la curación en todos los casos pero deberá ser practicada (Hammarstrom y Lindskog. 1985).

Necrosis

Si no tratamos adecuadamente las patologías anteriores, evolucionan hacia la necrosis y descomposición pulpar. Presentará destrucción del sistema microvascular y linfático, de células y del sistema nervioso, que resisten más que el resto de tejidos. Los mecanismos de defensa cesan, lo cual permite la libre proliferación de microorganismos.

Puede cursar con:

- Absceso pulpar: La movilización de neutrófilos desde los vasos sanguíneos, que liberan enzimas lisosómicas, provoca la licuefacción y aparece supuración. Esta reacción aumenta mucho la presión dentro de la pulpa y hace que sea muy doloroso.
- Pulpitis ulcerosa crónica: Se establece un drenaje a través de la dentina descompuesta, que disminuye mucho la presión intracameral, suponiendo un alivio en el dolor para el paciente. Se puede crear un espacio entre la zona de supuración y la cámara pulpar, lo cual da un aspecto de úlcera a la lesión.
- Pulpitis hiperplásica: Aparece en casos de pulpitis crónica, y es casi exclusiva de dientes temporales y dientes definitivos inmaduros. Al poseer estos una mayor apertura apical, prolifera un tejido inflamatorio crónico a través del drenaje

abierto en la dentina, dando lugar a un “pólipo pulpar” (Kim et al. 2008).

La pulpa inflamada, no contaminada, puede tener potencial reparativo. Diferenciar entre pulpa necrótica y pulpa vital es relativamente sencillo, pero entre pulpitis reversible e irreversible ya se vuelve más complejo. Lo que sí sabemos es que cuanto más joven sea la pulpa, tendrá mayor potencial regenerativo (Tjäderhane. 2002).

En cambio, los casos de pulpa expuesta presentan cierta controversia, y el éxito depende en buena parte del estado inflamatorio de la pulpa en el momento del tratamiento y de su capacidad regenerativa. Por otra parte, es muy difícil determinar hasta qué profundidad y cómo de afectada está la pulpa, y es posible equivocarse y realizar un recubrimiento pulpar sobre un tejido inflamado que se está volviendo necrótico, lo que conducirá al fracaso en el tratamiento (Trope. 2008).

2. TRATAMIENTO PULPAR EN ODONTOPEDIATRÍA

Clásicamente, los tratamientos pulpares en odontopediatría incluyen a los de dentición temporal y a los de dientes permanentes inmaduros. El objetivo de estos tratamientos en dentición temporal es conservar la vitalidad y evitar la exfoliación prematura, pues la pérdida prematura de dientes puede conllevar problemas de maloclusión, funcionales, estéticos y fonéticos, los cuales podrán ser transitorios o permanentes (Fuks. 2005). La restauración y conservación de los dientes temporales permitirá la correcta nutrición y alimentación del niño y actuarán como guía eruptiva de los dientes definitivos, previniendo así otros problemas.

El grosor de esmalte y dentina en dentición primaria es aproximadamente la mitad respecto a la dentición permanente. Encontramos el cuerno pulpar mesial del primer molar maxilar primario a 1,8 mm de profundidad, y en el primer molar mandibular primario a 1,6 mm, estando así la pulpa mucho más próxima a la superficie externa y siendo más vulnerable a cualquier agresión.

Además, la respuesta inflamatoria es mayor en dentición temporal por ser mayor la permeabilidad de los túbulos dentinarios. Los dientes temporales presentan raíces proporcionalmente más largas, delgadas y curvas, con conductos acintados y con muchas ramificaciones apicales. El suelo de la cámara pulpar es delgado, y con frecuencia presenta conductos accesorios que favorecen la patología en furca (Cortés y Boj. 2011).

En dentición definitiva inmadura, debemos preservar la vitalidad hasta que se haya completado la formación radicular, debido a la importancia de la pulpa en el desarrollo anatómico y funcional del diente. En caso contrario, podría verse comprometida la maduración y viabilidad del diente.

Es importante realizar una buena historia clínica antes de comenzar el tratamiento, con examen intra y extraoral, y teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

1. Historia médica del paciente.
2. La importancia del diente a tratar respecto al resto de la cavidad oral.
3. Alternativas al tratamiento pulpar.
4. Posibilidad de restaurar el diente.

El tratamiento pulpar estará contraindicado cuando el proceso infeccioso no pueda ser eliminado, no exista soporte óseo, el diente no pueda ser restaurado por falta de soporte dentario o cuando el diente temporal esté próximo a su exfoliación, optando en estos casos por la exodoncia.

2.1. Diagnóstico

El éxito de un tratamiento comienza con un diagnóstico adecuado, sin embargo, las pruebas que en dentición definitiva son concluyentes, se vuelven engañosas en dentición temporal y en dentición permanente inmadura (Fulling y Andreasen.1976).

La mayoría de las pruebas usadas en endodoncia convencional no son igualmente fiables en dientes temporales o en dientes definitivos inmaduros, aunque se considera llevarlas a cabo para recabar toda la información posible. Además, el tratamiento que realicemos dependerá del grado de reabsorción de la raíz del diente primario, o del estadio de desarrollo radicular en el caso del diente definitivo, por lo que debemos determinar con precisión en que estado se encuentran (Boj y Cortés. 2006).

El diagnóstico en dientes primarios y dientes definitivos inmaduros varía mucho del de dientes definitivos maduros por los siguientes motivos:

- En dentición primaria, diagnóstico y tratamiento van a depender del grado de reabsorción radicular, así como en dientes definitivos inmaduros depende del grado de desarrollo radicular (Camp. 2008).
- No suele haber correlación entre la sintomatología clínica y las condiciones histopatológicas, y se admite que la información obtenida del diagnóstico acerca del grado de inflamación en estos dientes es pobre, aunque se debe realizar igualmente para recabar toda la información posible. Además, los hallazgos radiográficos no siempre se corresponden con el estado histopatológico de la pulpa, y los estados degenerativos pueden ser silentes (Bjørndal. 2008).
- Los canales radiculares en dentición primaria difieren mucho de los dientes definitivos. La anatomía interna de los canales radiculares apenas coincide con la anatomía externa de las raíces. En ocasiones se complica el tratamiento de los dientes temporales por la reabsorción radicular apical para permitir la erupción del siguiente diente, que puede cambiar significativamente el número, tamaño y forma de los canales, y los dientes se vuelven progresivamente más cortos. Además, la reabsorción de paredes internas de las raíces puede abrir los canales y comunicarlos con el tejido periapical (Hibbard e Ireland. 1957).

2.1.1. Particularidades anatómicas en dentición primaria

Los dientes anteriores primarios sólo tienen un canal, y rara vez aparecen conductos accesorios. El germen del diente definitivo aparece lingual y apicalmente respecto a los dientes primarios, y se inicia la reabsorción por la superficie lingual, lo que dificulta la

determinación de la longitud radicular y la posición del ápice. En un estudio (Kamijo. 1967) se demostraba que para que la reabsorción radicular fuese visible radiográficamente, se tenía que haber reabsorbido la mitad del grosor vestíbulo-lingual de la raíz.

Los molares primarios normalmente tienen el mismo número y posición de raíces que sus homólogos definitivos, aunque están más abiertas pues alojan entre ellas el germen de los premolares definitivos. Suelen tener un único conducto en cada raíz, aunque con frecuencia pueden aparecer islas de dentina secundaria dentro de estos y conductos laterales, así como otro tipo de comunicaciones con el tejido periapical a causa de la reabsorción radicular, pero rara vez son visibles en la radiografía (Hibbard e Ireland. 1957).

2.1.2. Historia médica

Consiste en la evaluación del estado general de salud del paciente, que puede influir en la decisión final sobre la indicación o contraindicación del tratamiento pulpar. Prestaremos especial atención a los siguientes casos:

1. En niños con cardiopatías severas, inmunodeprimidos o con un estado de salud pobre, se optará por la extracción con cobertura antibiótica, para evitar complicaciones postoperatorias.
2. En pacientes con trastornos hemorrágicos evitaremos el riesgo que conlleva una extracción quirúrgica.
3. En niños poco colaboradores, cuando el pronóstico del diente esté comprometido, las extracciones pueden estar indicadas para evitar tratamientos largos.
4. Conservaremos dientes con mal pronóstico en pacientes con agenesia, para evitar la atrofia alveolar y desalineamiento de dientes adyacentes.

(Cortés y Boj. 2011)

2.1.3. Historia dental

Se debe determinar la presencia o ausencia de dolor, el tipo de dolor sufrido por el paciente y su origen, aunque la ausencia de síntomas no significa que haya ausencia de patología. Se distinguen tres tipos de dolor:

1. Momentáneo: es aquel provocado, y que desaparece en cuanto se elimina el estímulo. Es indicativo de cambios inflamatorios menores, y síntoma de pulpitis reversible. Este dolor será estimulado por irritantes mecánicos, químicos o térmicos y muchas veces se debe a caries profundas, restauraciones defectuosas, irritación alrededor de un diente cercano a la erupción o por la propia erupción del definitivo.
2. Persistente: es un dolor provocado, pero que permanece tras eliminar el estímulo. Es indicativo de que la pulpitis es irreversible, aunque puede no haber alcanzado la totalidad de la pulpa.
3. Espontáneo: aparece sin la intervención de estímulos externos. El dolor espontáneo es un dolor constante o punzante que aparece sin estímulo, o permanece un periodo largo de tiempo tras retirar el factor causante. Guthrie demostró en un estudio histológico que el dolor espontáneo frecuentemente se asocia a cambios degenerativos que se extendían hasta los canales radiculares (Guthrie. 1965). En dientes primarios con dolor espontáneo no estaría indicado aplicar tratamientos pulpares vitales sino pulpectomía, o si están presentes más signos, la extracción.

En casos en que la caries destruya el punto de contacto el paciente puede referir dolor debido a la comida impactada en la papila dental sin que haya afectación pulpar (Fuks. 2005).

2.1.4. Examen clínico

Se requiere una exploración intra y extraoral sistemática. La exploración puede mostrar

caries extensas o restauraciones defectuosas en las que deberemos centrar nuestra atención, así como evidencias de patología pulpar irreversible, como enrojecimiento, hinchazón, y fístulas. La fluctuación en la encía es un signo precoz de absceso y destrucción de tejido óseo.

En dientes primarios, especialmente en molares, la caries invade mucho más rápidamente la pulpa, por la proximidad de ésta a la superficie.

La respuesta a la percusión podría ser valiosa, pero la reacción del paciente infantil resulta poco fiable por los aspectos psicológicos implicados. Se sugiere realizar la percusión cuidadosamente y con la punta del dedo, no con el mango del espejo, para no exponer al paciente a un estímulo innecesario, que implicará dolor y desconfianza (Fuks. 2005).

La movilidad dental también es un signo engañoso, un diente con proceso periapical puede tener movilidad por el exudado inflamatorio, pero la movilidad en dentición temporal puede ser fisiológica debido a la exfoliación, y muchos dientes con patología pulpar no tienen movilidad, por lo que no se debe tomar demasiado en cuenta.

Los tests de vitalidad pulpar con electricidad y estímulos térmicos pueden resultar poco fiables en dentición temporal y dentición permanente joven. En dientes primarios el tejido pulpar sufre una regresión al aproximarse a la exfoliación, y en dientes definitivos inmaduros, no se forma completamente el plexo de Raschkow hasta fases bastante tardías (Fulling y Andreasen. 1976). Otro inconveniente es que se obtienen falsos positivos debido a la transmisión de los estímulos al tejido gingival.

La flujometría con láser doppler podría ser de gran ayuda. Es el primer sistema para determinar el flujo sanguíneo pulpar (Holloway y Watkins. 1977). La técnica consiste en un haz de luz infrarroja que se apunta contra la superficie del diente, parte de la cual es absorbida por las células sanguíneas en movimiento y por tejidos estacionarios. Las células en movimiento dispersan la energía del fotón según el efecto doppler, en cambio, los tejidos estacionarios no.

En un estudio de Yapinset y colaboradores (2001) se correlacionaban los resultados de la flujometría con un estudio histológico de los dientes, obteniendo un éxito diagnóstico próximo al 100% en dientes no vitales, y del 75% para dientes vitales. Los autores reportaron que a la primera semana no se puede valorar aún la revascularización, pues si esta se da, queda limitada a la zona apical. Cuando el diente no está vital, se ve porque a partir de la segunda semana no hay cambios, cuando debería haberlos, y se puede así diagnosticar y tratar la necrosis de forma temprana. En cambio cuando el diente está vital, es en la cuarta semana cuando se verifica la completa revascularización de la pulpa. Para obtener los mejores resultados posibles, se aconseja realizar un aislamiento con dique de goma negro para evitar la contaminación lumínica proveniente del tejido gingival.

2.1.5. Examen radiográfico

Tras el examen clínico, se deben realizar radiografías de aleta de mordida, que son las que mejor muestran todas las zonas interproximales, y en caso de que sea necesario, radiografías periapicales. La interpretación de la radiografía se complica debido a:

- Presencia del diente sucesor con su correspondiente folículo, que puede conllevar al diagnóstico erróneo de patología periapical.
- Sobreimpresión del diente definitivo, que puede ensombrecer la imagen de raíces y furca del temporal, provocando faltas en el diagnóstico.
- Cambios anatómicos debidos a la reabsorción fisiológica del diente temporal.

Podemos encontrar áreas de radiolucidez, al igual que en dientes definitivos. En dientes anteriores se verá a nivel apical, y en molares se verá con más claridad en furcas, así que utilizaremos aletas de mordida para valorar estos cambios en molares. La presencia de reabsorción radicular patológica y áreas de hueso infectado representan una patología pulpar avanzada que se ha extendido al tejido periapical y en la mayoría de los casos sólo será tratable con extracción.

Si la irritación pulpar es crónica, de progresión lenta, la caries estimulará la deposición de dentina terciaria sobre la pulpa, y en ocasiones esto podrá ser visualizado en la radiografía,

siendo de gran ayuda (Camp y Fuks. 2006).

Si la progresión es rápida, cuando la caries se acerca a la pulpa, se pueden formar masas de tejido calcificado, a distancia de la lesión, que siempre son indicativos de degeneración pulpar que ha avanzado hasta las raíces, siendo estos dientes candidatos sólo a pulpectomía o extracción.

La presencia de reabsorción radicular interna en dientes primarios está siempre asociada a inflamación extensiva (Guthrie et al. 1965). Debido a lo estrecho de estas raíces, si se puede constatar en la radiografía que hay reabsorción interna, con toda seguridad habrá perforación, y el diente se deberá extraer.

Las radiografías también pueden mostrar evidencias de tratamiento pulpar previo y cambios en pulpa. La presencia de bifurcaciones y canales creados por calcificaciones revela un historial de pulpitis, en cambio los canales amplios en dientes permanentes pueden ser indicativos de detención en la formación de las raíces por necrosis pulpar.

Al realizar el diagnóstico mediante imagen, existe la dificultad de que la lesión tiene mayor tamaño clínico que radiográfico (Kennedy y Kapala. 1985), y lo que puede parecer una barrera de dentina secundaria puede más bien ser una masa perforada de dentina irregularmente calcificada y cariada (McDonald et al. 2000). Además, en la actualidad no se ha encontrado ningún método definitivo para determinar con exactitud cuánta caries debe ser eliminada, pues lo que nos interesa es eliminar la dentina infectada más exterior, y la dentina hipomineralizada bajo esta debe ser protegida, aunque es difícil distinguir clínicamente entre dentina infectada y desmineralizada. La distinción se realizará guiado por la calidad de la dentina, la profundidad de la lesión y la sintomatología, junto con el aspecto radiográfico (Rodd et al. 2006).

Sobre este punto, Bjørndal y Thylstrup concluyeron que, cuando en la imagen radiográfica se observa que la caries ha invadido las tres cuartas partes de la dentina, ya existía riesgo potencial de provocar una exposición pulpar (Bjørndal y Thylstrup. 1998).

2.1.6. Exploración pulpar directa

En los tratamientos que suponen la apertura de la cámara pulpar, el aspecto y color de la pulpa, y la cantidad de sangrado, determinan de forma directa el nivel de inflamación. Si el sangrado es de un color rojo vivo y controlable mediante presión con una bola de algodón habrá ausencia de pulpitis, o esta será reversible. Una hemorragia difícil de controlar y de aspecto oscuro es indicativa de pulpitis irreversible. En casos de necrosis pulpar habrá ausencia de sangrado, y en ocasiones la presencia de un exudado purulento.

2.1.7. Proximidad del diente definitivo

La proximidad del diente definitivo es otro factor importante a tener en cuenta, ya que siempre elegiremos tratamientos que no conlleven riesgo de dañar el definitivo (Borum et al. 1998).

Ciertos estudios muestran que no hay relación entre tratar dientes primarios y la aparición de defectos en la mineralización del definitivo, comparado con extraerlos (Andreasen y Ravn. 1972).

Sobre este tema, resulta un clásico el estudio de Alacam, en el que se estudiaron 43 dientes permanentes, en cuyos dientes primarios se habían realizado pulpotomías con éxito, usando el contralateral como grupo control, y no se apreciaron malposiciones ni lesiones en el esmalte en ninguno de los casos, ni hallaron diferencias significativas frente el grupo control (Alacam. 1989).

En cambio, otros autores observan cierta tendencia en la aparición de defectos en la mineralización de dientes permanentes, relacionada con el tratamiento de dientes primarios con presencia de lesiones periapicales y mantenerlos en boca hasta su exfoliación natural (Holan et al. 1992). Aunque finalmente los autores concluyen que, a pesar de los casos hallados, no hay evidencias firmes que así lo confirmen, por lo que aconsejan realizar tratamientos pulpares no vitales cuando así esté indicado.

2.2 Tratamientos pulpares en dentición temporal

2.2.1. Tratamientos pulpares vitales con pulpa normal o pulpitis reversible

Tienen como propósito el tratamiento de lesiones pulpares reversibles, o la prevención de estas lesiones, para recuperar la vitalidad y función pulpar (Tziafas. 2004), y pretende conservar el diente hasta la exfoliación natural, preservando así la integridad del arco (Fuks. 2002). Este concepto incluye bases cavitarias y protección pulpar indirecta para cavidades profundas, pulpotomía, y protección pulpar directa para casos de exposición pulpar.

Se han realizado avances en la biología molecular que nos ayudan a entender los mecanismos moleculares y celulares que regulan la dentinogénesis durante la reparación del tejido dental y su potencial para uso clínico. Los odontoblastos reaccionan ante un estímulo leve formando nueva dentina para separarse de la lesión (Mjor et al. 1991). Si el estímulo es severo, e implica destrucción de odontoblastos, se libera factor de crecimiento transformante (TGF) secuestrado en la dentina durante la formación del diente (Messagne. 1990), que estimula a las células mesenquimales a diferenciarse en pseudo-odontoblastos, que serán los encargados de secretar una nueva matriz dentinaria (Fuks. 2005). Estos avances en investigación favorecen el desarrollo de nuevos métodos que pretenden regenerar y no extirpar el complejo dentino-pulpar.

Base o fondo cavitario

Consiste en un material que ubicamos en la superficie pulpar de una preparación cavitaria cubriendo túbulos dentinarios expuestos, que funcionará como una barrera protectora entre la pulpa y el material restaurador. Usaremos hidróxido de calcio o ionómero de vidrio puesto que tienen propiedades físicas adecuadas.

Este tratamiento estará indicado en dientes primarios con pulpa normal, con dentina expuesta en la preparación cavitaria para una restauración, en la que hemos eliminado toda la caries y su objetivo es preservar la vitalidad pulpar, promover la curación de los

tejidos subyacentes con formación de dentina terciaria, disminuir la microfiltración y evitar la sintomatología post-operatoria como sensibilidad o dolor (Costa et al. 2007).

Protección pulpar indirecta

Es un procedimiento para dientes con una lesión de caries profunda en las proximidades de la pulpa (AAPD Reference Manual. 2012). Consiste en dejar parte de la dentina desmineralizada para evitar la exposición pulpar (Ricketts et al. 2006), y a continuación cubrir esta dentina con un material biocompatible. Elegiremos para ello un material radiopaco como hidróxido de calcio, óxido de zinc-eugenol o un cemento de ionómero de vidrio para estimular la curación y reparación con formación de un puente de dentina (Casagrande et al. 2010).

Está indicado en dientes sin sintomatología clínica o radiográfica o con pulpitis reversible, en los que voluntariamente se ha evitado la exposición pulpar durante la preparación cavitaria. Su objetivo es sellar completamente la dentina afectada del medio oral, preservar la vitalidad del diente y controlando que no aparezca sintomatología postoperatoria como sensibilidad, dolor o inflamación, ni signos radiográficos de reabsorción radicular interna o externa ni otras patologías, así como ausencia de daño al germen permanente (Kopel. 1997).

Protección pulpar directa

Se realiza cuando provocamos una exposición mecánica pequeña durante la preparación cavitaria o tras un traumatismo. Debemos colocar hidróxido de calcio sobre el tejido pulpar y restaurar el diente de forma que evitemos la microfiltración. Se busca la formación de dentina nueva en el área de exposición, y con ella la completa curación de la pulpa (AAPD Reference Manual. 2012).

Está indicado para casos muy limitados en dientes temporales sin sintomatología y con condiciones óptimas para la recuperación, por ejemplo en exposiciones iatrogénicas sin contaminación por caries y en traumatismos recientes. Para que la indicación sea de recubrimiento pulpar el sangrado debe ser mínimo y controlable, y no debe haber contaminación bacteriana (Kopel. 1997).

El objetivo es mantener la vitalidad pulpar sin signos o síntomas postoperatorios, a pesar de haber una exposición pulpar. Se pretende la curación pulpar y la formación de dentina reparativa. No debe haber evidencia radiográfica de reabsorción radicular patológica, ni radiolucidez periapical, ni daño al germen del definitivo (Dammaschke. 2008).

Pulpotomía

Este término hace referencia a la eliminación de la porción coronal de la pulpa dental afectada, basándose en el hecho de que la pulpa radicular tiene potencial para curar en ausencia de inflamación (AAPD Reference Manual. 2012). Está indicado en dientes temporales en que la pulpa coronal esté afectada, pero sin presencia de signos clínicos o radiográficos de pulpitis irreversible.

Sin embargo, estará contraindicado en casos de dolor espontáneo, movilidad anormal, fístulas, reabsorción radicular patológica o radiolucidez en ápice o furca. Además, debe ser posible restaurar el diente y conservar aún dos tercios de la longitud radicular para que su vida funcional sea razonable. El diagnóstico de no afectación de la pulpa radicular se confirma al amputar la pulpa coronal, el sangrado debe ser coercible, en caso contrario debemos eliminar también la pulpa radicular pues estará afectada (Witherspoon. 2008).

El objetivo es que la pulpa radicular mantenga la vitalidad, y el diente siga con su correcto funcionamiento hasta su exfoliación. Por eso, el material que se use debe ser bactericida, pero también inocuo para el tejido pulpar, debe promover su curación y no debe interferir en la reabsorción radicular (Fuks. 2005).

Una forma de clasificación para las pulpotomías según su objetivo terapéutico (Ranly. 1994) es la siguiente:

- **Desvitalización:** consiste en la fijación completa del tejido remanente. Teóricamente la pulpa cameral quedará estéril y desvitalizada. Con este fin se utiliza el formocresol, la electrocoagulación y el láser (Milnes. 2006).
- **Preservación:** pretende dañar mínimamente el tejido pulpar, pero sin inducir un

proceso reparativo. Está representada por el glutaraldehído, compuestos de corticoides y sulfato férrico (Cortés et al. 1997).

- Regeneración: el objetivo es dejar la pulpa radicular sana, induciendo la formación de dentina reparativa. Para este propósito se usan las proteínas morfogenéticas, el hueso liofilizado, el colágeno, e incluiríamos también al MTA, debido a sus propiedades (Holan et al. 2005; Fuks. 2008).

En la figura 1 podemos ver esquemáticamente la profundidad en la que se realizan los tratamientos anteriormente comentados.

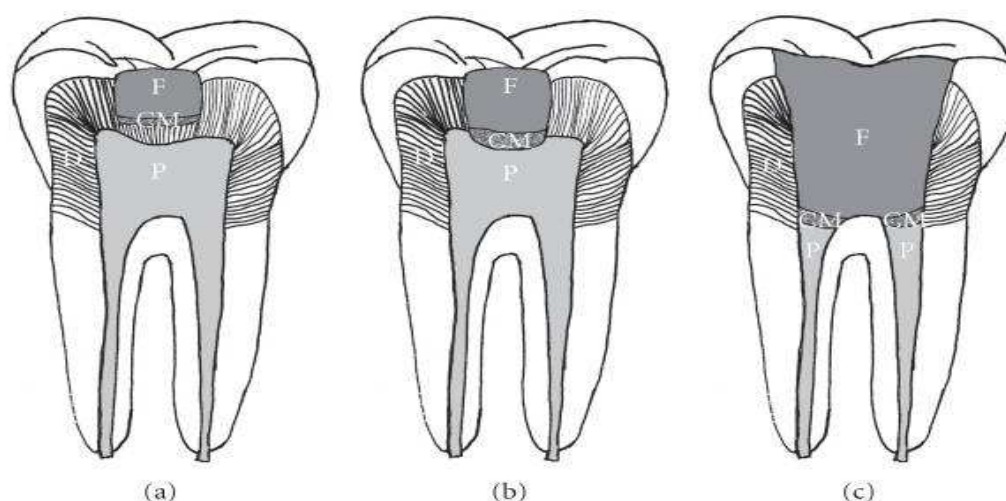


Figura 1: Tratamientos pulpares vitales: (a) Protección pulpar indirecta (b) Protección pulpar directa (c) Pulpotomía. (Zhang y Yelick. 2010).

Restauración

Estos tratamientos pulpares vitales deben ser completados con una restauración adhesiva que selle adecuadamente el margen de la cavidad, para evitar el fracaso por la re-entrada de bacterias (Witherspoon. 2008). Para muchos autores, la microfiltración bacteriana es la causa principal de inflamación pulpar (Murray. 2003⁽²⁾) por lo que evitarla facilitaría la curación.

Algunas bases se disuelven con el paso del tiempo, y los puentes dentinarios reparativos presentan defectos en túnel ocasionados por vasos sanguíneos remanentes (Cox et al.

1999), por lo que las bases cavitarias por sí solas no van a ser capaces de sellar adecuadamente la restauración.

El sellado marginal que se consigue con las restauraciones adhesivas refuerza al tejido dental remanente, previene la sensibilidad postoperatoria, protege a largo plazo de la filtración bacteriana y caries recurrente, y provee un sustrato biomimético que favorece la curación pulpar y la formación de un puente de dentina reparativa (Cox et al. 1999).

El concepto de adhesión fue aceptado en 1991 en el Symposium de Adhesión en Odontología, en el que se publicó documentación científica que mostraba la hibridación de la dentina vital (International Symposium on Adhesives in Dentistry. 1991), refutando la teoría de que el barrillo dentinario es inviolable.

Hasta principios de los 80, debido a que las resinas sufren una contracción a causa de la polimerización química, se producían espacios de hasta 10 μm en la interfase entre la restauración y el diente (Bergenholtz. 1982).

Este espacio se redujo gracias a la fotopolimerización por capas, y los avances que se produjeron en la composición de los materiales restauradores, llegando a disminuir esta interfase con la formación de la capa híbrida hasta menos de un micrómetro (Hashimoto et al. 2004). Aunque este sigue siendo un espacio demasiado grande, al tener el lactobacillus menos de 0,1 μm de diámetro (Hansel et al. 1998).

Hay autores que consideran la reacción pulpar al adhesivo en sí como mínima, y responsabilizan de esta reacción a las bacterias (Murray et al 2003⁽²⁾). Esto se ve apoyado por hallazgos como los de Hansel y colaboradores en 1998, según los cuales, las resinas EGDMA y TEGDMA promueven la proliferación de microorganismos cariogénicos como *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus sobrinus*, o los de Khalichi y colaboradores en 2004, según los cuales el TEGDMA además estimula el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *salivarius*, debido al cambio que provoca en el pH del medio.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podríamos realizar una restauración de amalgama o resina, siempre que la caries sólo afecte a la superficie oclusal y que el diente se vaya a exfoliar en menos de dos años. En caso contrario, lo más indicado en molares es una corona de acero, y en dientes anteriores si no hay suficiente superficie para un composite se puede colocar una corona con frente estético (Holan et al. 2002).

2.2.2. Tratamientos pulpares no vitales en presencia de pulpitis irreversible o necrosis

Pulpectomía

Se denomina pulpectomía o biopulpectomía total a la eliminación de la pulpa cuando todavía está vital y tratamiento de conductos en caso de necrosis pulpar. Está indicado en dientes con pulpitis irreversible o necrosis en la pulpa radicular, con signos de dolor espontáneo o provocado, radiolucidez apical y fístula, siempre que la reabsorción radicular fisiológica no sobrepase el tercio apical. En algunos casos el diagnóstico lo verificaremos cuando al eliminar la pulpa cameral encontremos que el remanente pulpar sangra de manera no controlable, o con exudado purulento (AAPD Reference Manual. 2012).

Los tratamientos pulpares no vitales están contraindicados en pacientes con enfermedades cardíacas congénitas o inmunocomprometidos. A nivel local está contraindicado en dientes no susceptibles de ser restaurados por estar demasiado destruidos por caries, reabsorción interna de las raíces, perforación del suelo de la cavidad pulpar o quiste folicular, en tales casos estaría indicada la exodoncia.

En algunos casos está indicado realizar la pulpectomía aún cuando el pronóstico del diente no sea el más favorable, por ejemplo en dientes temporales sin sucesor permanente, o en segundos molares superiores temporales en que el primer molar definitivo no ha erupcionado, por lo que intentaremos conservar el diente para esperar a la erupción del primer molar definitivo y colocar un mantenedor de espacio (Goering y Camp. 1983).

Los conductos radiculares serán desbridados, desinfectados y rellenados con un material adecuado, pero no ensanchados, pues el objetivo es reducir la población bacteriana, para lo

cual nos ayudaremos de irrigaciones con suero fisiológico, clorhexidina o hipoclorito de sodio de entre el 1 y el 5% (Cortes y Boj. 2011).

El material que usemos para obturar la raíz se debe adherir a las paredes y ser reabsorbido al mismo tiempo que la raíz durante la exfoliación, debe ser antiséptico y no irritante para los tejidos adyacentes ni el germen del permanente. En la actualidad se recomienda el uso de una mezcla de iodoformo e hidróxido de calcio, por ser reabsorbible, radiopaco y tener buen manejo (Nurko et al. 2000) aunque se ha sugerido que es citotóxico dependiendo de la concentración (Wright et al. 1994).

Una vez terminado el tratamiento, la lesión debería repararse completamente en seis meses mostrando formación de hueso en las áreas radiolúcidas, y todos los síntomas clínicos deberían curar en dos semanas. El tratamiento debe permitir la correcta reabsorción del diente y material de relleno, para que la erupción del diente definitivo se produzca con normalidad (Casas et al. 2004).

2.3. Tratamientos pulpares en dentición permanente inmadura

Los dientes inmaduros, por ser jóvenes, tienen un potencial regenerativo muy alto, por eso en ellos se considera adecuado hacer tratamientos pulpares vitales siempre que se pueda colocar una restauración que selle adecuadamente los márgenes de la cavidad (Trope. 2008). Por contra, son dientes con un desarrollo radicular deficiente y si el tratamiento no es apropiado puede peligrar el desarrollo de la raíz y en consecuencia, el pronóstico del diente (Robertson et al. 2000).

Es el desarrollo radicular el que va a determinar en muchos casos el tratamiento que realicemos en dentición permanente inmadura, por lo que debemos diferenciar entre una raíz en desarrollo, y una completamente terminada. Según Orban, la formación de la raíz comienza cuando la dentina alcanza la unión amelocementaria, momento en que se fusionan el órgano del esmalte interno y externo para formar la vaina epitelial de Hertwig (Orban. 1957).

La raíz se forma en sentido corono-apical, al principio es amplia y sus paredes divergentes, pero una vez que se ha completado la longitud total, continúa la deposición de dentina estrechando el conducto radicular por el que discurre la pulpa. Si se diferencian varios conductos en una raíz, estos pueden comunicarse por medio de istmos, aunque según continúa el desarrollo se van formando islas de dentina entre ellos que en la mayoría de los casos los separa. Finalmente, la deposición de cemento y dentina convergen apicalmente y cierra el ápice (Camp y Fuks. 2006).

En dientes permanentes, la formación radicular no se termina hasta pasados entre uno y cuatro años tras la erupción del diente a la cavidad oral, aunque en dientes temporales este proceso dura menos por ser estos más pequeños. Este cierre apical algunas veces no puede ser constatado en la radiografía, especialmente en dientes multirradiculares, por lo que el clínico deberá confiar en el intervalo de tiempo desde la erupción para calcular dicho cierre (Hargreaves et al. 2008).

Existe convenio universal en que los dientes inmaduros tienen mayor potencial curativo en casos de traumatismo o caries, especialmente si el forámen apical está totalmente abierto (Camp. 2008), pero también son los que más posibilidades tienen de llevar a error en el diagnóstico. El diagnóstico nunca se debe fundamentar sólo en las pruebas de vitalidad pulpar, sino en la sintomatología y en las pruebas radiográficas. Son determinantes los síntomas de pulpitis irreversible o periodontitis apical, como inflamación, dolor a la percusión, movilidad, formación de fístula, pérdida de hueso visible en la radiografía, reabsorción radicular o detención de la formación radicular al comparar con otros dientes. En caso de duda mantendremos al paciente en observación hasta que se pueda establecer un diagnóstico definitivo.

Los tratamientos pulpares vitales en dentición permanente inmadura deben ir orientados a mantener la vitalidad del diente para que se pueda completar la formación radicular, o en caso de que se haya perdido esa vitalidad, a estimular externamente el cierre apical de las raíces. Con este fin, existen dos tratamientos que son específicos de dentición permanente inmadura, y cuyo objetivo es el cierre apical.

2.3.1. Tratamiento pulpar vital: Apexogénesis

Es el tratamiento de la pulpa coronal que permite que la raíz continúe con su desarrollo fisiológico y formación del ápice con normalidad. Esta formación del ápice en dientes jóvenes permanentes se puede conseguir mediante un adecuado tratamiento pulpar vital: protección pulpar directa e indirecta, pulpotomía. Este conjunto de tratamientos está indicado para dientes permanentes inmaduros, afectados por una caries o lesión traumática más o menos profunda, que incluso puede invadir la pulpa cameral, pero sin afectación de la pulpa radicular (AAPD Reference Manual. 2012).

En estos casos, el diente se presenta asintomático o con pulpitis reversible, hecho que verificaremos una vez eliminada la porción coronal. La pulpa radicular debe ser vital, y no tener pulpitis irreversible, ni presentar degeneración avanzada, en cuyo caso mostraría signos como dolor espontáneo, sangrado pulpar excesivo e incluso supuración.

El material de elección en estos casos debe ser antiséptico, inductor de la mineralización, debe tener la capacidad de sellar marginalmente y ser biocompatible para que la pulpa se encuentre en las mejores condiciones posibles para la curación. El material más utilizado hasta ahora ha sido el hidróxido de calcio (Stanley y Pameijer. 1997). También se ha estudiado el uso de MTA con muy buenos resultados siendo considerado por algunos autores como el material de elección (Witherspoon. 2008; Damle et al. 2012).

La amputación de la pulpa coronal puede ser total o parcial (Mejàre y Cvek. 1993), tras la cual limpiamos la cámara pulpar con antisépticos y aplicamos el hidróxido de calcio sobre la entrada de los conductos, consiguiendo que la porción superficial de la pulpa más cercana al hidróxido de calcio se necrose, y se inicie una reacción inflamatoria aguda en los tejidos subyacentes.

Pasadas unas cuatro semanas remite la inflamación aguda y se desarrolla una nueva capa odontoblástica en el lugar de la herida para dar lugar a un puente dentinario (DeRosa.

2006). Una vez se consigue el cierre apical, se aconseja realizar el tratamiento endodóntico convencional con gutapercha, y posteriormente, se restaura el diente con materiales adecuados, para evitar la microfiltración bacteriana y favorecer la curación pulpar (Álvarez et al. 2011).

Siempre que se pueda, es preferible conservar la vitalidad de la pulpa radicular para que sea este mismo el que continúe el cierre apical. Además, se ha valorado la resistencia de un diente tras la apexogénesis, siendo el tejido mineralizado superior en calidad y cantidad, y teniendo mejor integridad estructural, respecto a los dientes cuyo ápice se ha terminado de formar tras un tratamiento pulpar no vital, como es la apexificación (Cvek. 1992).

2.3.2. Tratamientos pulpares no vitales en presencia de pulpitis irreversible o necrosis: Apexificación

Este tratamiento se realiza sobre dentición permanente inmadura, en casos de afectación radicular extensa, pulpitis irreversible o necrosis y en aquellos destinados a pulpotomía en los que encontramos que la pulpa radicular sangra demasiado o no sangra nada. También está indicado en dientes con signos radiográficos de osteítis periférica, pues tras el tratamiento se observa una reparación gradual del hueso (Álvarez et al. 2011). El objetivo del tratamiento es inducir la formación radicular en raíces con el ápice inmaduro, pudiéndose confirmar en la radiografía una barrera apical. Si intentásemos realizar el tratamiento endodóntico convencional, al tener el ápice inmaduro, sería imposible conseguir un buen sellado apical (Cvek. 1973).

Para ello debemos primero eliminar toda la pulpa radicular mediante limado e irrigación y rellenar el conducto con una pasta que induzca este proceso. En la actualidad, los materiales de relleno de elección son hidróxido de calcio y MTA (Torabinejad. 1999). Ambos garantizan la asepsia debido a su alto pH e inducen la maduración del ápice radicular con la única diferencia de que el hidróxido de calcio requiere varias citas para cambiar el producto, con un intervalo de entre tres y seis meses, y el MTA permite hacerlo en una sola sesión para ubicarlo, y pasadas cuatro horas en que se tiene que mantener la humedad, restaurar el diente. Los restos celulares de la vaina epitelial de Hertwig se han

identificado como los responsables del cierre apical, incluso en dientes necróticos (Ghafoor. 2012).

Una vez completado el cierre radicular, se procede a realizar el tratamiento endodóntico convencional. Hay que ser muy cuidadosos porque, aunque en la radiografía observemos el ápice cerrado, puede tratarse de un puente de cemento u osteodentina porosa e irregular. El material de elección para rellenar el resto del conducto es gutapercha caliente (Kinirons et al. 2001), y si es muy amplio con composite.

La complicación más frecuente es la fractura radicular a nivel cervical, debida a la extrema delgadez de las paredes radiculares en algunos casos, para la fuerza que absorbe esta zona, y a los cambios que se pueden producir en la dentina circumpulpar provocados por el largo tiempo de aplicación del hidróxido de calcio (Andreasen et al. 2002).

Para cualquiera de los tratamientos pulpares que hemos comentado, debe realizarse un seguimiento clínico y radiológico cuya periodicidad debe valorarse según el caso. En estos controles nos fijaremos en la ausencia de síntomas adversos como sensibilidad, inflamación o dolor, así como radiolucidez apical o reabsorción al observar la imagen radiográfica, que nos indicarían el fracaso de nuestro tratamiento, así como la normal función del diente y el correcto proceso de reabsorción, así como la no lesión del germen del diente permanente.

Por último, recordar que todos estos materiales y técnicas están en continua evolución, y requieren una revisión constante, debido a los avances en los conocimientos biológicos y los nuevos materiales que van apareciendo.

3. PROTECCION PULPAR INDIRECTA EN DENTICIÓN TEMPORAL

Se define como el procedimiento en que el tejido cariado no remineralizable se elimina y se deja una fina capa de dentina hipomineralizada en la parte más profunda de la cavidad, evitando la posibilidad de provocar exposición pulpar, recubriendo esta última capa con un material biocompatible.

La protección pulpar indirecta es un procedimiento que se realiza en dientes con lesiones profundas, que se aproximan a pulpa, pero sin síntomas o signos de degeneración pulpar, basándonos siempre en una historia médica, clínica y radiográfica exhaustiva, que nos permitirá realizar un diagnóstico adecuado (AAPD reference manual 2012).

El recubrimiento pulpar indirecto o protección pulpar indirecta es una técnica conservadora de la que existe constancia de que ha sido utilizada desde hace más de 200 años (Al-Zayer et al. 2003). En el pasado, este tratamiento no estaba indicado para dientes primarios con pulpitis reversible, y gracias a los hallazgos en biología pulpar y el desarrollo de nuevos materiales, en la actualidad es una opción de tratamiento en odontopediatría (Fuks. 2008). Según esta autora, la protección pulpar indirecta puede ser el tratamiento de elección para dientes primarios con caries profundas y pulpitis reversible, siempre que se realice previamente un buen diagnóstico, y se selle adecuadamente el diente con una restauración adhesiva.

Esto supone un cambio de mentalidad respecto a lo que se aconsejaba hasta ahora, que era hacer directamente la pulpotomía en dientes primarios con caries en la proximidad de la pulpa. Las indicaciones de protección pulpar indirecta y pulpotomía en dientes de leche son prácticamente idénticas (Coll. 2008), dientes asintomáticos con caries profundas, en los que se ha constatado la vitalidad pulpar o pulpitis reversible, sin síntomas clínicos o radiográficos de necrosis.

La diferencia reside en el momento de eliminar la caries, pues en la protección pulpar indirecta se evita la exposición pulpar dejando a propósito las capas más profundas de dentina desmineralizada, con el fin de favorecer los mecanismos biológicos de curación

pulpar que hemos comentado previamente (Weyant et al. 2006). Por este motivo es preferible realizar una eliminación conservadora de la caries.

Esa es también la conclusión de Ricketts y colaboradores al realizar un metaanálisis de ensayos clínicos en los que se comparó la eliminación total de la caries con una eliminación conservadora, valorando en cada caso el índice de exposición pulpar, la incidencia de síntomas de pulpitis irreversible o necrosis por parte del paciente, la progresión de la caries bajo la restauración y el tiempo hasta que la restauración definitiva fracasaba y había que reponerla. Sólo cuatro estudios cumplieron con estos criterios de inclusión, en los cuales la eliminación conservadora de caries permitió evitar la exposición pulpar, además, los pacientes no refirieron síntomas de patología pulpar ni perdieron prematuramente las restauraciones (Ricketts et al. 2006).

La matriz dentinaria es considerada una reserva de factores de crecimiento (TGF- β), proteínas formadoras de hueso (BMP), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento insulinoides (IGF), que son secretados por odontoblastos y fibroblastos pulpares funcionales durante la formación de la dentina (Ranly y García-Godoy. 2000).

Estos factores son liberados tras la desmineralización de la dentina inducida por la caries, y parece que están implicados en la proliferación y diferenciación de células pulpares, proveyendo señales quimiotácticas para reclutar células pulpares hasta el sitio de la lesión e iniciar la reparación tisular (D'Souza et al. 1998).

La capa superficial de dentina cariada, contiene a la mayoría de los microorganismos y sus productos tóxicos, por lo que hay que eliminar esta capa de dentina infectada para permitir la curación pulpar (Massara et al. 2002). La dentina desmineralizada, correspondiente a la capa más profunda, puede ser conservada puesto que contiene pocos microorganismos (Franzon et al. 2007). Es fundamental eliminar completamente la caries de los márgenes cavitarios para el éxito del tratamiento, pues permitirá sellar la cavidad con un material restaurador y así evitar la filtración de caries nueva (Straffon y Loos. 2000). Bajo estas circunstancias, las bacterias remanentes son aisladas de los nutrientes, dejan de proliferar y mueren (Fitzgerald y Heys. 1991).

Se ha demostrado una disminución en el número de microorganismos y la detención de las lesiones activas tras realizar este tratamiento (Leung et al. 1980; Aponte et al. 1966; Pinto et al. 2006), así como una mayor tasa de éxito al conservar esta última capa hipomineralizada respecto a eliminarla, pues al ser un procedimiento menos traumático favorece la curación pulpar (Farooq et al. 2000; Straffon y Loos. 2000; Falster et al. 2002; Al-Zayer et al. 2003; Ricketts et al. 2006; Marchi et al. 2006).

Para valorar esta posible curación pulpar, Pinto y colaboradores llevaron a cabo un estudio con 20 pacientes de entre cuatro y siete años, con un total de 42 molares primarios tratados con protección pulpar indirecta. El tratamiento consistió en la eliminación parcial de la dentina desmineralizada, la colocación de un recubrimiento pulpar de hidróxido de calcio, usando como control una base de gutapercha por ser un material inerte, y la posterior restauración del diente con un composite. Pasados entre cuatro y siete meses reabrieron 39 de estos dientes para evaluar el estado microbiológico y clínico (color y consistencia de la dentina). Los autores hallaron un descenso significativo en el recuento bacteriano para todos los tipos bacterianos, un oscurecimiento en el color de la dentina y una consistencia más dura (Pinto et al. 2006).

Se puede observar con un seguimiento radiográfico la formación de una matriz para la dentina terciaria. Se cree que la protección pulpar indirecta causa una lesión leve que estimula a odontoblastos y otras células pulpares a proliferar y secretar una dentina reaccionaria (Franzon et al. 2007). La formación de dentina reparativa es un proceso biológico complejo que requiere la presencia de células progenitoras, que proliferen, migren hasta la lesión y se activen (Gronthos et al. 2000; Murray y García-Godoy. 2004).

Wambier y colaboradores realizaron un estudio clínico *in vivo* sobre molares primarios para valorar bacteriológica y microscópicamente la dentina que se formaba tras realizar un tratamiento de protección pulpar indirecta. Se incluyeron en el estudio 32 molares primarios afectados por caries profundas, sin signos clínicos de pulpitis irreversible, ni lesiones periapicales. Se tomaron muestras de la dentina ya preparada, antes de colocar el recubrimiento, en este caso un ionómero de vidrio modificado con resinas, y se compararon con las muestras tomadas treinta y sesenta días después del tratamiento. Para

ello analizaron la dentina de ocho molares mediante microscopio electrónico, observando inicialmente túbulos dentinarios ensanchados e inclusiones bacterianas. En cambio, las muestras tomadas tras el tratamiento muestran un estrechamiento en los túbulos dentinarios, y reorganización de fibras colágenas, en una disposición más compacta. Además realizaron recuentos bacterianos, obteniendo una disminución significativa de la microbiota ($p < 0.05$). En base a estos resultados, los autores concluyen que la dentina hipomineralizada se remineraliza y se forma dentina terciaria, y que no es necesario realizar una eliminación de caries agresiva, pues es preferible una eliminación conservadora, y sellar adecuadamente la cavidad (Wambier et al. 2007).

Por ese motivo, el éxito del tratamiento depende también de la restauración que se utilice. Es muy importante conseguir un sellado permanente que asegure la ausencia de filtración marginal (Mertz-Fairhurst et al. 1998). Mertz-Fairhurst y colaboradores tenían la hipótesis de que la caries podía ser detenida al aislarla de nutrientes, pues las bacterias cariogénicas morirían. Para probarlo realizaron un estudio sobre 170 dientes a diez años (originalmente eran 312) en que sellaban lesiones de caries dentinaria activa, y para ello comparaban restauraciones adhesivas de composite con restauraciones de amalgama tanto adherida como sin adherir, obteniendo un mejor resultado clínico y longevidad de las restauraciones adheridas de ambos tipos respecto a la amalgama sin adherir, así como la detención del avance de la caries debajo de las restauraciones. Además, todos los dientes conservaron la pulpa vital.

Todo esto nos lleva a considerar a la protección pulpar indirecta como un tratamiento alternativo en lesiones cariosas profundas en dientes temporales. Para algunos autores supone una alternativa a la pulpotomía para este tipo de casos y en la que distintos estudios han demostrado una tasa de éxito elevada (Sawusch. 1982; Ribeiro et al. 1999; Farooq et al. 2000; Massara et al. 2002; Falster et al. 2002; Pinto et al. 2006; Marchi et al. 2006), y acompaña al concepto de odontología mínimamente invasiva que siempre debemos procurar en nuestros pacientes (Murdoch-Kinch y McLean. 2003).

3.1. Indicaciones

Estará indicado realizar la protección pulpar indirecta en dientes temporales con lesiones cariosas profundas, sin sintomatología clínica o radiográfica, o con pulpitis reversible, en que voluntariamente se ha evitado exponer la pulpa durante la preparación cavitaria. Deben ser dientes que no presenten signos de patología pulpar irreversible como dolor espontáneo o a la presión, basado en un examen clínico y radiográfico adecuado, y en la evaluación directa de la preparación cavitaria (Straffon y Loos. 2000; Farooq et al. 2000).

Falster y colaboradores realizaron en 2002 un estudio prospectivo y randomizado en que valoran los resultados clínicos y radiográficos de la protección pulpar indirecta en dientes primarios, comparando un adhesivo dentinario con una base cavitaria de hidróxido de calcio autopolimerizable (Falster et al. 2002). En este estudio se definieron unos criterios de inclusión para que un diente primario pueda ser tratado mediante protección pulpar indirecta:

1. Lesión de caries activa y profunda.
2. Extensión de caries tal, que la eliminación completa de la caries provocaría la exposición pulpar.
3. Ausencia de síntomas clínicos de pulpitis irreversible, como sensibilidad a la presión o dolor espontáneo.
4. Ausencia de diagnóstico clínico de exposición pulpar, fístula, inflamación de tejido periodontal y movilidad anormal del diente.
5. Ausencia de radiolucidez periapical o en furca y de ensanchamiento del ligamento periodontal, que indicarían presencia patología pulpar irreversible y necrosis.
6. Ausencia de reabsorción radicular interna o externa.

En caso de hinchazón, fístula o movilidad estaría contraindicado este tratamiento (Aponte et al. 1966; Straffon y Loos. 2000). En el examen radiográfico, la presencia de radiolucidez apical o en furca y reabsorción radicular interna o externa no relacionada con el proceso normal de exfoliación contraindicarían este tratamiento.

El fin último de este tratamiento es mantener la vitalidad pulpar del diente hasta su exfoliación fisiológica (Eidelman et al. 1965; Nordstrom et al. 1974; Tziafas et al. 2000) y con ello evitar que aparezca sintomatología postoperatoria -como sensibilidad, dolor o inflamación-, signos radiográficos de reabsorción radicular interna o externa, y al mismo tiempo prevenir el daño al germen permanente.

3.2. Diagnóstico intraoperatorio

A parte de todo el proceso diagnóstico comentado anteriormente, la evaluación directa de la preparación cavitaria es importante, porque el estado de la dentina remanente influye drásticamente en el pronóstico del tratamiento (Farooq et al. 2000; Tziafas et al. 2000).

El dilema para el clínico es cuánta caries debe dejar en el suelo de la cavidad. Pues hay que dejar la cantidad mínima que, en caso de ser eliminada, provocaría una exposición pulpar. Aunque resulta difícil determinar qué es dentina cariada y qué es dentina desmineralizada baja en bacterias, el mejor marcador es la calidad y la dureza: la dentina blanda debe ser eliminada y la dentina dura descolorida puede ser preservada (Fuks. 2005; Marchi et al. 2008). Debido a esta dificultad, algunos autores recomiendan el uso de colorantes para ayudar a la correcta eliminación (Fusayama. 1988; Lee et al. 2003; Bogen et al. 2008).

Respecto a la cantidad de caries que debe ser eliminada, Maltz y colaboradores publicaron un estudio en 2002, en el cual incluyeron 32 dientes con caries profundas. Se realizó una eliminación incompleta de la dentina cariada, dejando una última capa de dentina hipomineralizada, aplicando hidróxido de calcio en el fondo de la cavidad, y sellando los dientes con restauraciones adhesivas por un periodo de seis a siete meses. De todos los dientes incluidos, uno sufrió necrosis pulpar, y en otro se provocó una exposición pulpar al eliminar la restauración para reentrar a la cavidad. En los dientes restantes, los autores hallaron una dentina más seca, y dura, salvo en un 3.3% de los dientes, en que la dentina permaneció blanda, así como un cambio de coloración del blanco-amarillenta, a un marrón claro u oscuro. Los autores encontraron diferencias significativas en la densidad radiográfica y una disminución en el recuento bacteriano al reentrar en las cavidades, concluyendo que no es necesario realizar una eliminación exhaustiva de la dentina

hipomineralizada, siendo más conveniente una eliminación conservadora (Maltz et al. 2002).

Además en el caso de que se produzca exposición pulpar, su tamaño, así como la cantidad y color del sangrado, se consideran factores importantes en el diagnóstico para saber el grado de inflamación bajo la caries. Como todas las exposiciones cariosas van acompañadas de inflamación pulpar, cuanto mayor sea ésta, más posible es que esté extendida a toda la pulpa o sea necrótica. Un sangrado excesivo, que no deja de sangrar tras uno o dos minutos de presión con una bola de algodón, o de color púrpura oscuro es signo de pulpitis generalizada (McDonald. 2000), y este diente será candidato para un tratamiento más radical como puede ser la pulpectomía.

3.2.1. Métodos diagnósticos alternativos

Considerando la dificultad de obtener un buen diagnóstico en casos de caries profundas asintomáticas, se han desarrollado dos técnicas que sirven para evaluar el estado pulpar, antes de colocar una restauración definitiva.

Control de caries mediante ionómero de vidrio

Uno de estos procedimientos se llama Control de Caries mediante Ionómero de Vidrio (abreviado GICC por sus siglas en inglés Glass Ionomer Caries Control). Consiste en la eliminación de la mayor parte de la caries del diente sin anestesia, mediante cucharillas o instrumental rotatorio de baja velocidad, y la colocación provisional de un ionómero de vidrio, con la posibilidad de realizarlo en varios dientes en la misma cita (Bonecker et al. 2003). Esto se basa en el controvertido concepto de que no es necesario eliminar toda la caries del fondo de la cavidad, para detener su progresión (Oliveira et al. 2006). Pasados entre uno y tres meses, si el diente ha permanecido asintomático, se elimina el ionómero de vidrio y la caries remanente y se realiza la restauración definitiva.

Estaría indicado en dientes asintomáticos con lesiones cariosas profundas, o con signos o síntomas de pulpitis reversible (Vij et al. 2004). Según algunos autores, al eliminar la

caries superficial, se consigue un descenso en el recuento bacteriano dentro de la lesión (Bonecker et al. 2003; Wambier et al. 2007), se detiene la progresión de la caries (Oliveira et al. 2006) y se logra un aumento en la tasa de éxito del diagnóstico de un 23% (Campbell y Coll. 2007). Coll (2008) concluye que es un método diagnóstico excelente.

Al estudiar los resultados de este protocolo, Wambier y colaboradores (Wambier et al. 2007) encontraron un gran descenso en el número de bacterias, y con microscopio electrónico de barrido hallaron túbulos dentinarios reorganizados y más estrechos. Concluyeron que al eliminar la parte exterior de la lesión y sellar la cavidad con ionómero de vidrio se contribuye a la remineralización.

El ionómero de vidrio se coloca en la cavidad sin necesidad de usar matriz y manteniendo la restauración fuera de oclusión. La elección de este material se debe a que presenta buenas propiedades antibacterianas frente a *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus* por la liberación de flúor (Loyola-Rodríguez et al. 1994).

La temporización con GICC aumenta el éxito de tratamiento pulpar vital del 79 al 92% (Vij et al. 2004), en cambio con óxido de zinc eugenol la tasa de éxito era del 67% (Bjørndal et al. 1997). También aumenta el éxito en diagnóstico en lesiones cariosas profundas, pasando de un éxito del 75% en pacientes en los que no habían realizado GICC a un 98% de éxito en los pacientes en los que sí se había practicado este método diagnóstico, porque los pacientes que una vez realizado mostraban dolor fueron diagnosticados como pulpitis irreversible (Campbell y Coll. 2007).

Este mismo procedimiento puede aplicarse en pacientes que no tienen la posibilidad de recibir un tratamiento odontológico adecuado, pero con una finalidad restauradora, denominándose entonces Tratamiento Restaurador Atraumático, abreviado ART por sus siglas en inglés (Atraumatic Restorative Treatment).

Fue desarrollado en los años 80 con el objetivo de detener la progresión de la caries en comunidades sin medios económicos, aunque su indicación se ha ampliado a pacientes que no se dejan tratar, o que tienen problemas médicos especiales.

Este tratamiento consiste en preparar la cavidad sin anestesia, eliminar toda la caries posible con instrumentación manual, evitando la entrada a la cámara pulpar en cavidades profundas, y restaurar con un material adhesivo, como podría ser el ionómero de vidrio (Kemoli et al. 2009).

Massara y colaboradores han demostrado que el uso de ionómeros de vidrio crea las condiciones que llevan a la remineralización, y lo sugiere como base para la protección pulpar indirecta (Massara et al. 2002).

Las ventajas de usar ionómeros de vidrio en este tratamiento son:

- liberación de flúor.
- polimerización sencilla.
- Biocompatibilidad.
- adhesión a dentina y esmalte.
- buena relación calidad/precio.

(Phantumvanit et al. 1995).

ART es un tratamiento que ha aportado buenos resultados en cavidades de clase I, pero malos resultados en cavidades clase II (Yu et al. 2004; van der Hoef y van Amerongen. 2007). Sus resultados de éxito son de un 80-95% en clase I y 35-70% en clase II al año (Kemoli et al. 2009).

Las causas de fracaso se relacionan con:

- Insuficiente eliminación de caries.
- Mal aislamiento de la cavidad.
- Factores paciente-dependientes (Yu et al. 2004).
- Experiencia, tanto del operador, como de su auxiliar al preparar el material. (Frencken et al. 1996).
- Los ionómeros de vidrio no son capaces de soportar las fuerzas oclusales

(Frencken y Holgrem. 1999).

Aún en casos de fracaso, los autores reportan que la caries se detenía por un periodo de tiempo y los dientes se veían en cierto modo reforzados, pues al observar los dientes que perdían la restauración encontraron que presentaban diferente color y dureza en la lesión (Santiago et al. 2005) y que los dientes que se restauran con ionómero de vidrio muestran hipermineralización en los bordes de la restauración.

Excavación en dos tiempos

El otro método diagnóstico es llamado Stepwise excavation (Magnusson y Sundell. 1977), excavación parcial (Ricketts et al. 2006) o excavación en dos tiempos. Sería equivalente a una protección pulpar indirecta en dos tiempos, sólo que en una primera fase se elimina la mayor parte de la caries, dejando completamente limpias las paredes de la cavidad, y dejando una última capa de dentina cariada en el fondo de la cavidad, para evitar la entrada en la cámara pulpar. La eliminación de caries en esta primera fase debe ser un poco menos extensiva que en protección pulpar indirecta, disminuyendo más aún el riesgo de provocar una exposición de la cámara pulpar (Bjørndal. 2008). Sobre esta dentina se coloca una base cavitaria, generalmente un cemento a base de ionómero de vidrio o hidróxido de calcio, y se restaura el diente de forma provisional con IRM.

Pasado un tiempo de entre tres semanas (Swoden. 1956) y seis meses (Law y Lewis. 1961), siempre que la reacción pulpar haya sido favorable, se elimina la restauración provisional, la base cavitaria, y la dentina cariada remanente, y se coloca una restauración definitiva. La excavación de caries en la segunda fase, es más conservadora de lo que se podría esperar en un principio, debido precisamente a haber favorecido previamente la reacción pulpar, con la formación de dentina terciaria.

Es una técnica muy extendida entre los autores nórdicos, siendo uno de los primeros artículos el de Swoden, en 1956. El primer objetivo de la excavación en dos tiempos es que la cita inicial sea lo menos invasiva posible para promover mejor la curación, aunque la eliminación de caries es más minuciosa que la que se realiza en GICC. Con la restauración provisional, durante el intervalo de tiempo, se pretende alterar el entorno de las bacterias

cariogénicas, que quedarán aisladas de nutrientes. Una vez valorada la evolución del diente, sin sintomatología de pulpitis irreversible, es cuando se completa el procedimiento terapéutico con la restauración definitiva.

3.3. Procedimiento

Una vez aplicada la anestesia local, se realizará un aislamiento total del diente a tratar mediante el dique de goma. El primer paso clínico es abrir la cavidad comprometida y eliminar el esmalte dañado con alta velocidad y fresas de diamante, así como la caries en la unión amelodentinaria y en las paredes laterales de la cavidad con excavadores y/o fresas de carburo de tungsteno a baja velocidad. De esta forma se eliminan las grandes masas de tejido cariado, así como la parte superficial de la dentina necrótica y desmineralizada.

Es importante eliminar toda la caries de la unión amelodentinaria y de las paredes laterales de la cavidad para lograr una interfase óptima entre diente y restauración, que selle adecuadamente la restauración y evite la microfiltración (Watts y Patterson. 1987).

Se continúa la excavación del suelo cavitario hasta que el operador considera que si continúa puede provocar la exposición pulpar, entonces se deja una capa fina de dentina desmineralizada (con baja concentración de microorganismos) en la zona adyacente a la pulpa.

Una vez preparada la cavidad, se desinfecta con digluconato de clorhexidina al 2% (Silva et al. 2006), o hipoclorito sódico al 0,5%, mejorando ambos la reacción pulpar al tratamiento (Bal et al. 2011). Se cubre el fondo de la cavidad con un cemento de hidróxido de calcio, hidroxiapatita, ionómero de vidrio y se sella la cavidad con un material restaurador.

Con este procedimiento se pretende promover los siguientes mecanismos biológicos:

- Detención del proceso carioso por aislamiento de las pocas bacterias remanentes en la dentina hipomineralizada (Mertz-Fairhurst et al. 1998).

- Estimulación de formación de dentina terciaria reactiva por parte de los odontoblastos que sobreviven al proceso carioso (Franzon et al. 2007).
- Formación de dentina terciaria reparativa, por parte de pseudo odontoblastos diferenciados desde las células mesenquimales (Fucks. 2005).
- La formación de dentina terciaria conlleva una remineralización de la dentina hipomineralizada, estableciendo un puente dentinario entre la restauración y la pulpa.

3.4. Resultados: respuesta clínica y radiográfica

Para distintos autores, el recubrimiento indirecto de una pulpa irritada e inflamada resulta en un alto grado de curación, con una tasa éxito superior en algunos casos al 90% en dientes temporales, y resultados mejores o similares al comparar con pulpotomía y protección pulpar directa (Straffon et al. 1991; Farooq et al. 2000; Straffon y Loos. 2000; Falster et al. 2002). Esta curación se caracteriza por la remisión de la inflamación, reorganización del tejido blando y la formación de nuevo tejido duro en los puntos de exposición (Stanley y Pameijer. 1997). Estos son los resultados obtenidos tras el tratamiento:

1. Elevado porcentaje de éxito

Tasas de éxito muy altas, independientemente de los materiales usados, incluso cuando se restaura el diente sin colocar una base cavitaria (Kerkhove et al. 1967; Sawusch. 1982; Farooq et al. 2000; Falster et al. 2002; Franzon et al. 2007).

Farooq y colaboradores publicaron en 2000 un estudio en que evaluaban retrospectivamente 133 molares primarios con caries profundas, 38 de ellos con dolor diagnosticado como pulpitis reversible. 55 de estos molares fueron tratados con protección pulpar indirecta, obteniendo una tasa de éxito global del 93%, y del 85% en aquellos que tenían dolor preoperatorio.

Falster y colaboradores realizaron en 2002 un estudio prospectivo de 48 molares

primarios con caries oclusales, en que se definieron unos criterios de inclusión que comentamos anteriormente, con el objetivo de comparar el uso de resinas e hidróxido de calcio en protección pulpar indirecta en dentición primaria. Obtuvieron una tasa de éxito a los dos años del 83% en los molares tratados con hidróxido de calcio y un 96% en los tratados con adhesivo dentinario.

Franzon y colaboradores realizaron un estudio clínico sobre 39 molares primarios con caries profundas pero sin signos o síntomas de pulpitis irreversible, a los que realizaron protección pulpar indirecta con un recubrimiento a base de hidróxido de calcio, o en su lugar con una capa de gutapercha, por ser un material inerte que no posee propiedades bioinductivas, sellando en ambos casos la cavidad mediante una restauración con composite. Al valorar clínica y radiográficamente los resultados pasados 36 meses hallaron una tasa de éxito conjunta de 79,3%, sin existir diferencia significativa entre ambos grupos (Franzon et al. 2007).

2. Cambios en la dentina

La dentina originalmente desmineralizada, se remineraliza como consecuencia de la protección pulpar indirecta, que estimula a odontoblastos y otras células pulpares a proliferar y secretar una dentina reaccionaria (Franzon et al. 2007). Los cambios en la dentina se han detectado a partir de los tres meses, pero sólo son apreciables al visualizar radiografías pasados seis meses del tratamiento (Oliveira et al. 2006).

Eidelman encontró un aumento en la mineralización con mayor concentración de fósforo tras la aplicación de hidróxido de calcio (Eidelman et al. 1965) y Massara y colaboradores encontraron un aumento en la concentración de calcio al reabrir las cavidades a los tres meses (Massara et al. 2002).

Tras el tratamiento, la dentina muestra una apariencia más oscura y dura (Bjørndal et al. 1997; Bjørndal y Larsen. 2000; Maltz et al. 2002; Pinto et al. 2006; Marchi et al. 2008). Orhan y colaboradores, además reportaron que la dentina previa al tratamiento tenía un alto contenido de humedad, y numerosas colonias bacterianas, en cambio, tras el tratamiento el aspecto era de dentina seca y había un menor recuento de bacterias (Orhan

et al. 2008). En este estudio, la dentina aparecía como más dura, gris y seca tras un intervalo de tres meses.

Bjørndal y colaboradores, evaluaron clínicamente 31 lesiones cariosas profundas que habrían llevado a exposición pulpar de haberse realizado una excavación de caries convencional. Examinaron las alteraciones clínicas y microbiológicas a lo largo de entre seis y doce meses tras eliminar de forma conservadora la caries del fondo de la cavidad y conservando una última capa de dentina hipomineralizada. Obtuvieron como resultado un aumento en la dureza de la dentina, y una disminución en las colonias bacterianas, que aún estando presentes bajo la restauración inicial, no fueron capaces de proliferar y provocar un daño mayor (Bjørndal et al. 1997).

Se obtuvieron similares resultados en otro estudio clínico y microbiológico, en que se trató con protección pulpar indirecta a un total 39 dientes primarios, 20 de ellos con hidróxido de calcio y 19 con una base de gutapercha a modo de control, y sellados todos con una restauración de composite. Después de un periodo de cuatro a siete meses se valoró el color y consistencia de la dentina, y se hizo una evaluación microbiológica. La dentina inicial tenía un aspecto húmedo y blando, y un color en su mayoría amarillento o marrón claro. Tras el tratamiento la dentina aparecía seca, y marrón oscuro hasta en el 90% de los dientes tratados. También aparecía más dura en un 85% de los dientes tratados con hidróxido de calcio y un 68% de los tratados con gutapercha. Los autores reportan también un descenso significativo en el recuento bacteriano, tanto de aerobios como de anaerobios (Pinto et al. 2006).

Marchi y colaboradores concluyen que hay un aumento en la mineralización tras realizar protección pulpar indirecta, independientemente del material usado, tras realizar un análisis de 13 molares primarios tratados con protección pulpar indirecta, y compararlos con 15 molares primarios sin caries a modo de control positivo, y otros 15 con caries profundas no tratadas. Hallaron un incremento de la dureza en todos los dientes tratados, obteniendo una media de 40 KHN (número de dureza knoop), respecto a 62 KHN en los dientes sin caries y 19 KHN en los dientes no tratados, pero sin diferencias significativas entre los tres grupos. También reportan los autores un cambio en la coloración hacia marrón oscuro en 4 de los 13 dientes (Marchi et al. 2008).

3. Reducción significativa de la microbiota tras el tratamiento

Al empezar el tratamiento, los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* son superiores a *Streptococcus Mutans* en dentición permanente (Hahn et al. 1991. Love y Jenkinson. 2002) y en dentición temporal son los *Streptococcus Mutans* superiores (Ayna et al. 2003. Orhan et al. 2008). Esto se debe a que las lesiones en dientes primarios tienen menor profundidad y mayor apertura, lo que permite la entrada de saliva que inunda las lesiones, permitiendo la difusión de oxígeno. Esto afecta al número de *Lactobacillus*, que son estrictamente anaerobios y altamente sensibles al cambio de pH (Ayna et al. 2003).

Tras el tratamiento se consigue una reducción en la población bacteriana de entre el 70 y el 100% (Aponte et al. 1966; Leung et al. 1980; Fairbourn et al. 1980) tanto de *Streptococcus Mutans* como de *Lactobacillus* (Bjørndal et al. 1997; Bjørndal y Thylstrup. 1998; Bjørndal y Larsen. 2000; Pinto et al. 2006).

Maltz y colaboradores encontraron un descenso drástico en los recuentos bacterianos, que implican disminución en la actividad metabólica tras el tratamiento, acompañado de un aumento en la densidad radiográfica, lo que es sugerente de remineralización, sin que haya diferencia entre dientes deciduos y definitivos en los recuentos bacterianos. (Maltz et al. 2002).

En un estudio (Orhan et al. 2008) se compara el descenso en recuentos bacterianos entre las distintas fases del tratamiento en dos visitas. Para ello diferencian la fase 1, que es cuando limpian toda la caries y colocan el recubrimiento, la fase 2 que es al reabrir pasados tres meses, antes de la excavación final, y la fase 3 que es tras la excavación final en la que se eliminan los restos de caries que puedan quedar. Los autores hallan que hay diferencia estadísticamente significativa en los recuentos bacterianos entre las fases 1 y 2, y entre las fases 1 y 3, pero no entre las fases 2 y 3, lo cual apoya la idea de que se debe realizar el tratamiento en una sola fase. Aponte (Aponte et al. 1966) cultivó la dentina entre 6 y 46 meses después del tratamiento con hidróxido de calcio y amalgama (media de 29 meses), hallándola estéril en el 93% de los casos.

Los autores Bjørndal y Larsen (2000) obtuvieron resultados similares. Realizaron protección pulpar indirecta en nueve dientes, reabriendo las cavidades entre cuatro y seis meses después de la excavación inicial, tomando muestras de la dentina con una cucharilla estéril, antes y después de la excavación en ambas ocasiones. En la excavación inicial encontraron una dentina blanda y amarillenta, con una flora característicamente cariogénica, con alta presencia de *Lactobacillus* y *Streptococcus Mutans*. Al reabrir las cavidades la dentina era de un color marrón oscuro, una consistencia más dura, el recuento bacteriano era significativamente menor, y la flora había cambiado cualitativamente a una menos cariogénica. La conclusión de los autores es que se detuvo el progreso de la lesión cariosa al aislar las bacterias de nutrientes.

En los estudios consultados, el escaso fracaso obtenido, se relacionaba con la presencia de radiolucidez apical o en furca, fracaso en la restauración o reabsorción interna, principalmente en el periodo de 15 a 36 meses tras el tratamiento, en muchas ocasiones cuando la exfoliación del diente estaba próxima (Falster et al. 2002; Franzon et al. 2007).

3.5. Factores de éxito

Hay una serie de condiciones que van a maximizar el éxito del tratamiento. La primera es realizar un buen diagnóstico, pues en muchas ocasiones el fracaso de la protección pulpar indirecta viene de no haber detectado signos de pulpitis irreversible (Fuks. 2008).

La siguiente condición para un resultado óptimo es eliminar toda la caries de las paredes y márgenes de la cavidad (Mertz-Fairhurst et al. 1998; Falster et al. 2002). El hecho de que conservemos una última capa de dentina afectada, requiere que aislemos de nutrientes a esas pocas colonias bacterianas remanentes, y para ello debemos eliminar muy bien toda la caries de las paredes y suelo de la cavidad, evitando la exposición pulpar mediante el uso de cucharillas e instrumental rotatorio a baja velocidad (Coll. 2008), dándole así a las células pulpares la oportunidad de remineralizar esa última capa de dentina.

El tipo de cavidad también es determinante, pues la tasa de éxito es muy superior en cavidades de clase I (Kassa et al. 2009). Los autores llegaron a tal conclusión al realizar un

estudio histológico de 83 molares primarios extraídos por motivos ortodóncicos o por caries, donde vieron que los dientes primarios con caries proximales que afectan a más del 50% del espesor de la dentina presentan una reacción inflamatoria pulpar más extensa que si la localización de la caries es oclusal.

El éxito a largo plazo requiere una restauración adecuada, que selle marginalmente la cavidad, evitando la re-entrada de bacterias (Witherspoon. 2008). En un entorno libre de bacterias, la pulpa ha demostrado la capacidad para curar y secretar dentina terciaria, en cambio en presencia de bacterias la pulpa degenera inevitablemente (Kakehashi. 1966).

Además, según los hallazgos en un estudio a diez años de Mertz-Fairhurst y colaboradores (1998) comentado anteriormente, se puede detener la progresión de la caries sellando marginalmente la cavidad. Para los autores esto es debido a que una vez se elimina la mayoría del tejido infectado y se sella adecuadamente la cavidad, las colonias bacterianas restantes quedan aisladas y dejan de proliferar, y la pulpa inicia la formación de dentina reparativa.

En cuanto al mejor material para la restauración, se considera que el IRM restaura pobremente el diente permitiendo las microfiltraciones, aunque pasados seis meses se le coloque una corona de acero, siendo preferibles las restauraciones adhesivas (Bartherl et al. 1999) o las coronas de acero colocadas inmediatamente.

Las coronas de acero resultan ser un factor muy importante en el éxito a largo plazo por el buen sellado que producen, cementadas con compuestos de policarboxilato de zinc, cuando se colocan en dientes primarios (Innes et al. 2007). A parte de la elección del material, debemos preocuparnos de prepararlo según las recomendaciones del fabricante, respetando la ratio polvo/líquido y los tiempos de trabajo para que un buen material conserve sus propiedades (Anderson et al. 1990).

3.6. Materiales

Para algunos autores, el éxito del tratamiento no sólo depende del material utilizado, sino de que la cavidad quede adecuadamente sellada de las microfiltraciones, se haya eliminado convenientemente la caries infectada respetando la última capa de dentina desmineralizada, y no se provoque la exposición pulpar (Falster et al. 2002; Marchi et al. 2008). En ciertos estudios incluso se comparó el uso de bases de hidróxido de calcio con un material inerte como gutapercha (Pinto et al. 2006; Franzon et al. 2007), o con resinas adhesivas (Falster et al. 2002), y hallaron que el éxito del tratamiento era independiente del material utilizado sobre la dentina desmineralizada.

Esto no impide que debamos utilizar el material más adecuado a nuestro propósito, y que elijamos el que reúna las mejores cualidades. Costa enumeró las siguientes propiedades que debía tener una base cavitaria ideal (Costa et al. 2007):

- Modulo de elasticidad similar al de la dentina.
- Adhesión química y micromecánica a la dentina.
- Acción antibacteriana.
- Resistencia mecánica a las fuerzas oclusales.
- Copolimerización con el material restaurador.
- Baja solubilidad.
- A las que podríamos añadir
- Radiopacidad, para poder ser visualizado en las radiografías.
- Promoción de la curación y reparación dentinaria.
- Material biocompatible, inocuo con el tejido pulpar y estructuras vecinas.

Los materiales más utilizados a lo largo de los años han sido óxido de zinc-eugenol e hidróxido de calcio puro, que es el que presenta más cualidades para este tipo de tratamiento. El hidróxido de calcio es antiséptico debido a su elevado pH y promueve la curación con formación de dentina secundaria, aunque hemos de ser cuidadosos pues tiende a estimular actividades odontoclásticas con riesgo de reabsorción radicular interna

en dientes temporales próximos a la exfoliación. La técnica con hidróxido de calcio puro obligaba a realizar el tratamiento en dos tiempos, pues requería una re-entrada para eliminarlo y restaurar con un material definitivo.

Adhesivos dentinarios en protección pulpar indirecta

Una alternativa a la protección pulpar indirecta tal como la hemos comentado hasta ahora, sería la aplicación directa sobre la dentina hipomineralizada de adhesivo dentinario, bien autograbante o bien con un grabado ácido previo de la dentina, y una restauración de composite. Aunque para muchos autores no es una opción a tener en cuenta por diversos motivos.

Se ha encontrado una pérdida significativa de adhesión respecto a la dentina sana (Nakajima et al. 1999), por lo que uno debe cuestionarse la capacidad del material restaurador para mantener la integridad del sellado y evitar la invasión por bacterias (Goldberg. 2008).

A parte de por la adhesión, las resinas usadas en adhesivos y composites son consideradas un material tóxico en las proximidades de la pulpa (Modena et al. 2009). Los estudios *in vivo* muestran que el uso de resinas puede ocasionar irritación y necrosis pulpar (Stanley et al. 1975), así como del tejido periodontal (Nasjleti et al. 1983).

Ciertos componentes de adhesivos y composites, como son bisfenol glicidil metacrilato (Bis-GMA), dimetacrilato de uretano (UDMA), dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) han mostrado ser citotóxicos cuando se ponen en contacto con fibroblastos de mamíferos, siendo los más citotóxicos Bis-GMA y UDMA, pues causaban efectos irreversibles en el metabolismo celular. (Hanks et al. 1991). Los agentes adhesivos también contienen canforoquinona, un fotoiniciador del que se sabe que genera radicales libres incluyendo especies reactivas de oxígeno, que provocan efectos citotóxicos y mutagénicos (Huang y Chang. 2002).

Estos componentes se solubilizan cuando no se polimerizan adecuadamente y son capaces

de difundir a través de los canales dentinarios y llegar al espacio pulpar, en proporción directa al peso molecular de dichos monómeros (Bouillaguet et al. 1996). Esta mala polimerización puede ser debida a un escaso tiempo de fotopolimerización, la presencia de humedad y edema proveniente de la proximidad pulpar, la presencia de saliva que los degrada mediante la esterasa (Freund y Munksgaard. 1990), así como el oxígeno, que también inhibe la completa polimerización (Gerzina y Hume. 1996).

Algunos autores han llegado a la conclusión de que incluso tras una correcta polimerización, las resinas pueden disolverse hacia el medio en forma de monómeros reactivos que alteran los procesos metabólicos celulares (Geurtsen y Leyhausen. 2001; Lefeuvre et al. 2005).

En consecuencia, las partículas reactivas de monómero pueden difundir a través de los túbulos hasta la pulpa, o directamente en el sitio de la exposición cuando la haya, causando toxicidad a las células pulpares (Pashley. 1988), y respuesta inflamatoria persistente mediada por macrófagos y células gigantes (Costa et al. 2000).

Distintos autores han estudiado los mecanismos moleculares que conducen al daño celular por parte de las resinas, estableciendo los siguientes:

- Inhibición de la síntesis lipídica y crecimiento celular (Lefeuvre et al. 1996).
- Fosforilación de la tirosina intracelular (Kaga et al. 2001).
- HEMA Y TEGDMA suprimen la expresión de la proteína HSP 72 (heat shock protein) (Noda et al. 2002).
- TEGDMA induce al daño mitocondrial (Lefeuvre et al. 2005).

Cuando este material se aplica directamente sobre la pulpa, no aparece formación de barrera dentinaria, sino que hay una reacción a cuerpo extraño persistente adyacente a la zona de la exposición (Akimoto et al. 1998) que puede durar hasta 180 días (Pereira et al. 2000).

Estudios *in vivo* han demostrado que la aplicación de resinas sobre una capa de dentina

menor de 0,5 mm causa dilatación y congestión de vasos sanguíneos, así como respuesta inflamatoria crónica en la pulpa, desplazamiento de odontoblastos y sensibilidad pulpar (Ferracane y Condon. 1990). Esta reacción interfiere con los procesos curativos de la pulpa, lo que supone que este material no es biocompatible (Costa et al. 2000).

Algunos autores apoyaron la hipótesis de que la pulpa puede curar tras colocar restauraciones adhesivas en cavidades muy profundas, o incluso exposiciones pulpares, siempre que se pudiese controlar la hemorragia (Onoe et al. 1996), y se consiguiese un sellado adecuado de la restauración contra la infiltración bacteriana. Sin embargo, otros estudios *in vivo* e *in vitro* muestran una gran citotoxicidad de los materiales con resinas en proximidades de la pulpa (Pereira et al. 2000).

Hay una gran diferencia entre la respuesta pulpar a los tratamientos con sistemas adhesivos, respecto a aquellos que se realizan con materiales con elevado pH como hidróxido de calcio o MTA. A corto plazo, los dientes tratados con adhesivos dentinarios exhiben distintos grados de inflamación con predominio de células inflamatorias mononucleadas, y la capa de odontoblastos subyacente a la lesión es discontinua o ausente, lo que indica baja tolerancia a estos materiales. En cambio, con hidróxido de calcio, se encontró migración y diferenciación de pseudo-odontoblastos a los nueve días de realizar el recubrimiento. Además, se conservaba la capa de odontoblastos adyacente, así como la zona acelular de weil y la zona rica en células, y otras estructuras más profundas de la pulpa. Estos son signos tempranos de la buena curación a largo plazo, con formación de un puente de dentina (Pereira et al. 2000).

Los ionómeros de vidrio modificados con resina representan una alternativa, y presentan una alta tasa de éxito clínico cuando se utilizan en protección pulpar indirecta. Ofrecen mejores características mecánicas y fácil manejo cuando las comparamos con los ionómeros de vidrio convencionales, y además han sido propuestos y evaluados como material restaurador para dientes temporales (Marchi et al. 2006; Wambier et al. 2007).

3.6.1. Ionómeros de vidrio

Fueron descubiertos por Wilson y Kent en 1972 y representan una particular categoría de

Introducción

material bioactivo formado por la reacción ácido-base de un polvo de vidrio, fluoraluminosilicato con una solución acuosa de polímeros ácidos. Originalmente se le dio el nombre de ASAP (Silicato de Aluminio y Poliacrilato).

En 1980 se introdujeron los ionómeros de vidrio de segunda generación (Ketac Cem, Fuji II), que mejoraban las propiedades de estabilidad y solubilidad de los ionómeros originales. A lo largo del tiempo se les añadieron distintos compuestos para mejorar sus cualidades, como la plata sinterizada con la intención de reforzarlos, y se obtuvo el cemento tipo Cermet.

En cambio, fue la adición de resina en el año 1990 la que supuso el cambio más significativo. Se incorporó Hidroxietil metacrilato (HEMA) e iniciadores de la polimerización, formando así los llamados ionómeros de vidrio modificados con resina, que son fotopolimerizables (Wilson. 1990).

La resina le confiere al material mejor fraguado y mejores propiedades mecánicas (Xie et al. 2000), mientras que mantiene la liberación de flúor (Mitra. 1991).

El fraguado de los ionómeros de vidrio fotopolimerizables consiste en dos reacciones básicas: una reacción ácido-base como en los ionómeros tradicionales que resulta en una matriz compuesta por sales y una polimerización libre de radicales de los monómeros, tal y como sucede en los composites (Yiu et al. 2004).

El uso de los ionómeros de vidrio es muy amplio y se pueden usar tanto como material de obturación en cavidades pequeñas (Croll y Nicholson. 2002), como base bajo restauraciones, y como cemento estético de coronas y puentes.

Cualidades

Su uso ha ido en aumento, debido a sus buenas propiedades mecánicas y químicas:

- Alta insolubilidad intraoral (Mitchem y Gronas. 1978).

- Adhesividad a esmalte, dentina y metal (Hotz et al. 1977). Esta capacidad de adhesión se favorecerá cuando el material se ubique en cavidades libres de contaminación proveniente de la saliva, viéndose aumentada en caso de realizar un grabado ácido previo a la colocación, aunque este no es del todo recomendable en las proximidades de la pulpa (Ali y Maroli. 2012).
- Liberación de flúor, que forma cristales de fluorapatita que refuerza la estructura del diente y favorece la remineralización (Tantbirojn et al. 2009).
- Capacidad anticariogénica (Tyas et al. 1991). Tyas (1991) realiza un estudio a cinco años en el que compara la filtración por caries de cavidades de clase V restauradas con ionómero de vidrio autopolimerizable respecto a otras restauradas con composite, sobre un total de 132 dientes. El autor llega a la conclusión de que el ionómero de vidrio tiene capacidad anticariogénica al hallar que el 6% de las cavidades con composite se habían filtrado, respecto al 1% de las restauradas con ionómero de vidrio.
- Reducción de la contracción de polimerización. Los ionómeros de vidrio disminuyen el estrés de contracción de los composites, suponiendo una mejor respuesta al ubicarlo bajo una restauración. Además, los ionómeros de vidrio tienen un coeficiente de expansión térmica similar al del diente (Browning. 2006).
- Sellado marginal de la restauración evitando la filtración (Croll. 2004).
- Alta radiopacidad debida a la presencia de pequeñas cantidades de estroncio o bario.
- Manipulación simple y segura.

La combinación de buena adhesividad, debida a las interacciones del ácido con la hidroxiapatita (Yoshida et al. 2000), el efecto cariostático mediante la liberación de flúor y la sensibilidad postoperatoria mínima, convierten al ionómero de vidrio en un buen material para uso clínico (Tantbirojn et al. 2009). Se supone que el flúor presente en pastas de dientes y nutrientes recarga el material y evita que el ionómero se vuelva poroso (Goldberg. 2008).

La restauración de composite con base de ionómero de vidrio llamada “técnica en sándwich” (McLean y Wilson. 1977), emula la estructura y propiedades del diente. El ionómero de vidrio, con una buena adhesión y similar coeficiente de expansión térmica es sustituto de la dentina, el composite, más estético y duradero equivale al esmalte (Croll. 2004). Esta técnica cobró más importancia cuando se demostró en 1985 que el composite tenía la propiedad de adherirse al ionómero de vidrio cuando este era grabado (Sneed y Looper. 1985).

Como material restaurador, el ionómero de vidrio ofrece resultados satisfactorios en cavidades clase I y II, en seguimientos a tres años (Donly et al. 1999. Fuks et al. 2000. Croll et al. 2001) e incluso se ha descubierto la formación de una capa híbrida “modificada” en la interfase ionómero/dentina cariada en dientes primarios (Ribeiro et al. 1999), aunque eso no evita que esta unión sea más débil respecto a la que se forma con dentina sana (Nakajima et al. 1995; Xie et al. 1996).

La técnica para utilizar los ionómeros de vidrio no cambia en protección pulpar indirecta, pues la presencia de dentina hipomineralizada en el suelo cavitario no modifica el protocolo para la restauración con resinas (Ribeiro et al. 1999), siempre que el margen cavitario esté ubicado en esmalte libre de caries, donde la restauración va a producir un buen sellado para mantener la salud pulpar al asegurar un control frente a la microfiltración (Perdigão et al. 1996).

Efecto cariostático

De las cualidades mencionadas previamente, la más determinante en protección pulpar indirecta son aquellas que favorecen la remineralización de la dentina afectada, e impiden que las bacterias remanentes proliferen.

Los cementos de ionómero de vidrio poseen la habilidad de inhibir la desmineralización y favorecer la remineralización mediante la liberación de iones de flúor al tejido dental adyacente (Mitra. 1991; Donly y Grandgenett. 1998). Los ionómeros han demostrado inhibir el crecimiento de bacterias cariogénicas en la placa dental próxima y en las bacterias remanentes bajo la restauración (Kreulen et al. 1997), y provocar menor

desmineralización en el esmalte adyacente que el composite tras un mes (Haveman et al. 2003).

Tantbirojn y colaboradores elaboraron un estudio en el que comparaban una restauración de clase II con composite sin usar una base de ionómero de vidrio, con cinco dientes en que se realizaba la misma cavidad, pero se restauraba con composite y una base de ionómero de vidrio modificado con resinas, que sellaba el margen interproximal de la cavidad. Este tipo de restauración es una modificación de la técnica en sándwich, y se llama en sándwich abierto (Jordan et al. 1981). En el estudio se introdujeron los dientes preparados en ácido láctico durante tres semanas para emular la desmineralización sufrida por el metabolismo bacteriano, hallando que la presencia de ionómero de vidrio inhibía la desmineralización en un área de entre 0,25-1mm desde el margen de la cavidad (Tantbirojn et al. 2009).

En general, la respuesta clínica de los ionómeros de vidrio se considera muy aceptable. Felton (1991) realizó un estudio *in vivo* sobre 71 dientes de mono en los que preparó cavidades de clase V. En el fondo de la cavidad colocó un ionómero de vidrio, diferenciando cuatro grupos, según fuese auto o fotopolimerizable, y con o sin grabado ácido, restaurando posteriormente la cavidad. Obtuvo unas respuestas pulpares excelentes, aunque con mayor adhesión de los fotopolimerizables, al constatar la ausencia de gap.

Desde que se empezaron a desarrollar los ionómeros de vidrio, su biocompatibilidad ha sido estudiada altamente *in vivo* e *in vitro* (Hume y Mount. 1988; Felton et al. 1991; Tarim et al. 1994; Consiglio et al. 1998; Schweikl et al. 2007).

Se han identificado varios factores que van a influir en la biocompatibilidad, como son:

- Liberación de flúor (Sasanaluckit et al 1993).
- Cambios en pH (Smith y Ruse. 1986).
- Monómeros de HEMA (Bruce et al. 1993; Ratanasathien et al. 1995).

Ionómero de vidrio autopolimerizable

El ionómero de vidrio autopolimerizable se presenta como polvo-líquido que polimeriza al mezclarlos.

La composición del polvo es fundamentalmente cristales de sílice (SiO_2), alúmina (Al_2O_3), fluoruro cálcico (CaF_2), aluminio y sodio, fundidos a más de 1100°C y triturados hasta resultar un polvo fino. También incorporan pequeñas cantidades de estroncio, plata o bario para conferirle radiopacidad. El tamaño de partícula es de entre 13 y 19 μm en los que se usan para cementado, a fin de conseguir un espesor fino, y de 20-50 μm en los que se usan como base.

El líquido es una solución acuosa de ácido poliacrílico itacónico y ácido maleico, que presentan muchos grupos carboxilo (COOH), en la cual los ácidos representan un 50% de la solución aproximadamente. El líquido también incorpora un acelerador de la reacción, el ácido tartárico, que aumenta la extracción de iones de las partículas de polvo.

La reacción de fraguado se inicia cuando los ácidos atacan la superficie de los cristales de vidrio, liberándose cationes de calcio y aluminio, e iones de fluoruro, formándose una matriz y el aparente fraguado inicial del ionómero, en los primeros minutos. A partir de los cinco minutos, hasta aproximadamente veinticuatro horas, se produce una segunda fase, en la que esta matriz se une al relleno en un entorno acuoso, que sirve de transporte a los iones.

A parte de las buenas propiedades comentadas previamente para los ionómeros de vidrio, los autopolimerizables cuentan a su favor con unos resultados favorables de biocompatibilidad, cuando se ha estudiado su toxicidad en cultivos celulares (Consiglio et al. 1998), o en ensayos *in vivo* (Felton et al. 1991).

En un ensayo de biocompatibilidad se comparó el efecto de varios materiales sobre una línea celular de epitelio gingival humano, y para ello, elaboraron un índice que relacionaba tiempo y distancia de la citotoxicidad respecto a un control no tóxico. Entre los materiales

se encontraba un ionómero de vidrio autopolimerizable (Ketac Cem), que según los autores obtuvo el mejor resultado, un cemento de silicato y distintos tipos de composite (Kasten et al. 1989).

En un ensayo para evaluar la biocompatibilidad del Ketac Bond, los autores concluyen que tiene una respuesta aceptable, tras comprobar la ausencia de irritación crónica a los 90 días de realizar un test de implantación subcutáneo, usando como control un cemento de óxido de zinc-eugenol (Beer et al. 1990).

En otro estudio *in vivo* e *in vitro* llegan a la misma conclusión tras comparar tanto la implantación en hueso de rata en periodos de ocho semanas, como la respuesta de cultivos celulares mediante la prueba del MTT, de diversos ionómeros de vidrio autopolimerizables, y compararlo con un fotopolimerizable. Los autores observaron que con los ionómeros de vidrio autopolimerizables proseguía el crecimiento celular de los cultivos, así como la formación de hueso en los tejidos implantados (Sasanaluckit et al. 1993).

Doherty (1991) considera que el flúor es el responsable del posible efecto citotóxico en los ionómeros de vidrio autopolimerizables. El autor llega a esta conclusión tras comparar mediante el ensayo de MTT la biocompatibilidad de un ionómero de vidrio autopolimerizable antes y después de retirarle el flúor.

Frente a estas buenas propiedades, los ionómeros de vidrio convencionales también tienen ciertas limitaciones como materiales restauradores. Tienen malas propiedades físicas pues su fraguado es lento, es un material muy soluble (Mount. 1994) y es susceptible a la deshidratación (Cho et al. 1995).

Ionómero de vidrio fotopolimerizable

Los ionómeros de vidrio fotopolimerizables tienen una composición similar a la de los autopolimerizables, pero presentan resinas fotosensibles. La polimerización de los

ionómeros de vidrio modificados con resinas consiste en una reacción ácido-base inmediata y una reacción lenta de copolimerización de metacrilato iniciada por los radicales libres.

La presencia de estas resinas en la composición de los ionómeros de vidrio de segunda generación les confiere mayor fuerza a la flexión y tensión, mejor módulo elástico y mayor resistencia al desgaste (Xie et al. 2000). Además han demostrado ser más tolerantes con la humedad y mejoran el sellado en condiciones poco favorables (Friedl et al. 1995).

Los ionómeros de vidrio modificados con resinas presentan una mínima sensibilidad postoperatoria que hace que sean muy prácticos en clínica (Browning. 2006) y esto es debido a dos características: son autoadhesivos por lo que no requieren grabado ácido previo a su colocación, y amortiguan la contracción de polimerización del composite (Alomari et al. 2001).

La adhesión química se produce mediante la unión iónica carboxilada entre el ácido polialquénico metaacrilado con la hidroxiapatita, unión que ha sido demostrada mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (Fukuda et al. 2003) y se ha confirmado mediante un estudio con microscopio electrónico de barrido y espectrometría de fotoelectrones que se mantiene a largo plazo (Mitra et al. 2009), mientras que la habilidad de estos materiales para adherirse micromecánicamente y formar capas híbridas se demostró mediante estudios de microscopía óptica (Watson et al. 1998).

Esta unión contribuye a la excelente adhesión a largo plazo, resistencia a la microfiltración y habilidad para sellado dentinario (Prati et al. 1991). En un estudio (Mitra et al. 2009) se observa al microscopio una zona amorfa, de unas micras de grosor que indica una interfase intacta, a modo de capa híbrida y que parece originada por una reacción del ionómero con material inorgánico de la dentina descrito como adhesión basada en la difusión. Se ven estructuras ciliares que conectan la zona amorfa con la dentina que parecen originadas por la resina que penetra en los túbulos dentinarios.

Mount describió una capa enriquecida de iones que se origina por el desplazamiento de iones de calcio y fosfato desde la apatita hacia el grupo carboxilo del ionómero de vidrio, y reprecipitan en la interfase cemento-diente al fraguar el cemento (Mount. 2005).

Tras batir el material, se inicia una reacción dual que se caracteriza por polimerización libre de radicales asociada con una reacción ácido-base que persiste tras la activación por luz. Esta continua reacción conlleva a la precipitación de minerales formando sales que ocluyen los túbulos dentinarios, lo cual explica que en cavidades profundas no transfundan residuos (Tay et al. 2004). Además, como no requiere grabado ácido, se mantiene el barrillo dentinario, que previene de la transfusión de fluido intratubular, que humedecería la dentina. Esto supone también una ventaja porque el contacto de esta dentina húmeda con el ionómero de vidrio inhibiría la polimerización y aumentaría la toxicidad pulpar (Costa et al. 2007). Los ionómeros de vidrio fotopolimerizables presentan la ventaja de que liberan una mayor cantidad de flúor que los autopolimerizables, y muestran una zona inhibida mayor (Tantbirojn et al. 2009).

Todas estas propiedades han hecho que se hayan propuesto como un buen material tanto para recubrimiento pulpar como para la restauración definitiva en dentición primaria.

En cambio, estas cualidades clínicas tan favorables no se corresponde con los estudios de toxicidad *in vitro* realizados, pues se ha demostrado que los odontoblastos degeneran y se destruyen en estadios muy tempranos, y más rápido que con otros materiales estudiados (Tarim et al. 1994; Oliva et al. 1996; Stanislawski et al. 1999; Goldberg. 2008).

Thonemann y colaboradores (2002) realizaron un ensayo de toxicidad *in vitro* sobre distintos cultivos celulares, incluyendo la línea celular L-929 de fibroblasto de ratón, cultivos primarios de células derivadas de papila dental bovina, y líneas celulares inmortalizadas derivadas de estos mismos cultivos primarios. Los autores obtuvieron unas tasas altas de citotoxicidad similares entre los distintos cultivos.

En un ensayo *in vivo* e *in vitro* (Souza et al. 2006), se evalúa la biocompatibilidad de tres cementos de ionómero de vidrio fotopolimerizable. Para ello aplican un medio de cultivo

en que se habían incubado los distintos cementos, sobre la línea celular MDPC-23, y miden el efecto mediante la prueba del MTT. Además realizan un test de implantación subcutáneo en ratas que biopsian a los 7, 30 y 90 días. Los autores reportaron la presencia de efectos citotóxicos en los cultivos celulares con los tres cementos, especialmente con vitrebond, y una respuesta inflamatoria intensa a los siete días, que en la mayoría de los casos había desaparecido a los 90 días.

Nicholson y Czarnecka (2008) revisan más de 50 artículos sobre la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio fotopolimerizables y concluyen que no pueden ser considerados biocompatibles.

A la misma conclusión llegan los autores de un ensayo de toxicidad sobre líneas celulares de fibroblasto de ratón (NIH3T3) y osteoblasto (UMR-106) en que comparan ionómeros de vidrio convencionales con ionómeros de vidrio modificados con resina, encontrando especialmente citotóxico al Vitrebond (Selimović-Dragaš et al. 2012).

Esto se explica por la presencia de grupos HEMA (hidroxietilmetaacrilato) en la estructura del ionómero de vidrio fotopolimerizable (Goldberg. 2008), más que a otros compuestos también liberados como flúor, aluminio, plata, silicio, estroncio, zinc y silicato que están presentes en los ionómeros convencionales sin por ello representar citotoxicidad (Costa et al. 2003⁽²⁾). Dicho autor y colaboradores llegaron a esta conclusión tras realizar un ensayo clínico sobre la línea celular MDPC-23 en que comparaban cinco ionómeros de vidrio auto y fotopolimerizables, con un control positivo (composite z-100) y una solución salina como control negativo. Tras realizar el análisis estadístico obtuvieron que los ionómeros de vidrio modificados con resina eran más tóxicos, a pesar de que los ionómeros de vidrio convencionales también disminuyeron el número de células y el metabolismo celular.

Debido a que el HEMA es hidrofílico y presenta un bajo peso molecular (Aranha et al. 2006), difunde a través de los tubulillos dentinarios hasta llegar a la pulpa, lo que provoca una irritación que hace que aumente la vascularización, y la pulpa se muestra hiperémica en los estadios tempranos. Esta hiperemia se continua en el tiempo con fibrosis, que va a ser correlativa al aumento de vascularización, y producción de dentina reparativa en forma

de pequeños puentes y capas. Esto se puede deber a que las resinas de uso dental liberan monómeros que afectan al ciclo celular, y provocan efectos clastogénicos (Schweikl et al. 2001).

No sólo el HEMA es responsable de esa toxicidad, también TEGDMA y el ácido poliacrílico han sido identificados como citotóxicos, así como la posibilidad de que algunos compuestos como hierro o aluminio puedan aumentar la cascada de citotoxicidad (Stanislawski et al. 1999). Stanislawski y colaboradores concluyen que el trietilenglicol dimetraacrilato provoca una alta citotoxicidad y produce especies reactivas de oxígeno en un ensayo clínico sobre cultivos primarios de fibroblastos pulpares y gingivales humanos. Para los autores, estos radicales libres podrían ser neutralizados mediante antioxidantes como ascorbato, trolox o N-acetilcisteína, añadiéndolos a la composición del material.

Esta citotoxicidad es inversamente proporcional al grosor de la dentina remanente entre la cavidad y la pulpa (Aranha et al. 2006), estando por ello desaconsejada la aplicación de ionómeros de vidrio modificado con resina directamente sobre la exposición pulpar cuando se realiza una protección pulpar directa (Lan et al. 2003).

3.6.2. Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio es un material ampliamente usado en estado puro, en suspensión y en forma de cemento. El hidróxido de calcio puro es un polvo con un valor muy elevado de pH, que le confiere una gran capacidad antiséptica, y promueve la secreción de dentina terciaria que favorece la curación tisular (Yoshida et al. 1994).

La primera formulación de hidróxido de calcio en odontología fue introducida por Hermann en 1920 (Dammachke. 2008). Es un material que ha sido muy estudiado y se ha considerado durante muchos años como el material de elección para tratamientos conservadores de la pulpa a causa de su potencial biológico y reparativo (Demarco et al. 2001; Weiner. 2002). Su uso se basa en la evidencia histológica de su funcionamiento, pues se emplea para tratar perforaciones iatrogénicas, curar lesiones perirradiculares, favorecer el cierre apical en dientes inmaduros, detener la reabsorción radicular y

estimular la formación de un puente dentinario en lesiones cariosas profundas (Modena et al. 2009).

Su aplicación como recubrimiento pulpar se debe principalmente a dos cualidades: su elevado pH esteriliza la dentina hipomineralizada, eliminando a las colonias bacterianas remanentes, y promueve la curación pulpar mediante la formación de un puente de dentina reparativa.

Muchos estudios muestran la recuperación y formación de una barrera de tejido mineralizado cuando el tejido pulpar es recubierto directamente con cualquiera de las formulaciones de hidróxido cálcico. En la práctica, la presencia de una barrera de tejido duro se considera un éxito, pues proporciona una protección natural contra la filtración bacteriana (Holland et al. 1979), y es un signo de la buena recuperación de la pulpa, representada por la actividad de sus odontoblastos (Stanley y Pameijer. 1997).

El hidróxido de calcio no es bioestimulador ni biocompatible, de hecho, debido a su pH mata cualquier célula que entre en contacto con él (Fridland y Rosado. 2005). Al ser aplicado en las proximidades de la pulpa, podría provocar una cauterización de grosor variable (Holland. 1971; Tronstad et al. 1980), que genera la reacción de diferenciación de células pulpares indiferenciadas a neo-odontoblastos, los cuales forman una barrera dentinaria en la zona afectada (Pereira et al. 1980) como mecanismo de defensa frente a la naturaleza irritante del hidróxido de calcio (Goldberg et al. 2003. Almushayt et al. 2006).

Estudios clásicos de microscopía muestran que el hidróxido de calcio produce una necrosis superficial y forma carbonato cálcico, cuyos glóbulos actúan inicialmente como un núcleo de calcificación distrófica, justo encima de la zona granular, donde los pseudo-odontoblastos se diferencian y organizan para producir dentina (Holland. 1971; Pereira et al. 1980). Según los hallazgos de Yoshida y colaboradores (1994), esta diferenciación de las células pulpares a odontoblastos está mediada por fibronectina, que se asocia con la capa calcificada que se forma inicialmente, tras colocar el hidróxido de calcio.

Otros autores opinan que el elevado pH del hidróxido de calcio solubiliza y libera ciertas proteínas y factores de crecimiento (TGF- β) de la dentina (Hebling et al. 1999). El pH

alcalino neutraliza el ácido láctico y previene la destrucción dentinaria, y actúa también como buffer con las reacciones ácidas producidas por el proceso inflamatorio (Heithersay. 1957). Por contra, se han probado otros materiales con alto pH como hidróxido de bario y fosfato cálcico sin obtener buenos resultados (Mitchell y Shankwalker. 1958). La evidencia es que tiene un alto potencial biológico y curativo (Demarco et al. 2001).

Los efectos beneficiosos de los recubrimientos de hidróxido de calcio son dependientes de su disociación en calcio e iones hidroxilos. Esto causa una alta alcalinidad, que tiene efecto bactericida y que va a activar a la trifostato adenosina, que acelera la remineralización de dentina (Simon et al. 1995) formando un puente dentinario en el área afectada.

Como desventaja, presenta que el proceso de remineralización provoca la formación de defectos en túnel que suponen una discontinuidad, lo que permitiría la entrada de contaminantes orales, en caso de que se filtre la interfase restauración-diente (Stanley y Pameijer. 1997). Los túneles no son causados por el hidróxido de calcio en sí, sino que son una consecuencia del trauma causado y de la cantidad de vasos dañados por la lesión.

También se han observado inclusiones celulares situadas entre la zona de necrosis coagulativa y la zona calcificada (Pereira et al. 2000). Esto provoca que en ocasiones las bacterias puedan invadir el tejido pulpar llevando a inflamación y necrosis pulpar (Stanley y Pameijer. 1997).

Además tiene propiedades físicas deficientes, siendo soluble en agua y ácido, esto lo convierte en un material inestable que puede migrar hacia la pulpa y provocar una necrosis que interfiera con los procesos biológicos reparativos. La falta de adhesión química o mecánica, y la disminución de adhesión de la restauración también son aspectos que han desfavorecido el uso del hidróxido de calcio puro en el fondo cavitario (Cox et al. 1999).

Estas propiedades se estudiaron originalmente para su utilización en protección pulpar directa, aunque también nos afectan al usar el hidróxido de calcio en protección pulpar indirecta, por la presencia de humedad en la dentina. Los primeros cementos de hidróxido de calcio autopolimerizables mejoraron esas propiedades físicas, pero no consiguieron ser

del todo insolubles, lo cual provoca unas mayores tasas de filtración marginal y de citotoxicidad.

En un ensayo de citotoxicidad sobre cultivos primarios de células pulpares se comparó un cemento de hidróxido de calcio autopolimerizable (Dycal) con dos composites fotopolimerizables (Furey et al. 2010). A parte, en este estudio también se quería valorar la influencia de seis factores de crecimiento sobre la resistencia de las células a la toxicidad de los materiales. Los autores obtuvieron un 40% de muerte celular causada por los composites, que se veía mejorada por la presencia de los factores de crecimiento, frente a un 80% de muerte celular al exponer los cultivos al hidróxido de calcio autopolimerizable, siendo los factores de crecimiento incapaces de mejorar esa tasa.

Camargo y colaboradores (2009) realizaron un ensayo de toxicidad sobre una línea de células pulpares humanas, y además midieron la generación de especies reactivas de oxígeno. En este estudio se comparan varios materiales: un cemento de hidróxido de calcio, MTA y aceite de ricino, que es una resina natural de poliuretano, hallando que el hidróxido de calcio es más citotóxico que los otros, disminuyendo la viabilidad celular, pero sin que eso supusiese la aparición de efectos genotóxicos causados por los radicales libres, como sí ocurre con los monómeros de resina.

Por contra, en otro estudio *in vitro*, Cavalcanti y colaboradores (2005) reportan que las sustancias que se liberan de los cementos de hidróxido de calcio son biocompatibles. Lo hacen al evaluar la respuesta de una línea celular al aplicarle medio de cultivo, en que se había incubado durante una hora hidróxido de calcio o adhesivo dentinario, utilizando como control medio de cultivo fresco.

Respecto a la filtración marginal, Murray y colaboradores (2003) elaboraron un ensayo clínico sobre 161 cavidades con exposición pulpar realizadas de forma estandarizada en dientes de primate mediante cavidades de clase V, y realizaron protección pulpar directa con tres materiales: ionómero de vidrio modificado con resina, composite e hidróxido de calcio, obturando estos últimos con óxido de zinc-eugenol. Evaluaron la presencia de bacterias mediante la tinción de McKay y la respuesta pulpar a lo largo de entre 7 y 720

días tras el tratamiento. El 47% de las cavidades tratadas con hidróxido de calcio sufrieron microfiltración bacteriana, frente a un 19.7% del composite y 21.1% del ionómero de vidrio. Las tasas de pulpitis irreversible o necrosis fueron de un 10.6%, 7.9% y 10.5% respectivamente.

Estas deficiencias han propiciado que se desarrollen los cementos de hidróxido de calcio fotopolimerizables, cuyas principales propiedades son:

- Proteger la pulpa de los irritantes químicos del material de restauración.
- Esterilizar el remanente de dentina afectada que queda en el fondo de la cavidad. La responsable de este efecto es la alta alcalinidad, pues *Streptococco* y *Staphylococco* sólo sobreviven en un entorno pH 3 a 8, y con los cementos de hidróxido de calcio el pH asciende hasta cerca de 10 en las primeras 24 horas (Subramaniam et al. 2006).
- Promover la remineralización de la dentina (Abbasi y Rahmat. 1987).
- Reducir la permeabilidad de la dentina.

Un inconveniente de los cementos de hidróxido de calcio es la disminución del pH respecto al hidróxido de calcio puro (Subramaniam et al. 2006). Este autor y colaboradores realizaron un estudio para comparar la evolución en el valor del pH a lo largo de una semana de cinco preparados comerciales de hidróxido de calcio: dos cementos de hidróxido de calcio autopolimerizable (Dycal y Calcimol), dos fotopolimerizables (Lime-Lite y Calcimol LC) e hidróxido de calcio puro. En todo momento el pH del hidróxido de calcio puro fue significativamente superior, próximo a 12, frente al pH 9-10 del resto de los compuestos.

En nuestro estudio valoramos la toxicidad y el pH de un cemento de hidróxido de calcio fotopolimerizable (Calcimol LC, Voco). Este cemento, además del hidróxido de calcio, contiene TEGDMA y UDMA, que como hemos visto anteriormente, son resinas con gran potencial citotóxico.

3.6.3. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita, cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es el principal componente inorgánico de esmalte, dentina y hueso (Boskey. 1997). Como biomaterial, es un material cerámico sintético de fosfato cálcico denso o poroso, con una estructura policristalina.

El fosfato de calcio es muy práctico para usos médicos pues presenta buenas características de biocompatibilidad, estabilidad química, osteoconducción y reabsorción y se puede obtener de forma sintética (Ginebra et al. 2010).

Se emplea como reemplazo de partes pequeñas de hueso, recubrimiento de implantes, relleno de defectos óseos de quistes y tumores y como liberador de medicamentos (Quintana. 1998), y también tiene aplicación en odontología.

La hidroxiapatita ha probado ser bioactiva y biocompatible como recubrimiento pulpar (Heller et al. 1975), como material de obturación de conductos radiculares (Pissiotis y Spanberg. 1990) y para reparar defectos óseos en periodoncia (Meffert et al. 1985).

Cuando se usa en tratamientos pulpares, los estudios histológicos muestran dentinogénesis alrededor del fosfato cálcico tras la amputación coronal (Boone y Kafrawy. 1979; Alliot-Licht et al. 1994). La reacción inflamatoria posterior al tratamiento pulpar y la formación de tejido mineralizado podría estar influenciado por el tamaño y la forma de las partículas.

Se da una mayor respuesta inflamatoria cuando las partículas son irregulares o tienen los bordes afilados, siendo ésta menor cuando son redondeadas (Misiak et al. 1984). Partículas demasiado pequeñas (menores de $40\mu\text{m}$) no dejan espacio para que las células migren entre ellas y se revascularice, por lo que el organismo las trata como un cuerpo extraño y las rechaza (Higashi y Okamoto. 1996). El tamaño de partícula ideal estaría entre las 100 y $300\mu\text{m}$, por tener un tiempo de reabsorción adecuado y mejorar la osteogénesis (Shapoff et al. 1980).

En nuestro estudio probamos una base cavitaria de hidroxiapatita (Fluoroseal, Dentaflux). Según el fabricante, la matriz es diuretano dimetracrilato, que le confiere una dureza a la compresión (PSI) de 20-25.000, a la tensión de 4-5.000, y una solubilidad en fluidos del 0,05%. Es compatible con composites, y aísla al diente de los estímulos térmicos y químicos, siendo totalmente resistente al grabado ácido. Libera flúor, lo cual favorece la remineralización de la dentina, y contiene sulfato de bario, para que sea radiopaco. Aunque no hemos encontrado literatura referente al fluoroseal, que confirme esta información.

4. BIOCAMPATIBILIDAD

Para utilizar un material en tratamientos pulpares debe ser biocompatible. La biocompatibilidad se define como la habilidad de un material para funcionar en una aplicación específica con una respuesta apropiada de huésped. Según la norma ISO 14971:2012, un material biocompatible debe estar libre de todo riesgo. Así, la biocompatibilidad de los materiales engloba diversos parámetros, como la citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, histocompatibilidad y la producción de efectos antimicrobianos (Hauman y Love. 2003).

Partiendo de la definición de biomaterial -material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo humano- podemos establecer que el estudio de biocompatibilidad es la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte de un tejido biológico huésped respecto al material estudiado (Wataha. 2001). Un material biocompatible no sólo debe promover la reparación tisular, sino que también debe ayudar o estimular la reorganización de tejidos dañados (Mantellini et al. 2003).

La biocompatibilidad consta de dos principios fundamentales: que el material en cuestión no presente efectos adversos a nivel local ni a distancia sobre los distintos órganos y tejidos, y que el entorno en que se insertan no modifique las cualidades que hacen útil al material.

Podemos definir cuatro tipos de biomateriales en función del tipo de respuesta que

generan al ser implantados:

- Fase 1 inerte: materiales inertes que generan poca o ninguna respuesta.
- Fase 2 interactivo: material implantable preparado para generar una respuesta específica y beneficiosa.
- Fase 3 viable: materiales implantables, posiblemente con incorporación de células vivas que rara vez serán remodelados o reabsorbidos.
- Fase 4 replante: materiales implantables consistentes de tejido nativo, extraído al paciente y cultivados *in vitro*.

En particular el medio oral va a requerir una serie de cualidades a un material, específicas de este entorno (Nakashima et al. 2002):

- No sea tóxico.
- Resistencia mecánica.
- No termoconductor.
- Nula irritación de los tejidos bucales.
- Hipoalergénico.
- Resistencia a corrosión y pigmentación.
- Estabilidad volumétrica.
- Insípido.

En función del grado de contacto de un material con el medio oral, se establece la siguiente clasificación para biomateriales de uso odontológico (Wataha. 2004).

Tipo 1: Materiales que pueden entrar en contacto con otras cavidades del cuerpo que no sean la cavidad bucal.

Tipo 2: Materiales que entran en contacto con las mucosas de la cavidad oral.

Tipo 3: Materiales que afectan la pulpa dental o los tejidos adyacentes.

Tipo 4: Materiales para la obturación de conductos radiculares.

Tipo 5: Materiales que pueden afectar el tejido duro del diente.

Todos estos requisitos de biocompatibilidad exigen por parte del investigador una evaluación rigurosa, pues le permitirá demostrar la toxicidad o seguridad de un determinado material odontológico. Para ello existen una serie de criterios y normas de obligado cumplimiento que guiarán el trabajo de investigación y asegurarán la fiabilidad de los resultados (ISO 10993-5).

4.1. Modelos de ensayo

El procedimiento que seguimos para simular los efectos del biomaterial al ser implantado se llama modelo de ensayo y sirve para concretar todas las reacciones adversas que se puedan dar con dicho material. Así lo caracterizaremos y su comportamiento será previsible a todos los efectos. Se puede realizar sobre cultivos celulares *in vitro*, directamente sobre animales *in vivo* y pruebas de uso.

In Vivo

Las pruebas son realizadas directamente sobre animales y posteriormente se realiza la biopsia o necropsia de los tejidos diana para comprobar los resultados. Su mayor ventaja es que permite estudiar los efectos acumulativos y a distancia sobre cualquier órgano y no sólo sobre unas determinadas células. Aunque presentan la desventaja de que son caras, largas y difíciles de controlar.

En relación al estudio de un material para ser usado en dientes humanos resultarán pruebas generales y poco específicas debido a las diferencias obvias entre las distintas especies, y si bien son pruebas más completas, existe cierto rechazo a este tipo de experimentación animal en la sociedad actual (Correa. 2000).

1. Test de toxicidad sistémica

Consiste en implantar el material y mantenerlo un determinado tiempo, pasado

el cual realizamos la autopsia al animal con el fin de estudiar los efectos sobre todo el organismo.

2. Test de implantación (cutáneos, musculares, dentales y óseos)

Serán de corto o largo plazo según duren menos o más de 12 semanas. Consiste en la exposición de la dentina o pulpa de un diente sano a un material restaurador determinado. Restauramos la cavidad, esperamos el tiempo deseado y extraemos el diente, con el fin de valorar mediante estudios histológicos la respuesta al material. Otras modalidades son realizando las cavidades directamente sobre el hueso o ubicando un implante dental en la tibia.

3. Ensayos de irritación y sensibilización (cutáneos, subcutáneos, mucosos y oculares)

Se aplica el material a través de un corte en la piel y se evalúa la inflamación a 1, 24, 48 y 72 horas respecto a un control, si se trata de un material no tóxico la inflamación y curación tendrá lugar prácticamente sin variación y transcurridas de 4 a 8 semanas debería estabilizarse la respuesta tisular. En los casos en que la reacción inflamatoria se prolonga e incluso se cronifica o se inicia la fagocitosis del material implantado, será señal de que el material es incompatible.

In Vitro

Las pruebas son realizadas en laboratorio sobre cultivos de células que serán específicos y sensibles, en función de la línea celular que se utilice. Permiten valorar la viabilidad celular, la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN mediante marcadores radioactivos o la actividad enzimática.

Su principal ventaja es la de poder evaluar exactamente las células diana humanas sobre las que actuará el material, y que son menos costosas que las pruebas *in vivo*, así como más rápidas y reproducibles. El inconveniente en este tipo de ensayo es la falta de una respuesta por parte del organismo mediante los mecanismos de protección, y eso limita su relevancia clínica e impide el estudio de toxicidad a nivel sistémico (Kawahara. 1988).

Se dividen en:

- Modelos de biocompatibilidad general

Uso de líneas celulares procedentes de colecciones estandarizadas provenientes de animales, siendo más sencilla la obtención de células y disponiendo de una población mayor que nos permite aumentar el número de ensayos, a cambio nuestro estudio sufrirá una pérdida importante de especificidad.

- Modelos de biocompatibilidad específica

Se realiza con células primarias, que son aquellas que nosotros mismos obtenemos de una muestra de tejido vivo. Resultan mucho más específicas y sus resultados más fiables, pero son de difícil manipulación y en determinadas circunstancias no dispondremos de una población suficientemente amplia como para repetir o aumentar el número de pruebas, en caso de necesidad.

- Ensayos de estabilidad frente a fluidos

Una vez implantado el material se va a ver rodeado de fluido intercelular con el que tendrá que interactuar. Para simular estas condiciones sumergiremos el material en suero fisiológico a 37°C y estimaremos el grado de disolución del material, la cesión de iones y las variaciones en el pH del medio (Lang y Mertens. 1990).

Pruebas de uso

Consisten en el estudio clínico esencial, ya que los materiales se prueban en su medio y para la función específica que se les supone, permitiendo identificar todos los efectos sobre los tejidos en los que habrán de ser utilizados. Se realizan una vez superadas las pruebas *in vitro* e *in vivo*, y tras la aprobación por un comité de ética certificado.

La relevancia del estudio es directamente proporcional a la capacidad para recrear las condiciones en que el material se usará en clínica, ajustando tiempo, localización, ambiente y la técnica con la que se coloca. Si se realizan en humanos se llaman “ensayos clínicos” (Hauman y Love. 2003).

Las pruebas de uso son, de entre todos los ensayos, los que proporcionan la mayor evidencia científica, aunque cuentan con la desventaja de que son muy caros y complejos, siendo difíciles de controlar e interpretar (Wataha. 2004).

En 1979, el Instituto Americano para la Estandarización junto con la Asociación Dental Americana publicaron el documento no. 41 en que daban las recomendaciones para la evaluación biológica de materiales dentales. Consiste en un esquema con una progresión de tres etapas que deben superar los materiales, empezando por las más simples, y continuando con las complicadas (ANSI/ADA. 1979).

1. Pruebas iniciales

Incluye pruebas *in vivo* e *in vitro*.

- Citotoxicidad.
- Hemólisis.
- Prueba de Ames (potencial de mutación).
- Prueba de Styles (transformación celular).
- Toxicidad sistémica vía oral.
- Toxicidad sistémica vía peritoneal.
- Inhalación aguda.

2. Pruebas secundarias

Son pruebas *in vivo* para valorar el potencial inflamatorio e inmunógeno, sin atender a que el material cumpla con la función que se le supone.

- Toxicidad dérmica.
- Implantes subcutáneos.
- Implantes en hueso.
- Implante intramuscular.

3. Pruebas de uso

- Irritación pulpar: se coloca material sobre dentina y se deja de 1-8 semanas.
- Recubrimiento pulpar.
- Uso endodóntico.
- Implantes.

Este modelo tiene como finalidad reducir el coste de las pruebas, dejando las más complejas en último lugar, sólo para materiales que hayan superado las primeras etapas y desechando los materiales no biocompatibles de forma temprana. Así mismo sirven para reducir la experimentación animal, mejorando las pruebas *in vitro* para que simulen al máximo las condiciones *in vivo*.

4.2. El Cultivo Celular

Ante la necesidad de iniciar un cultivo celular para nuestro estudio, la primera decisión que tenemos que afrontar es la de usar una línea celular estandarizada o un cultivo primario.

Las líneas celulares estandarizadas son células animales que han sido tratadas para inmortalizarlas y así poder prolongar nuestro estudio el tiempo necesario. Proviene de epitelio oral de rata, mono o conejo y resultan muy prácticas porque partimos de una población elevada de células, con un gran potencial de reproducción, que nos va a permitir repetir y modificar pruebas y garantizar la reproducibilidad del estudio. A cambio basamos nuestro trabajo de toxicidad en un tipo celular que no se corresponde con las verdaderas células diana, lo cual lo convierte en menos específico.

Un cultivo primario, es el resultante de obtener las células directamente de un espécimen humano, odontoblastos en nuestro caso, por lo que sí nos ofrecen esa especificidad (Annunziata et al. 2006). Las células primarias reproducen mejor las condiciones clínicas en que se aplica el material, y eso los hace más adecuados (Cortés et al. 2006), aunque

siempre dependerá de que tipo de célula usemos y del tipo de ensayo realicemos (Thonemann et al. 2002). En general las células primarias son más sensibles que las líneas celulares, esto es, reaccionan más rápidamente a los tóxicos (Lovschall et al. 2002).

Por contra, presentan varios inconvenientes. Es mucho más complicado obtener una población celular suficientemente amplia como para realizar todos los estudios necesarios. Las células primarias cultivadas experimentan cambios en el fenotipo (Lee et al. 2006), hay variabilidad entre las células de un mismo individuo (van Wyk et al. 2001), tendrán un periodo de vida corto y en unos pocos pases perderán el potencial reproductivo.

Las más usadas son células de epitelio bucal, fibroblastos pulpares y osteoblastos. Nuestra verdadera célula diana es el odontoblasto, que muy difícil de obtener, y podrá contaminarse fácilmente de fibroblastos pulpares.

El standard internacional (ISO 10933-5. 1992; ISO 7405. 1997) recomienda el uso de líneas celulares estandarizadas y procedentes de depósitos reconocidos, ya que resulta sencillo controlar las condiciones del ensayo y permite el uso de cultivos primarios, siempre que se pueda asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados.

La primera línea celular en ser estandarizada fue HeLa, unas células epiteliales provenientes de un carcinoma cervical de útero de una mujer de 30 años llamada Henrietta Lacks, que murió a causa del tumor 8 meses después, en 1951. Las líneas más utilizadas son L929 (fibroblasto de ratón), CPC E (célula con oncogen E6/67), HaK (epitelio de hámster); Balb/C 3T3 (fibroblasto de ratón), RPC-C2A (pulpa de rata) MDPC-23 (pulpa de molar de ratón, caracterizados como odontoblastos, poco sensibles).

Se considera que las líneas celulares establecidas son adecuadas para estudios de toxicidad y que aumentan la reproducibilidad respecto a cultivos primarios (Lovschall et al. 2002). En particular aquellas que provienen de fibroblasto de ratón (Schweikl y Schmalz. 1996. Costa et al. 1999) y de odontoblasto de ratón, que aunque es menos sensible que el fibroblasto, se ubica en toda la periferia de la pulpa, y se considera célula diana en tratamientos pulpares (MacDugall et al. 1998).

Dentro de los cultivos primarios podemos usar fibroblastos u osteoblastos, muy sencillos de conseguir y cultivar, pero la verdadera célula diana de nuestro trabajo es el odontoblasto. El cultivo primario de odontoblastos resulta más complejo que el de osteoblastos o fibroblastos por los siguientes motivos:

- Son células completamente diferenciadas y por tanto con menor potencial para proliferar.
- Presentan prolongaciones celulares ancladas a la dentina y la extracción para el cultivo las rompería (Tjäderhane et al. 1998).
- Es difícil conseguir una población inicial numerosa. Las muestras de tejido pulpar son mínimas en comparación con muchos otros tejidos humanos.
- Periodo de vida limitado (en ocasiones sólo 10 pases) y con un potencial de reproducción muy bajo.

Como dificultad añadida encontramos que para que el cultivo pueda ser aceptado como modelo de estudio hay que demostrar que el fenotipo celular se corresponde con el de odontoblasto, que la respuesta a los materiales probados es reproducible y que las líneas celulares pueden ser estandarizadas.

4.3. Test de contacto

Se pueden clasificar dependiendo de la manera en que se aplica el material sobre el cultivo celular:

Test de contacto directo

Consiste en aplicar el material tal cual lo utilizaríamos en la práctica clínica. Por tanto prepararemos el material según instrucciones del fabricante y en condiciones estériles y lo introduciremos en el centro de la placa con las células y cubriremos con medio de cultivo. Este método es la única elección posible para materiales líquidos, aunque también lo podemos aplicar a sólidos.

Test de contacto indirecto

En este caso el material ya preparado según instrucciones del fabricante y en condiciones de esterilidad, lo introducimos en medio de cultivo y lo mantenemos 24 horas. Filtramos este medio y lo aplicamos a las células. Resulta menos agresivo que el anterior y en la mayoría de los casos estas condiciones asemejan más las condiciones en que el material actúa sobre el paciente en la práctica clínica.

4.4. Pruebas post-tóxico

Una vez aplicado el material se valora el efecto mediante diversas pruebas, que pretenden cualificar o cuantificar el daño producido. Se pueden clasificar en:

Morfológicas

Las microscopías óptica y electrónica se utilizan para estudiar anomalías en el volumen, la morfología celular, ruptura de la membrana externa, alteraciones en la organización celular o pérdida de uniones intercelulares. La microscopía electrónica requiere fijar las células durante 24 horas en glutaraldehído al 2.5 % y una hora más en tetróxido de osmio y secado.

Funcionales

Analizan la capacidad de las células para producir energía y sintetizar proteínas.

- **WST1 mitocondrial:** determina la proliferación y viabilidad celular y se basa en la transformación de sal de tetrazolio en formazan mediante la succinato/tetrazolio reductasa mitocondrial y posterior lectura de absorbancia de luz a 440nm en ELISA.
- **ALP:** determina la actividad de la fosfatasa alcalina, mediador de la conversión de p- nitrofenol fosfato a nitrofenol en medio alcalino, y se mide porque el nitrofenol exhibe una absorción de luz máxima a 405 – 415 nm. Se usa para determinar la diferenciación de células formadoras de tejidos duros como osteoblastos y odontoblastos.

- MTT: método colorimétrico sensible y cuantitativo con el que se puede medir viabilidad, proliferación y activación celular. Se basa en la capacidad de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial para convertir el (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) que es hidrosoluble y amarillo en un formazano, azul oscuro. El formazano queda atrapado en el interior de las células en forma de cristales, que habrán de ser solubilizados con disolventes orgánicos (DMSO) para realizar la colorimetría.

Test de permeabilidad

Tintes que son incluidos o no, indicarán si el metabolismo celular prosigue o si se ha visto afectado tras la exposición al material de estudio.

Test de reproducción

Evalúan la capacidad proliferativa de las células tras la exposición a un tóxico.

(Schmalz. 1997; Correa. 2000; Wataha. 2001; Villegas et al. 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. HIPOTESIS

1. Los materiales con base de hidróxido de calcio o de hidroxiapatita son más biocompatibles que aquellos con ionómero de vidrio.
2. Para los materiales con base de ionómero de vidrio, un pH excesivamente ácido puede suponer un aumento en la toxicidad.

6. OBJETIVOS

1. Evaluar que el método de elución sobre cultivos de líneas celulares estandarizadas es válido para realizar ensayos de biocompatibilidad.
2. Comparar la biocompatibilidad entre cuatro materiales de uso clínico: Vitrebond Plus, Ketac Bond, Calcimol LC y Fluoroseal.
3. Analizar las diferencias significativas entre estos materiales.
4. Analizar la influencia del pH de los materiales sobre su toxicidad.
5. Determinar posibles cambios en la morfología celular después de haber sido expuestas los materiales restauradores.

**MATERIAL
Y
MÉTODO**

7. MATERIAL

- Línea celular L929 de fibroblasto de ratón (European Collection of Cell Cultures).
- Cabina de seguridad biológica tipo IIB.
- Material para la descongelación de las células:
 - Un criotubo con las células congeladas en nitrógeno líquido.
 - Baño de agua a 37°C.
 - El medio de cultivo utilizado es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 10% de suero fetal de ternera y una mezcla de penicilina y estreptomycin (100U/mL y 100µg/mL).
 - 1 tubo de centrifuga de 75 ml.
 - Centrifuga.
 - 1 frasco de cultivo de 75 cm².
 - Pipeta Pasteur.
 - Incubador a 37°C, concentración de CO₂ 37% y humedad 95%.
- Material para el subcultivo de la línea celular:
 - Solución de tripsina 0,25%.
 - Baño de agua a 37°C.
 - Medio de cultivo.
 - 2 tubos de centrifuga de 50 ml.
 - Centrifuga.
 - Báscula.
 - Frasco de cultivo de 75 ml.
- Material para recuento y estimación de la viabilidad:
 - Suspensión celular.
 - Disolución de azul tripán.
 - Tubo Eppendorf.
 - Micropipeta.

- Contador.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio óptico con contraste de fases.
- Material para la curva de crecimiento:
 - Placas de 96 pocillos.
 - Suspensión celular.
- Materiales para test:
 - Metil metacrilato como control positivo.
 - Ketac™ Bond (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA).
 - Vitrebond™ Plus (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA).
 - Fluoroseal ® (Dentaflux – J Ripoll SL, Madrid, España).
 - Calcimol LC (Voco GmbH, Cuxhaven. Alemania).
- Material para la preparación de extractos:
 - Jeringas estériles de 5 ml.
 - Filtros con poro de 0,45µm.
 - Tubos de ensayo.
 - Placas de Petri de 35mm.
 - Medio de cultivo.
- Material para el control del pH:
 - Papel indicador de pH.
 - Placas de 96 pocillos.
 - Medios de cultivo a pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5.
- Material para el test de citotoxicidad con MTT:
 - Disolución de MTT (1mg/ml) en DMEM.
 - DMSO.
 - Placa de 96 pocillos.
 - Agitador de placas.
 - Espectrofotómetro Multiskan MCC/340P V2.33.

8. MÉTODO

El objeto de este estudio era analizar varios materiales de uso como bases cavitarias y recubrimiento pulpar. Los materiales elegidos fueron un ionómero de vidrio convencional, Ketac™ Bond (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA), un ionómero fotopolimerizable de nueva formulación, Vitrebond™ Plus (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA), un cemento de hidróxido de calcio fotopolimerizable, Calcimol LC (Voco GmbH, Cuxhaven. Alemania) y un material fotopolimerizable a base de hidroxiapatita, Fluoroseal ® (Dentaflux – J Ripoll SL, Madrid, España).

Este estudio se realizó en condiciones de esterilidad mediante cabinas de flujo laminar (figura 2). Se utilizó el método indirecto de elución mediante extractos, siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para tests de citotoxicidad *in vitro*.



Figura 2: Cabina de flujo laminar.

Para poder empezar con el ensayo el primer paso es realizar la adquisición de la línea celular L929 de fibroblastos de ratón al ECCC (Colección Europea de Cultivos Celulares) que nos provee una ampolla con 1.000.000 de células congeladas en medio de cultivo con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), y se

Material y método

procede a su descongelación para poder trabajar con ellas, que se realiza sumergiendo la ampolla en un baño de agua a 37°C y agitándolo suavemente.

Para evitar la toxicidad por el DMSO, rápidamente se resuspenden las células mediante una pipeta Pasteur en 10 ml de medio de cultivo en un frasco de cultivo de 75 ml y se incuban a 37°C y concentración de CO₂ del 7,5 %.

El medio de cultivo utilizado es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 10% de suero fetal de ternera y una mezcla de penicilina y estreptomicina (100U/mL y 100µg/mL). Los frascos de cultivo se rotularon con el nombre de la línea celular, el número de pase o subcultivo, la fecha y el número de células sembradas.

Pasadas 24 horas, las células se hallan adheridas al frasco de cultivo y se puede realizar otro cambio de medio de cultivo para terminar de eliminar los residuos de DMSO. A partir de aquí se realizan controles diarios para valorar el grado de confluencia y un cambio de medio de cultivo cada 72 horas (figura 3).

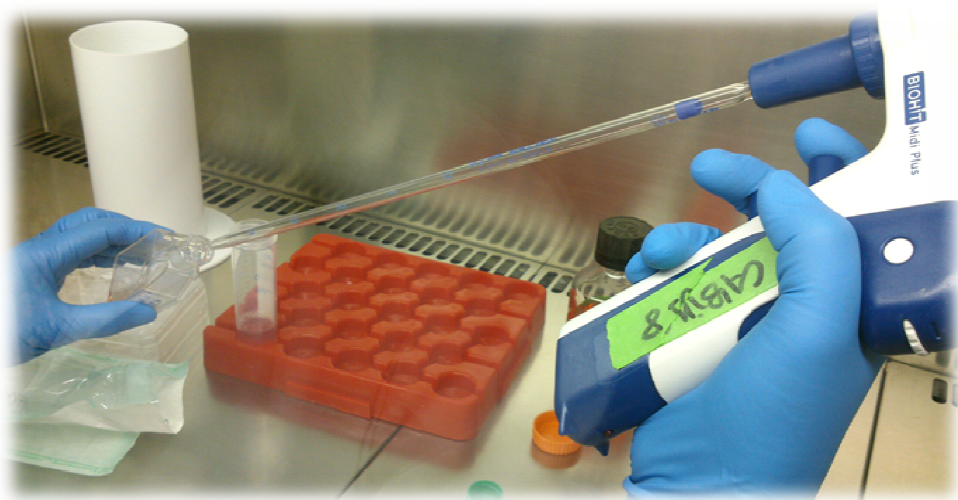


Figura 3: Cambio de medio de cultivo.

Las células comienzan a dividirse y crecen en monocapa, de forma que llega un momento en que se alcanza la confluencia, es decir, ocupan toda la superficie del frasco de cultivo y se detiene su crecimiento. Por ello deben ser

subcultivadas antes de que esto ocurra para que sigan proliferando.

La primera etapa del subcultivo es la tripsinización, en la cual se retira todo el medio de cultivo del frasco, se aplica tripsina al 0'25% y precalentada a 37^aC y se incuba durante cinco minutos a la misma temperatura. La tripsina es una enzima peptidasa que va a separar las uniones proteicas de las células al frasco de cultivo mediante hidrólisis.

Pasado este tiempo, se golpea ligeramente el frasco en sentido horizontal varias veces, para favorecer la separación de las células y se verifica que ésta se ha producido correctamente, observando al microscopio. No se debe sobrepasar el tiempo recomendado para minimizar la acción de la tripsina sobre la membrana celular, pasado el cual añadiremos medio de cultivo a 4°C, que frenará su acción por la disminución de la temperatura y porque el suero contiene un inhibidor de esta enzima, la α_1 antitripsina.

A continuación se centrifuga el medio de cultivo durante diez minutos a 200 x g para sedimentar las células, que se depositarán en el fondo del tubo, separándose así del medio de cultivo que contiene la tripsina. Se decanta el medio de cultivo sobrante y se resuspende el sedimento celular mediante agitación con pipeta Pasteur en medio de cultivo nuevo y se contabiliza el número de células.

Para contabilizar células, se diluyen 100 μ l de suspensión celular en 100 μ l de azul de tripán, que tiñe las células vivas, y colocamos una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer. Esta cámara nos permite contar de manera precisa porque tiene cuatro cuadrículas con una superficie de 0,1mm x 0,1mm cada una y una altura de 0,1mm. Contamos las células contenidas en cada cuadrícula y calculamos la media, que nos da como resultado el número de células en 0,1mm³. Multiplicamos por 10⁴ para pasar a células/ml y por 2 para trasladar el resultado de la dilución con el colorante a la concentración original. Esto queda reflejado en la siguiente fórmula:

Nº de células viables/ml: nº de células vivas contadas x 10.000 x factor de dilución.

Nº de células totales/ml: nº de células vivas y muertas x 10.000 x factor de dilución.

% de viabilidad: (Nº de células viables / Nº de células totales) x 100.

Este procedimiento es imprescindible para saber la concentración a la que se debe subcultivar pues se pondrá una cantidad de células adecuada al tipo celular, para que se encuentren en la densidad mínima para que se estimule la proliferación y tengan bastante espacio para crecer. En el caso de L929, el proveedor aconseja subcultivarlas siempre a una concentración inicial entre 5.000 y 20.000 células/cm².

8.1. Ensayos previos

La finalidad de cultivar las células es realizar un ensayo de toxicidad, en el cual se cuentan las células después de haberles aplicado un agente y se valora su posible efecto citotóxico. Este recuento ya no se realiza manualmente, sino que se realiza con un espectrofotómetro mediante la prueba del MTT.

Antes de comenzar con los ensayos de toxicidad se realizan dos pruebas preparatorias para nuestro estudio:

1. Programar el espectrofotómetro.
2. Curva de crecimiento.
3. Ensayo piloto.

Programación del espectrofotómetro o medida del rango de sensibilidad del ensayo

Esto sirve para conocer la relación entre el número de células viables y la lectura que va a realizar el aparato, que es una cifra absoluta que oscila entre 0 y 2. Para ello se prepara una placa con pocillos de 200µl en la cual se siembra por sextuplicado distintas cantidades de células:

1ª columna: 312 células.

2ª columna: 625 células.

3ª columna: 1250 células.

4ª columna: 2500 células.

5ª columna: 5000 células.

6ª columna: 10.000 células.

7ª columna: 20.000 células.

Reservando los pocillos del contorno para agua destilada o medio de cultivo por ser los que más evaporación sufren.

Una vez sembradas las células se incuban en la estufa durante cuatro horas para que se adhieran a la placa, hecho que verificamos al microscopio, y entonces se mide el número de células con el método del MTT (tabla 1).

	312	625	1250	2500	5000	10000	20000
x	0,022	0,028	0,096	0,271	0,505	1,157	1,644
σ	0,011	0,014	0,031	0,045	0,037	0,082	0,001

Tabla 1: Resultados de la programación del espectrofotómetro.

Al hallar las medias vemos que entre 600 y 10.000 células existe una correlación lineal entre el número de células y los valores de absorbancia medidos, por lo cual, el espectrofotómetro es más fiable en ese rango, tal y como muestra el gráfico 1. Así pues, en nuestro estudio procuraremos mantenernos en todo momento dentro de ese rango.

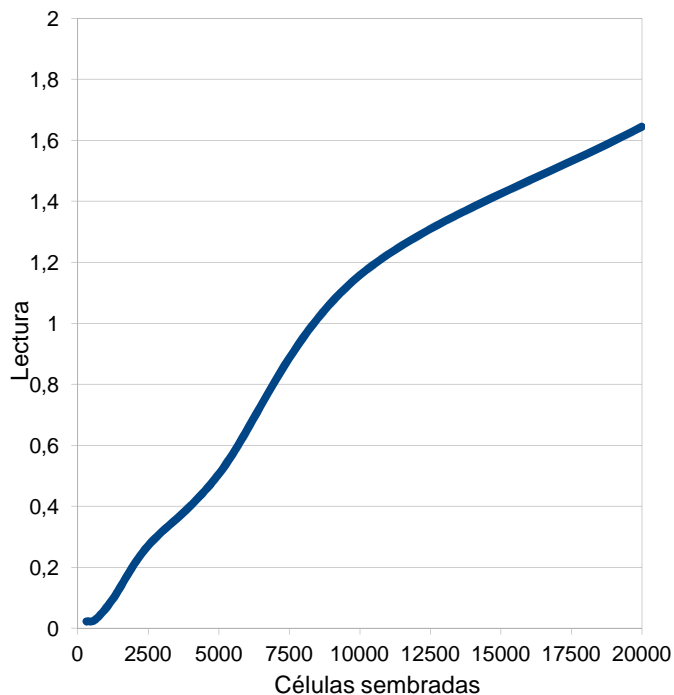


Gráfico 1: Curva de calibración.

Curva de Crecimiento

La curva de crecimiento sirve para determinar la variación de una población inicial de células en función del tiempo transcurrido, y eso va a depender directamente de la línea celular que empleemos. Se necesita valorar primero este cambio antes de iniciar un estudio de 24 horas o más, y así adecuar el número de células empleadas por cada pocillo.

Se siembran cuatro placas y en cada una de ellas se preparan cuatro columnas con 1.250, 2.500, 5.000 y 10.000 células dejando siempre el contorno con agua destilada libre de células por ser los pocillos que sufren más evaporación. Se incuban las placas y se mide la proliferación de células nuevamente mediante el ensayo del MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, según vemos en el gráfico 2 (las tablas con los resultados se pueden consultar en el Anexo).

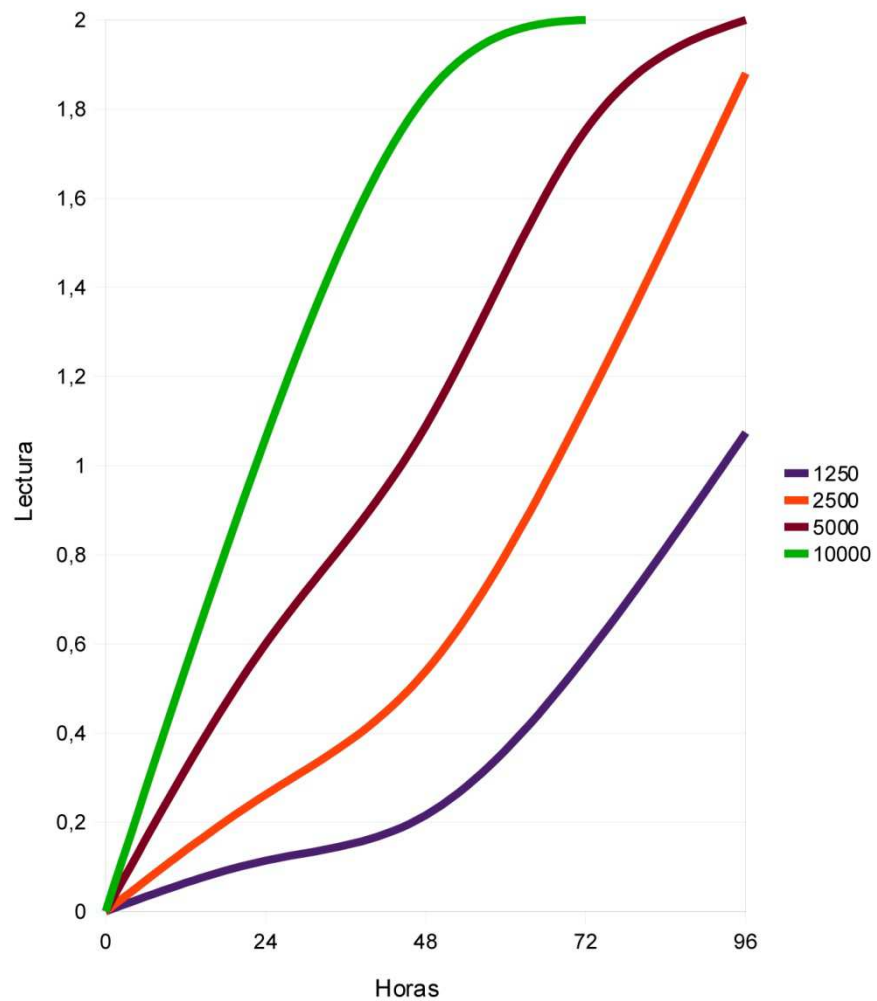


Gráfico 2: Curva de crecimiento.

Como se va a realizar un ensayo con un tiempo de trabajo de 48 horas desde la siembra hasta la lectura, se decide utilizar una siembra inicial de 5000 células por pocillo, pues nos va a dar una cantidad celular adecuada a lo largo de todo el proceso.

En los ensayos previos también se realizó una medición del pH de los distintos materiales, hallando los siguientes resultados:

- Vitrebond Plus: pH 5,5.
- Ketac Bond: pH 6,5.
- Fluoroseal: pH 7,5.
- Calcimol LC: pH 8,5.

Ensayo Piloto

Para confirmar la idoneidad de la metodología empleada y la validez de los prototipos se realizó una prueba previa representativa, con parte de los materiales, pero con las mismas diluciones.

8.2. Ensayo experimental

Para realizar el estudio se ha pretendido simular las condiciones en que los distintos materiales iban a interactuar con la pulpa. Puesto que son materiales destinados a fraguar sobre la dentina, que es porosa y se relaciona con las células pulpares a través de conductos, se elige el método de elución, en el que se extrae una sustancia por absorción, que llamaremos extracto o eluato, mediante un disolvente que entra en contacto con el material, que llamamos eluyente. El eluyente es el medio de cultivo que se incubó durante 24 horas con el material de estudio, y el extracto resultante se aplicará a distintas concentraciones sobre las células.

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

Día 1

Se prepara una placa de cultivo de 96 pocillos y se siembra con 5000 células de la línea celular L929 y 200µl de medio de cultivo por cada pocillo, dejando libres los pocillos del contorno por ser los más expuestos a evaporación, que se llenan de medio de cultivo sólo.

Puesto que en los ensayos previos se había visto que los distintos materiales

modifican el medio de cultivo, alterando el pH, se toma la decisión de realizar un control por cada pH, y así diferenciar qué grado de toxicidad podemos achacar al pH y a la toxicidad propia del material.

Para ese fin, se prepara una segunda placa con células destinada a realizar los controles específicos para el pH de cada uno de los materiales, empleando cuatro columnas, una por cada valor de pH, y por triplicado, tres filas, en las que pasadas 24 horas sustituiremos el medio de cultivo normal (DMEM), por el mismo medio con el pH alterado. En esta misma placa se prepara además otra columna de células para el control, y se deja libre de células una columna, que servirá para el blanco. El control positivo, se realizó a parte para evitar la contaminación por evaporación del resto de pocillos.

Los materiales de estudio son un ionómero de vidrio fotopolimerizable Vitrebond Plus(3M Espe), un ionómero de vidrio autopolimerizable Ketac Bond (3M Espe), una base de hidróxido de calcio fotopolimerizable Calcimol LC (Voco). Se incluyó además en el estudio un material fotopolimerizable llamado Fluoroseal (Dentaflux), pues aunque no hemos encontrado bibliografía referente a este material, el fabricante lo presenta como una sal cálcica de hidroxiapatita con fluoruro sódico, de alta biocompatibilidad, capacidad para crear dentina secundaria similar al hidróxido de calcio, mayor dureza y estabilidad frente a flúidos que el ionómero de vidrio, por lo que sella mejor, y libera calcio y flúor.

La preparación de los extractos de los distintos materiales se realiza siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para test de citotoxicidad *in vitro*. Para ello, se mezclaron los materiales y prepararon según las instrucciones del fabricante y en condiciones de esterilidad. Una vez mezclados, se colocaron fragmentos de los materiales de 2-3 mm de alto y 35 mm de diámetro en placas estériles de 6mm de alto y 35 mm de diámetro, y se polimerizaron o dejaron fraguar, según el material, el tiempo necesario.

Una vez fraguados todos los materiales, se cubrieron con medio de cultivo en una relación de 3 cm² de material en la placa por cada mililitro de medio de

cultivo según la norma ISO 10993-5, y se dejaron 24h en la incubadora de CO₂.

Día 2

Tras comprobar al microscopio la correcta adhesión y disposición de las células a las placas de 96 pocillos, se preparan las distintas diluciones de los extractos. Para ello se recoge con una jeringa estéril el medio de cultivo que hemos incubado con los materiales de estudio y se filtra, para eliminar los restos sólidos, con un filtro para tamaño de partícula 0,45 µm y con capacidad para 1-10 ml de volumen filtrado.

El resultante será el extracto a concentración total, a partir del cual se preparan las diluciones seriadas a la media, cuarta, octava y dieciseisava partes. Con las diluciones ya preparadas retiramos todo el medio de cultivo de la placa y lo sustituimos por los extractos según la distribución de la figura 4.

En la segunda placa de cultivo que habíamos preparado para valorar las alteraciones causadas por el pH, se sustituye el medio de cultivo normal, por aquel que se preparó con cada uno de los distintos pH de los materiales. En las columnas reservadas para el control y el blanco se renueva el medio de cultivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	V1	V2	V3	V4	V5	K1	K2	K3	K4	K5	-
C	-	V1	V2	V3	V4	V5	K1	K2	K3	K4	K5	-
D	-	V1	V2	V3	V4	V5	K1	K2	K3	K4	K5	-
E	-	F1	F2	F3	F4	F5	C1	C2	C3	C4	C5	-
F	-	F1	F2	F3	F4	F5	C1	C2	C3	C4	C5	-
G	-	F1	F2	F3	F4	F5	C1	C2	C3	C4	C5	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 4. Distribución de pocillos. Donde V=Vitrebond Plus; K= Ketac Bond; F= Fluoroseal; C= Calcimol LC; 1=dilución total; 2=media ; 3=cuarta; 4=octava; 5=dieciseisava.

Día 3. Test de viabilidad y citotoxicidad: Ensayo de MTT

Este es un método para medir la viabilidad y proliferación celular de forma cuantitativa mediante colorimetría, y es específico para células adherentes.

Se emplea un sustrato soluble en agua y de color amarillo llamado MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) que es convertido mediante las succinato-deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas a formazano, de color azul oscuro-morado (figura 5). Una vez metabolizado permanecerá en forma de cristales insolubles en el interior de las células, y para poder realizar la colorimetría lo solubilizaremos con DMSO, un disolvente orgánico.

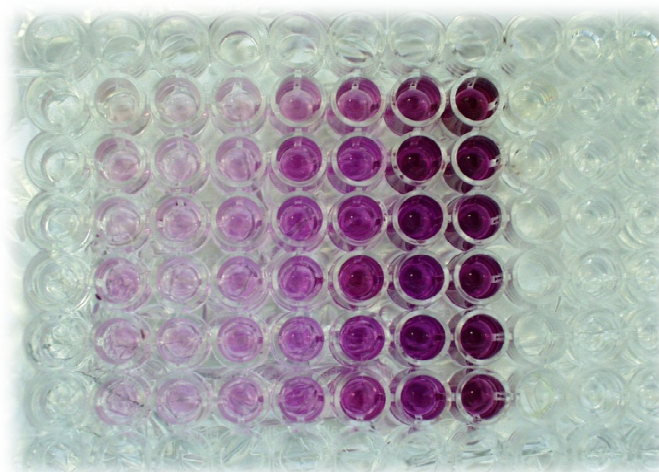


Figura 5: Aspecto de una placa al realizar el MTT.

Como alternativa al DMSO se puede utilizar isopropanol-HCL, aunque tiene el inconveniente de que eleva el resultado de la colorimetría por precipitar las proteínas, o etanol, pero es muy volátil y hay que realizar la colorimetría inmediatamente. También se emplean detergentes tipo NP40 asociados a los disolventes para destruir la membrana celular y que la lectura resulte más homogénea.

Este método tiene como ventaja la capacidad para procesar un gran número de muestras con rapidez y precisión. Además es válido para pruebas de sensibilidad celular a radiación y fármacos, y viabilidad, proliferación y activación celular.

Material y método

El MTT es un polvo que para poder utilizarlo con las células requiere ser diluido en medio de cultivo, preferentemente sin rojo fenol, para que no modifique la absorbancia lumínica. Para ello hay que calentar el medio de cultivo a 37°C, y añadir la cantidad necesaria de MTT para que la concentración sea de 1mg/ml. Hecho esto, se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar y eliminar los residuos, y se guarda a 4°C protegido de la luz, teniendo una duración de aproximadamente un mes.

Para realizar la lectura de resultados se retira todo el medio de cultivo con los extractos de los pocillos asegurándonos de que no queden restos dentro, y se depositan 200 µl de MTT (1mg/ml) e incubamos cuatro horas, envuelto en papel de aluminio, para protegerlo de la luz.

Pasado este tiempo se retira todo el MTT, preocupándonos de tirar los restos a un contenedor especial, por ser una sustancia muy tóxica, que debe recibir un tratamiento adecuado, y se aplican 100µl de DMSO a los pocillos, momento en el que ya apreciamos un cambio de coloración, del amarillo del MTT a púrpura por la ruptura y liberación de cristales de formazano.

A continuación, procedemos a la lectura con el espectrofotómetro (Multiskan MCC/340 P V2.33 modo longitud de onda dual, filtros de 570 y 690, tiempo de agitación 3s).

Pasadas tres semanas se repitió el ensayo siguiendo el mismo método.

Interpretación de los resultados

Los resultados se interpretaron cuantitativamente, hallando la viabilidad en porcentajes respecto al control y al blanco en cada una de las pruebas realizadas, y procesando estos datos mediante un análisis estadístico. El análisis cualitativo lo realizó una única persona, sin referencias de los materiales usados, mediante microscopio óptico, y se valoró la morfología celular antes y después de aplicar las diluciones a las células.

8.3. Método estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa R en su versión 2.12.0 (2010-10-15), The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0, i486-pc-linux-gnu (32-bit).

Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para valorar si había diferencias entre los distintos grupos, y puesto que había diferencia con significación estadística, se realizaron contrastes planificados (más específicos y potentes que las comparaciones por pares) entre los distintos materiales.

Los contrastes planificados se realizaron mediante el U-test de Mann-Whitney que es una prueba para muestras independientes.

Dado que las condiciones de las muestras lo permitían (normalidad y homocedasticidad), se aplicó el test T de Student para ver si existían diferencias en la viabilidad de los distintos materiales utilizados frente al control positivo (Metil metacrilato), desde la menor a la mayor dilución.

Finalmente, se realizó por medio de ajuste lineal una predicción de la dosis 50 o dilución a la cual existe un 50% de viabilidad.

** Todos los datos se pueden consultar en el Anexo.*

RESULTADOS

9. Resultados, análisis estadístico y morfológico

9.1. Viabilidad celular interpretada

Del análisis de los cultivos celulares mediante el método del MTT se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 2. Esta tabla refleja la viabilidad celular interpretada a las 24 horas de exponerlas al extracto del material para cada concentración, es decir, las células que continuaron con sus ciclos vitales, expresada en tanto por ciento. Para interpretar la viabilidad se tuvo en cuenta la contaminación cromática causada por el propio medio de cultivo, cuyos resultados figuran en el anexo como “blanco”.

	Vitrebond Plus	Ketac Bond	Fluoroseal	Calcimol LC
Total	6,43	10,25	18,92	8,96
1/2	7,60	60,88	44,21	23,73
1/4	8,38	94,54	58,61	61,74
1/8	9,94	98,12	79,81	68,95
1/16	9,55	99,80	90,84	69,53

Tabla 2: Viabilidad celular interpretada, expresada en porcentaje para cada concentración.

Todos los materiales mostraron unos porcentajes bajos de viabilidad a concentración total y para Vitrebond Plus a todas las concentraciones. Ketac Bond y Fluoroseal son los que presentaron una toxicidad más moderada a partir de la dilución $\frac{1}{2}$ (gráfico 3).

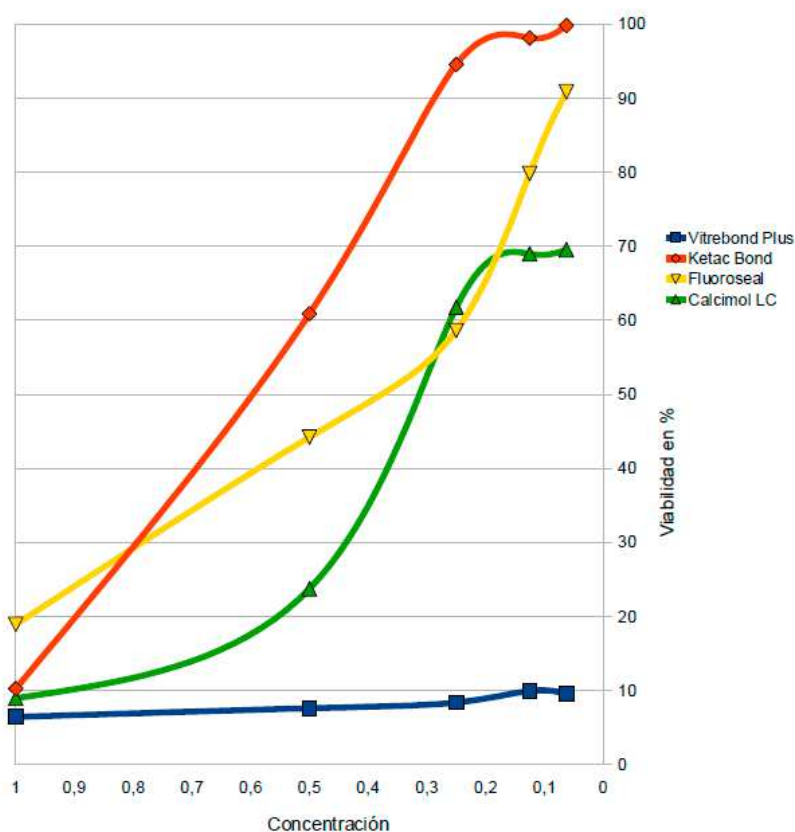


Gráfico 3: Viabilidad celular en porcentaje respecto a concentración.

El análisis estadístico mediante Kruskal-Wallis mostró que existían diferencias significativas entre algunos de los pares de muestras aunque no para todas las concentraciones.

Se vió que Vitrebond Plus presentaba unos resultados muy distintos al resto de materiales, y se optó por comprobar mediante el U-test de Mann-Whitney si existían diferencias significativas entre este material y los demás, obteniendo que era distinto al conjunto de los otros materiales para todas las concentraciones ($p < 0,05$), excepto para la concentración total en que no había diferencia significativa.

A continuación se repitió el test de Kruskal-Wallis para buscar si existían diferencias significativas entre los otros tres materiales, excluyendo al Vitrebond Plus, hallando que los materiales son diferentes entre sí para todas las

concentraciones excepto para concentración total.

Puesto que Ketac Bond mostró los valores más bajos de citotoxicidad, se decidió realizar contrastes planificados mediante el U-test de Mann-Whitney para enfrentar a Ketac Bond con los otros dos (Calcimol LC y Fluoroseal). El fin de esta prueba era valorar si esa diferencia es estadísticamente significativa, para todas las concentraciones excepto para la total, que ya se vio que no existía diferencia. Se obtuvo como resultado que existe diferencia significativa a las concentraciones media, cuarta, octava y dieciseisava del Ketac Bond respecto a los otros materiales ($p < 0,05$).

Para concluir con los contrastes planificados se decidió comparar los dos materiales restantes (Fluoroseal y Calcimol LC) entre sí, con la intención de valorar si la diferencia observada a favor de Fluoroseal resulta ser significativa o no. Para ello se realizó nuevamente el U-Test que reveló que sólo existían diferencias significativas para la concentración más baja.

9.2. Dosis letal 50

En la tabla 3 se refleja la Dosis Letal 50. Para Vitrebond Plus no se calculó la dosis letal 50 porque en ninguna de las concentraciones se alcanzó este valor de viabilidad.

Dosis letal 50	Estimación puntual	Intervalo de confianza 95%
Vitrebond Plus	-	-
Ketac Bond	0,6	0,56-0,64
Calcimol LC	0,33	0,28-0,39
Fluoroseal	0,47	0,39-0,54

Tabla 3: Dosis letal 50.

9.3. Influencia del pH en la toxicidad de los materiales

En nuestro ensayo se había observado que los distintos materiales presentaban diferentes grados de pH cuando se medían los extractos a las 24 horas de ser incubados, antes de realizar las diluciones, modificando así el medio de cultivo. Los valores de pH observados fueron los siguientes:

- Vitrebond Plus: pH 5,5.
- Ketac Bond: pH 6,5.
- Fluoroseal: pH 7,5.
- Calcimol LC: pH 8,5.

Por este motivo se preparó un ensayo para valorar la posible influencia del pH en la toxicidad de los materiales, en el que se comparaba la viabilidad celular en medios de cultivo con pH idéntico al que resultaba de incubar los distintos materiales durante 24 horas.

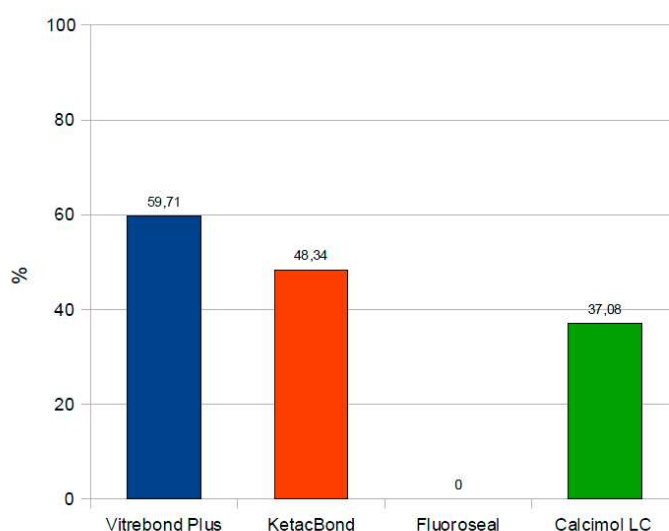


Gráfico 4: Influencia del PH del material en la viabilidad.

El resultado de la viabilidad celular obtenida se comparó con la viabilidad del medio de cultivo estándar que es pH 7,5 y se reflejó en tanto por ciento, ofreciendo los resultados reflejados en el gráfico 4.

El Fluoroseal tiene un pH similar al del medio de cultivo estándar por lo que la influencia es nula. En cambio el Vitrebond Plus tiene un pH muy bajo, que disminuye significativamente la viabilidad celular, por lo que habría que valorar hasta que punto mejorando ese pH, mejorarían los resultados. De hecho, en las placas de pocillos, se vio un cambio brusco en la coloración del medio de cultivo correspondiente a las concentraciones más altas de Vitrebond Plus, que podría deberse al bajo pH, o a la toxicidad del material en sí (figura 6).

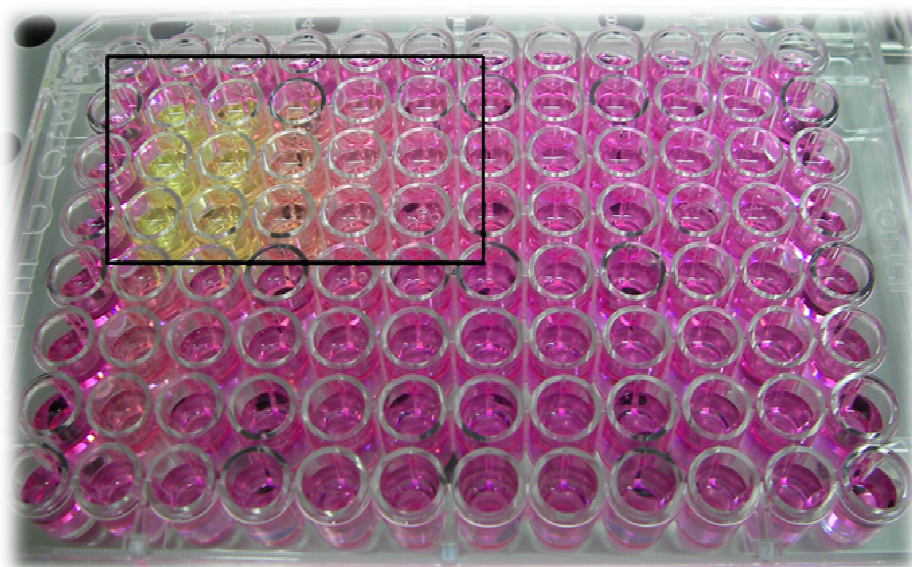


Figura 6: Placa de cultivo. Se destacan los pocillos que contienen Vitrebond Plus.

9.4. Análisis morfológico

Se completó el estudio de toxicidad con un análisis cualitativo mediante microscópico óptico de las células antes y después de ser expuestas a los diferentes materiales y medios de cultivo con distinto pH.

Se observaron las células sanas al mantenerlas en cultivo celular sin ser expuestas a ningún material. Los fibroblastos de la línea celular se encontraban adheridos al fondo del pocillo, conservaban su aspecto fusiforme o estrellado y se agrupaban en colonias, sin defectos visibles en la membrana, el núcleo se

mostraba redondeado, y con escasez de células muertas (Figura 7).

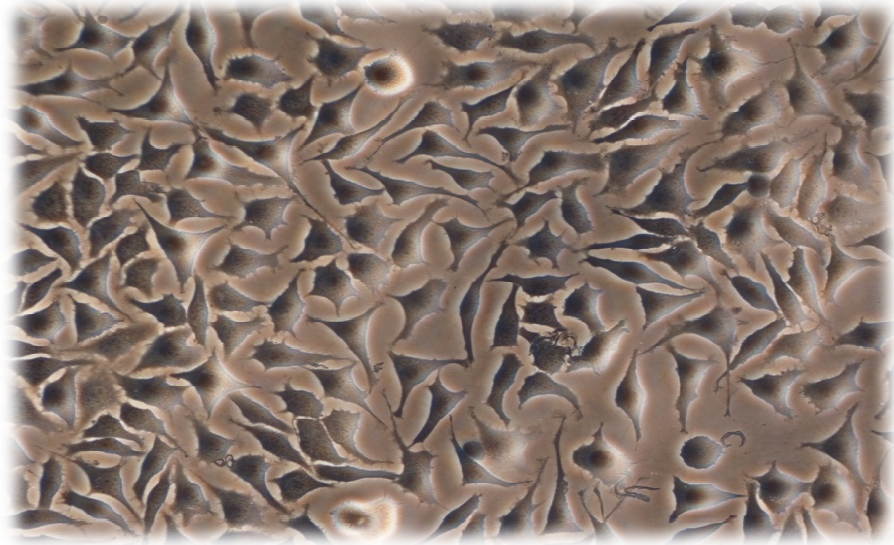


Figura 7: Aspecto de un cultivo celular no expuesto a ninguna sustancia (objetivo 10x).

En los pocillos en que se expuso las células a concentraciones bajas de los distintos materiales, se empezaron a observar junto con las células de aspecto normal, otras que presentaban pérdida de la forma alargada o estrellada, irregularidades e incluso rotura en la membrana y malformaciones en el núcleo. También se observaron células muertas en suspensión (Figura 8).

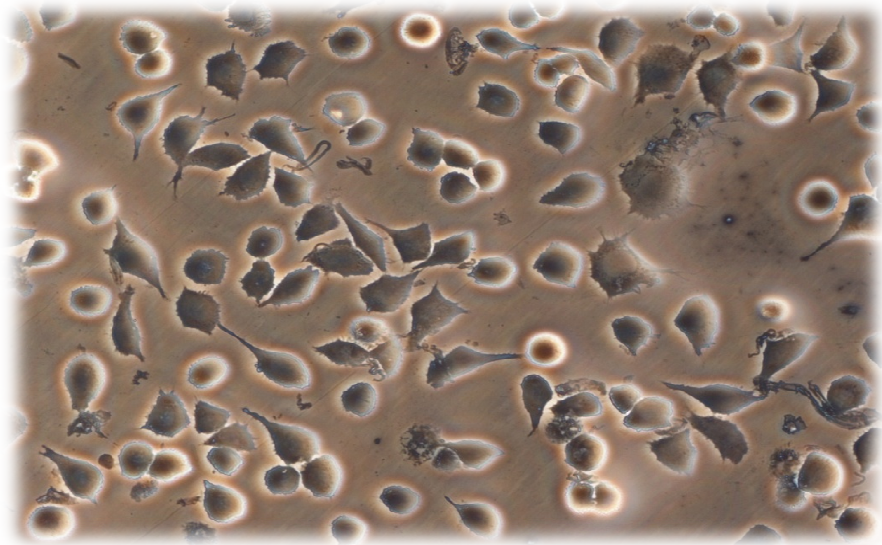


Figura 8: Dilución a la 1/8 de KetacBond (objetivo 10x).

Por último, en las diluciones a mayor concentración y por tanto más tóxicas, había una presencia muy baja de células vivas o sanas, predominando los corpúsculos celulares en suspensión (Figura 9).

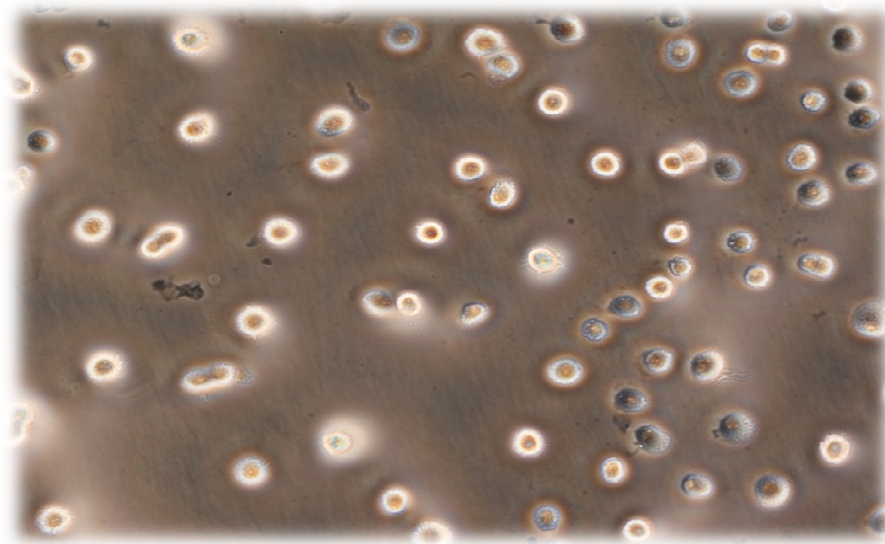


Figura 9: Células muertas en suspensión (objetivo 10x).

DISCUSIÓN

Cultivos primarios y líneas celulares

El ensayo de toxicidad sobre células es uno de los muchos tipos de pruebas de toxicidad que pasan los materiales destinados a uso humano. Para algunos autores el ensayo de contacto material/célula, también llamado test directo, es el tipo de estudio que replica mejor las condiciones que se dan *in vivo* (Cao et al. 2005). Sin embargo, no representa ninguna de las defensas con las que cuenta el organismo, por lo que puede resultar una versión aumentada de lo que ocurriría en la misma situación clínica.

Al realizar un ensayo de toxicidad sobre células, la primera decisión que hay que afrontar es la de realizar el estudio sobre un cultivo celular primario de odontoblastos o una línea celular estandarizada. El principal argumento a favor del cultivo primario es la gran especificidad que confiere al estudio al obtener las células directamente de un humano (Cortés et al. 2006. Annunziata et al. 2006), además son células más sensibles (Lovschall et al. 2002; Thonemann et al. 2002) que reaccionan antes y de forma más marcada ante los tóxicos.

Por contra, encontramos ciertos inconvenientes al realizar ensayos sobre cultivos primarios. Resulta muy difícil conseguir una población amplia, que nos permita planificar un ensayo con muchas repeticiones para que tenga potencia estadística, o repetir las pruebas en caso de que obtengamos resultados dispares o poco concluyentes (van Wyk et al. 2001). Esta población celular va a tener un periodo de vida muy corto y en unas pocas generaciones (pases) pierden el potencial reproductivo (Lee et al. 2006). Además según va avanzando su edad responden de distinta forma a las pruebas (Thonemann et al. 2002).

Si hacemos un cultivo de pulpa dental, la población celular que vamos a obtener es de fibroblastos. Estas son células mesenquimales más indiferenciadas que un fibroblasto derivado de piel, y que podrían diferenciarse en neo-odontoblastos, lo cual dificulta su identificación para saber el tipo celular con el que se realiza el ensayo. El manejo de fibroblasto pulpar es menos complejo que el de odontoblastos, porque sólo requieren una siembra de pulpa y se reproducen

rápidamente por unos 10 pases. Presentan el cariotipo normal y envejecen hacia los 15-18 pases (Baume. 1980).

En cambio, si se pretende cultivar odontoblastos es mucho más complicado por ser células muy diferenciadas, con poco potencial reproductivo y ancladas a la dentina por lo que al extraerlas se romperían (Tjäderhane et al. 1998). Una vez cultivados pueden experimentar cambios en el fenotipo que hace que puedan ser caracterizados como fibroblastos en vez de neodontoblastos. Los fibroblastos que pueda haber presentes en el cultivo crecen mucho más rápido que los odontoblastos y los terminan por desplazar.

A pesar de ello existen técnicas específicas para el cultivo de odontoblastos (Nakashima. 1991; Tjäderhane et al. 1998) con buenos resultados, pero que no dejan de tener los inconvenientes de un cultivo primario. Una vez cultivados los odontoblastos, hay que caracterizarlos como tales, para lo cual no existe una prueba en concreto sino que hay una serie de valoraciones morfológicas al microscopio (polarización de las células), genéticas (análisis Northern blot para cambios en la expresión del receptor de osteocalcina en el mRNA y RT-PCR para determinar la expresión del gen DMP-1)(Yokose et al. 2000) y funcionales (presencia de fibronectina, colágeno tipo I, fosfatasa alcalina) (Miller et al. 1976; Owen et al. 1990). La fosfatasa alcalina es una glicoproteína que tiene la capacidad de hidrolizar ésteres monofosfatos en tejido mineralizado como hueso, dentina o cemento (Beertsen y Van den Bos. 1991; Chen et al. 2002).

Por ello, la elección de línea celular y trabajar con células en permanente cultivo nos permite realizar una evaluación adecuada de los cambios, independientemente de la edad, y estado metabólico y hormonal del donante, que son factores que pueden condicionar la respuesta de las células, en un cultivo primario (Consiglio et al. 1998).

Así, en nuestro estudio se optó por utilizar líneas celulares estandarizadas, siguiendo la recomendación de la Organización Internacional para la Estandarización para los estudios de toxicidad (ISO 10933-5. 1992. ISO 7405.

1997) ya que permite controlar mejor las condiciones del ensayo.

En cuanto al tipo celular más adecuado, varios autores recomiendan el fibroblasto de ratón (L929) (Schweikl y Schmalz. 1996. Costa et al. 1999). En cambio para MacDougall, el odontoblasto de ratón (MO6-G3) es mucho más sensible que el fibroblasto, y además se considera célula diana en tratamientos pulpares (MacDougall et al. 1998).

Otros ejemplos de líneas celulares usadas son HELA (Lovschall et al. 2002), fibroblasto V79-4 (Lee et al. 2006), fibroblasto gingival humano HGF-1 (Consiglio et al.1998), línea de pseudo-odontoblastos de ratón MDPC-23 (Aranha et al. 2006. Costa et al. 2003. Souza et al. 2006), células pulpares RPC-C24 (Lee et al. 2006). En cuanto a los cultivos primarios más utilizados son los de células pulpares y fibroblastos gingivales (Uhl et al. 2003. Annunziata et al. 2006).

Hemos podido comprobar que hay mucha heterogeneidad en cuanto a las células a utilizar, obteniéndose buenos resultados en todos los casos según los distintos autores.

Eliminación de la caries agresiva o conservadora

El procedimiento descrito para realizar la protección pulpar indirecta en los protocolos de la asociación americana de odontopediatría (AAPD reference manual 2012/13) aconseja eliminar la caries, respetando una última capa de dentina desmineralizada, con una baja concentración de bacterias, con la finalidad de evitar entrar en una pulpa asintomática o con síntomas de pulpitis reversible.

Esta última capa de dentina, debe ser tan fina que si aplicásemos más presión con el excavador provocaríamos una exposición pulpar (Kerkhove et al. 1967).

Esto supone un cambio de mentalidad respecto a la preparación cavitaria tradicional (Fuks. 2005), y supone que es posible controlar la caries, realizando una eliminación conservadora de la caries y sellando adecuadamente la cavidad (Mertz-Fairhurst et al. 1998; Bergenholtz y Spangberg. 2004).

Por otra parte, debemos procurar eliminar toda la caries activa que nos sea posible en la preparación dentaria, incluyendo el uso de detectores de caries pues la presencia de bacterias bajo la restauración provoca una mayor reacción pulpar (Watts y Patterson. 1987).

Existe cierta controversia respecto a hasta que nivel tiene que eliminarse la dentina afectada antes de restaurar la cavidad (Weerheijm y Groen. 1999; Farooq et al. 2000; Straffon y Loos. 2000; Falster et al. 2002; Maltz et al. 2002; Al-Zayer et al. 2003; Kidd. 2004; Marchi et al. 2006).

Ricketts y colaboradores (Ricketts et al. 2006) realizaron una revisión de artículos y concluyeron que hay una mejora significativa de los resultados al eliminar la caries de forma conservadora, preservando una última capa de dentina desmineralizada, frente a la remoción total. A la misma conclusión llegaron Mertz-Fairhurst y colaboradores (1998), al realizar un estudio a diez años sobre la posibilidad de detener la progresión de la caries, sellando adecuadamente la cavidad.

Otros investigadores han hecho recuentos bacterianos después de realizar excavaciones en las que se eliminaba toda la caries (Orhan et al. 2008) incluso con detector de caries para asegurarse de eliminar toda la dentina hipomineralizada (Kidd et al. 1993) y aún así se halló crecimiento bacteriano, aunque en cantidades clínicamente insignificantes, y no se halló diferencia significativa respecto a realizar protección pulpar indirecta y sellar adecuadamente la cavidad.

Influencia de la dentina como barrera de protección

Uno de los factores de éxito del tratamiento pulpar vital es la dentina remanente, pues supone la primera barrera frente a tóxicos y modula la respuesta de la pulpa a ellos (Quinlan et al. 2002). La protección pulpar indirecta consta de una última capa de dentina hipomineralizada, que no eliminamos para evitar la exposición pulpar, en dientes sin sintomatología.

La dentina reduce la toxicidad de materiales dentales, estudios *in vivo* muestran que materiales citotóxicos en ensayos *in vitro* no causan reacciones pulpares significativas cuando se aplican en cavidades clase V (Costa et al. 2003).

Se considera a la dentina una acción buffer, neutralizando protones provenientes de los ácidos. Esto es porque el ácido disuelve superficialmente la hidroxiapatita que libera OH^- y PO_4^{3-} que se unen a los protones del ácido (Hume. 1994). Este efecto buffer se agota rápidamente, y provoca un aumento en la permeabilidad para espesores de 100 μm de dentina remanente, siendo la protección de la barrera dentinaria máxima a partir de 500 μm .

Mediciones de permeabilidad han demostrado que la dentina es una barrera de perfusión/difusión parcial (Hanks et al. 1994). Cuando quedan bacterias bajo una restauración, los productos tóxicos provenientes del metabolismo bacteriano, provocan inflamación pulpar. También se ha demostrado la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas como HEMA o TEGDMA, incluso a través de dentina esclerótica (Hamid y Hume. 1997), aún siendo la dentina esclerótica menos permeable que la dentina normal, debido a la oclusión de los tubulillos (Tay y Pashley. 2004).

En un estudio de Galler y colaboradores se realiza un ensayo llamado prueba de la barrera dentinaria. Consiste en interponer un disco de dentina de un espesor variable entre el cultivo celular y el material de estudio. Esto permite valorar la capacidad buffer de la dentina, y su capacidad para aislar la pulpa, que depende en parte del grosor de la dentina y de la naturaleza del material restaurador. El

autor concluye que si un material es tóxico tras la prueba de la barrera dentinaria, entonces hay que seguir investigándolo con animales, para valorar si los mecanismos de defensa son capaces de contrarrestar este efecto (Galler et al. 2005). Este podría ser el caso del Vitrebond Plus, que como hemos visto presenta unos resultados de citotoxicidad desfavorables, pero un comportamiento clínico bueno.

Se considera que la barrera dentinaria protege completamente de adhesivos autograbantes, explicable por la capacidad buffer de la dentina, parcialmente de ionómeros de vidrio fotopolimerizables, y se muestra ineficaz para adhesivos dentinarios con glutaraldehído (Galler et al. 2005).

Puente de dentina reparativa

Numerosos autores han constatado la presencia de dentina esclerótica tras reabrir la lesión como consecuencia de la remineralización provocada por los odontoblastos pulpares. Esta dentina está más mineralizada, con mayor concentración de fósforo, y es más dura, oscura y seca que la dentina hipomineralizada pasados tres meses del tratamiento. Además, todos estos cambios son apreciables mediante radiografía a los seis meses (Eidelman et al. 1965; Bjørndal et al. 1997; Bjørndal y Larsen. 2000; Massara et al. 2002; Maltz et al. 2002; Oliveira et al. 2006; Pinto et al. 2006; Franzon et al. 2007; Marchi et al. 2008; Orhan et al. 2008).

Por otra parte, materiales como el hidróxido de calcio pueden favorecer la formación de un puente de dentina reparativa, aunque ciertos autores ponen en duda la validez de esta barrera dentinaria, por presentar defectos en túnel e inclusiones celulares. Estos túneles no los causa el hidróxido de calcio, sino que dependen de la severidad de la lesión y los vasos dañados en la exposición. Son los iones de calcio en la capa de pulpa necrótica los responsables de la calcificación distrófica en la necrosis coagulativa (Modena et al. 2009). Las inclusiones celulares de la barrera dentinaria aparecen entre la capa de necrosis y la dentina neoformada (Pereira et al. 2000). Esto puede conducir a

microfiltración y penetración por bacterias, inconveniente que se puede contrarrestar restaurando la cavidad con materiales adhesivos (Goldberg et al. 1984).

En definitiva, la barrera de dentina reparativa se debe entender como una protección mecánica ante la exposición, pero también como una muestra del potencial biológico de los odontoblastos (Modena et al. 2009).

Materiales

La importancia del material utilizado en relación al éxito del tratamiento es relativa. Muchos estudios muestran que más que el material usado, lo que determina la respuesta inflamatoria es la microfiltración. Así que no depende de los materiales en sí, sino de la capacidad de estos para prevenir esa filtración (Cox et al. 1987; Akimoto et al. 1998).

Esto no contradice el hecho de que haya que utilizar materiales lo menos tóxicos posibles, pues se ha demostrado que restos de materiales de resina sin polimerizar liberan componentes tóxicos que difunden a través de los túbulos dañando el tejido pulpar (Gwinnett y Tay. 1998; Costa et al. 2002; Goldberg. 2008), sobretodo en los momentos iniciales, durante e inmediatamente después a la polimerización, más que a largo plazo (Geurtsen y Leyhausen. 2001). Aunque también deben ser tomadas en consideración las sustancias que se liberan debido a la erosión y degradación a lo largo del tiempo, y a causa de la degradación química causada por hidrólisis y catalización enzimática por parte de las esterasas y pseudocolinesterasas salivales (Jaffer et al. 2002).

Estudios *in vivo* han demostrado que esos restos en las proximidades de la pulpa generan una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos (Gwinnett y Tay. 1998. Costa et al. 2003), así como reabsorción dental interna (Costa et al 2002). De aquí se deriva la importancia de polimerizar bien cada capa de material que ubiquemos en la restauración, especialmente la primera.

Otro factor que modula la toxicidad de las restauraciones es el grabado ácido. Al realizar el grabado ácido eliminamos la capa de barrillo dentinario, aumentando la permeabilidad de la dentina ante los productos tóxicos, y favoreciendo la salida de fluido dentinario hacia la cavidad.

La salida de fluido dentinario tras el grabado ácido en cavidades profundas provoca los siguientes efectos:

- Interfiere en la permeabilización del adhesivo dentro de los túbulos dentinarios.
- Inhibe la conversión monómero-polímero.
- Provoca la ruptura de odontoblastos (Costa et al. 2000).

Por todo esto, para muchos autores, el uso de materiales que no precisen grabado puede disminuir la transfusión de los componentes tóxicos, porque no eliminan del todo el barrillo y preservan la morfología dentinaria (Pereira et al 1999. Tay y Pashley. 2000).

Ionómeros de vidrio autopolimerizables y fotopolimerizables.

Los ionómeros de vidrio se utilizan como material de recubrimiento en protección pulpar directa e indirecta porque presentan numerosas ventajas: amortiguan la contracción de polimerización de los composites, son cariostáticos, autoadhesivos y no necesitan grabado ácido (Croll. 2004; Tantbirojn et al. 2009).

En nuestro estudio comparamos un inómero de vidrio autopolimerizable altamente testado y contrastado, como es el Ketac Bond, frente a un ionómero de vidrio fotopolimerizable relativamente poco estudiado: Vitrebond Plus. Este material es similar al Vitrebond convencional, pero con ciertas modificaciones para suministrarlo como pasta-líquido, con un dosificador para facilitar la mezcla en la proporción correcta. Tanto en Vitrebond convencional como en Plus el líquido consiste en ácido polialquenoico, agua, HEMA (Hidroxietil

metaacrilato) y fotoiniciadores. La pasta de Vitrebond Plus contiene algunas resinas (necesarias para conseguir una pasta estable) y cristales reactivos de silicato de fluor aluminio (FAS), a diferencia del polvo de Vitrebond, que son sólo cristales de FAS con algunos modificadores. En un estudio de 2009, Mitra y colaboradores confirman que la adhesión de Vitrebond Plus tanto a esmalte como a dentina es similar a la de Vitrebond convencional, formando ambos una adhesión inmediata con dentina y esmalte que perdura a largo plazo.

Existen opiniones contradictorias sobre si es mejor utilizar un ionómero de vidrio autopolimerizable o fotopolimerizable. En nuestro ensayo, el ionómero autopolimerizable ha mostrado tener mucha menor toxicidad celular que el fotopolimerizable, coincidiendo con lo que también reportan otros estudios (Leyhausen et al. 1998; Costa et al. 2003; Costa et al. 2007; Ribeiro et al. 2006; Selimović-Dragaš et al. 2012), y muestra un pH menos ácido, de aproximadamente 6.5 en el extracto.

En cambio los fotopolimerizables mejoran mucho las propiedades como son: mejor adhesión a dentina y al material restaurador, polimerización más rápida y microfiltración mínima (Mitra. 1991; Gaintantzopoulou et al. 1994).

Muchos autores reportan que los ionómeros de vidrio fotopolimerizables son más ácidos, más tóxicos y generan más reacciones adversas que los autopolimerizables. (Bouillaguet et al. 1996; Leyhausen et al. 1998; Costa et al. 2003; Abbas et al. 2003; Costa et al. 2006; Ribeiro et al. 2006). Según nuestros hallazgos, el Vitrebond Plus también presenta estas características, sin haber mejorado su citotoxicidad respecto al Vitrebond convencional.

Numerosos estudios muestran al Vitrebond convencional como altamente citotóxico con distintos métodos de evaluación (Olivas et al. 1996; Schuster et al. 2001; Costa et al. 2003; Galler et al. 2005), incluso al compararlo con ionómeros de vidrio fotopolimerizables de otras marcas (Aranha et al. 2006). Al aplicar Vitrebond sobre el remanente dentinario, los componentes tóxicos traspasan la dentina a través de los tubulillos y llegan al tejido pulpar, lo cual

activa una respuesta inflamatoria persistente en la que no se forma barrera dentinaria hasta al menos 300 días después (Nascimento et al. 2000).

En un ensayo de toxicidad sobre un cultivo celular de fibroblasto gingival humano se comparó la inhibición en la síntesis de proteínas de cuatro ionómeros de vidrio autopolimerizables frente a dos fotopolimerizables. Los autores hallan que los autopolimerizables reducen la síntesis de proteínas a la mitad, siendo esta inhibición reversible según el material, mientras que los fotopolimerizables la inhiben totalmente. Al igual que otros autores, relacionan estos hechos con la presencia de HEMA, con un mayor descenso en el pH por parte de los ionómeros fotopolimerizables, y por una mayor liberación de flúor (Consiglio et al. 1998).

Además se considera que Vitrebond provoca un claro efecto genotóxico (Ribeiro et al. 2006; Camargo et al. 2009). Los monómeros de resinas de uso dental influyen en el ciclo celular causando daño en el ADN (Schweikl et al. 2006).

Por todo esto, los iónomeros de vidrio fotopolimerizables deberían reservarse para espesores mayores de dentina, estando así contraindicado en protección pulpar indirecta (Costa et al. 2007).

En los estudios realizados previamente sobre la versión convencional de Vitrebond se relaciona la toxicidad con los siguientes factores:

- Liberación de un iniciador de la reacción DPIC₁ (diphenyliodonium chloride) (Geurtsen et al. 1998).
- Toxicidad atribuida al HEMA (Bouillaguet et al. 1996) y TEGDMA, que se añaden porque actúan a la vez como solvente y monómero (Xie et al. 2004). La liberación de HEMA y TEGDMA o la elución de estos cementos ha demostrado inducir efectos citotóxicos (Costa et al. 2003) en células como detención del ciclo celular y apoptosis, depleción intracelular en cultivos celulares, efectos genotóxicos con degradación de ADN e inducción de micronúcleos (fragmentos de cromosomas que no se incorporan al núcleo durante la división celular) (Stanislowski et

al. 2003) aberraciones cromosómicas y retrasos en el ciclo celular (Bakopoulou et al. 2008; Schweikl et al. 2006).

- Se ha relacionado el bajo pH con la viabilidad celular, por ser de 5,5. Según nuestros hallazgos el pH tan ácido del Vitrebond disminuye la viabilidad celular hasta un 40 % aproximadamente.
- Una polimerización deficiente aumenta la toxicidad de materiales que contienen resinas (Quinlan et al. 2002; Aranha et al. 2006; Uhl et al. 2006; Sigusch et al. 2012).

Todo esto contrasta con los excelentes resultados clínicos que se atribuyen a este material (Goldberg. 2008). En un estudio *in vivo* sobre treinta dientes de beagle en que se comparan cuatro ionómeros, incluidos Vitrebond y Ketac Bond, Tarim y colaboradores obtienen buenos resultados para todos, con una respuesta inflamatoria pulpar nula, sin signos de pulpitis o necrosis posterior al tratamiento (Tarim et al. 1994).

Costa y colaboradores (2003) evaluaron la respuesta del complejo dentino-pulpar al restaurar 26 cavidades de clase V profundas en premolares, en uno de los grupos se realizó un grabado ácido y se restauró directamente con adhesivo y composite, en otro grupo se puso un recubrimiento de ionómero de vidrio fotopolimerizable (Vitrebond) previamente al grabado y restauración, y en el tercer grupo igual, pero el recubrimiento era un cemento de hidróxido de calcio autopolimerizable como grupo control. Pasados entre cinco y treinta días, se extrajeron los dientes y se prepararon para evaluarlos al microscopio. Los autores hallaron que la respuesta inflamatoria era mayor en el grupo en que no se puso un recubrimiento, debido a la transfusión de partículas de material a través de los tubulillos, favorecida probablemente por el grabado ácido. Para los autores, la colocación de una base de ionómero de vidrio disminuye la respuesta inflamatoria pulpar en cavidades profundas, y la aplicación de un recubrimiento debe formar parte del protocolo clínico, aunque hay que tener en cuenta que en este estudio las cavidades se realizaron en dientes sanos, por lo que sería necesario comprobar si la reacción al Vitrebond es igual de buena en estado de pulpitis reversible.

También fueron positivos los resultados que obtuvieron Gaintantzopoulou et al. 1994. Realizaron un estudio *in vivo* sobre tres perros beagle con dientes permanentes saludables. Tenían como objetivo comparar las reacciones pulpares de dos cementos de ionómero de vidrio fotopolimerizables (Vitrebond y X-R ionomer), con un ionómero de vidrio autopolimerizable (GC) y óxido de zinc-eugenol como control, en cavidades de clase V en un total de 96 dientes. Se utilizaron fresas nuevas para la cavidad, que se realizó tan profunda como fuese posible, sin exponer la pulpa, aunque en cinco de los dientes se expuso accidentalmente, y estos dientes fueron evaluados por separado. Se dejó el barrillo dentinario en el fondo de las cavidades, y al fraguar el cemento, se restauraron las cavidades con composite. En el caso del óxido de zinc-eugenol, se cubrió con un barniz para evitar que se inhibiera la polimerización de las resinas. Se evaluaron las respuestas pulpares (leve, moderada o severa) en la primera, cuarta y duodécima semanas tras el tratamiento, midiendo el espesor de la dentina remanente, en los casos en que no hubo exposición accidental.

También se valoró la presencia de bacterias mediante la tinción de Brown y Hopps. Los autores obtuvieron un espesor medio de dentina remanente de 395 μm , aunque había especímenes con menos de 50 μm . También hallaron una escasa presencia de bacterias bajo la restauración, sólo en nueve especímenes, uno de los cuales generó una respuesta pulpar moderada, siendo la respuesta de los otros ocho leve. Para los autores, la respuesta a los ionómeros de vidrio auto y fotopolimerizables fue excelente. Añaden además en sus conclusiones, que el manejo clínico de los fotopolimerizables presenta ventajas, pues combina alto tiempo de trabajo, con corto tiempo de polimerización, que se realiza mediante luz ultravioleta.

Esta diferencia entre los resultados *in vitro* y en clínica también los resaltan Costa y colaboradores en 2007, y los relacionan con la influencia de la barrera dentinaria. Otro ejemplo de esto, es un estudio en el que hacían una cavidad en dientes de rata y aplicaban un ionomero. Tras ocho días, los autores observaron una reacción inflamatoria moderada que curaba en menos de treinta días (Six et al. 2000).

Así, algunos autores consideran que Vitrebond Plus y los demás ionómeros de vidrio fotopolimerizables no son adecuados en casos de exposición pulpar o espesores de dentina remanente muy finos, en cambio serán favorables cuando se aplican como bases cavitarias (Müller et al. 1990; Felton et al. 1991; Hilton. 1996; Costa et al. 2003; Costa et al. 2011) o si se cubre previamente la exposición con hidróxido de calcio y así es como nos lo recomienda el propio fabricante. En estas condiciones se ha demostrado que favorecen la formación de puentes de dentina (Tarim et al. 1994).

Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio es un material ampliamente usado en odontología como antiséptico debido a su elevado pH (12 en estado puro, 10 en preparados comerciales), que neutraliza el ácido láctico del metabolismo bacteriano y previene la destrucción dentinaria. Es decir, es bactericida a la vez que activa la remineralización de la dentina (Simon et al. 1995) y crea una necrosis coagulativa en la primera capa de tejido pulpar, que resulta en un efecto positivo pues estimula la migración celular y diferenciación en odontoblastos, para formar un puente de dentina reparativa (Tronstad et al. 1980; Goldberg et al. 2003; Almushayt et al. 2006).

En nuestro trabajo valoramos la toxicidad de un cemento de hidróxido de calcio fotopolimerizable como es el Calcimol LC. Según un estudio de Subramaniam presenta un pH inferior a otras bases de hidróxido de calcio (Subramaniam et al. 2006), lo cual mejoraría su toxicidad, aunque esa pérdida de alcalinidad podría disminuir sus propiedades beneficiosas antisépticas respecto al hidróxido de calcio puro o a un cemento autopolimerizable. Según nuestro estudio presenta una citotoxicidad muy alta a concentración total, que va mejorando a partir de la dilución a la media, y que según va descendiendo la concentración va obteniendo un mejor resultado, más biocompatible que Vitrebond Plus, pero menos que Ketac Bond y Fluoroseal.

En un ensayo *in vitro* en que también se comparaban ionómeros de vidrio y

cementos de hidróxido de calcio, en este caso autopolimerizables, obtuvieron un resultado similar al nuestro, con unos buenos resultados de biocompatibilidad a favor de los cementos de hidróxido de calcio, frente a los ionómeros de vidrio, aunque en este caso se esperó durante 48 horas para asegurarse de que los cemento endurecían totalmente (Müller et al. 1990).

En un ensayo *in vivo*, Costa y colaboradores (2011) realizaron cavidades profundas en 34 premolares en humanos, y emplearon como base cavitaria dos ionómeros de vidrio y un cemento autopolimerizable de hidróxido de calcio (Dycal), para posteriormente restaurar las cavidades con composite. Pasados unos periodos de 7 y entre 30 y 60 días, se extrajeron y se procesaron histológicamente los dientes, hallando que la mejor respuesta fue para el dycal, pues sólo un espécimen mostró un respuesta inflamatoria moderada a los 7 días, y ninguna respuesta en el periodo de entre 30 y 60 días.

Modena y colaboradores en una revisión concluyen que el hidróxido de calcio debe ser la primera elección por ser el único material que sí estimula la formación de dentina reparativa, y que cualquier adhesivo dentinario o ionómero de vidrio modificado con resina va a aportar una gran toxicidad (Modena et al. 2009).

Otros autores en cambio difieren, y consideran al hidróxido de calcio como un material potencialmente irritante (Goldberg et al. 2003; Almushayt et al. 2006). Si valoramos su biocompatibilidad encontramos resultados desfavorables, como los de Camargo, que realizó un estudio en que el hidróxido de calcio fue más tóxico que MTA y cemento de aceite de ricino, pero menos que Vitrebond (Camargo et al. 2009), aunque también se comprobó que el hidróxido de calcio no provocaba daños en el ADN ni influye en el ciclo celular. En otro estudio se compara un cemento de hidróxido de calcio con adhesivo dentinario y ácido hialurónico, aportando tanto el cemento de hidróxido de calcio como el adhesivo resultados similares, siendo menos biocompatibles que el otro material (Bogovic et al. 2011). Otros autores han valorado la citotoxicidad de cementos de hidróxido de calcio, en este caso autopolimerizable tipo Dycal, y

han hallado que causa hasta un 80% de muerte celular, frente a un 40% de otros recubrimientos como flow line o durafill. (Furey et al. 2010).

Mickenausch y colaboradores (2010) realizaron un revisión sistemática cuantitativa para valorar si la respuesta pulpar es mejor cuando se utilizan cementos de hidróxido de calcio o de ionómero de vidrio. Requerían ensayos clínicos longitudinales que contuviesen tablas de datos. Para ello realizaron una búsqueda en cinco bases de datos: Biomed Central, Cochrane, Directorio de Revistas de Acceso Libre, PubMed y Science-Direct, usando los términos “Dental Pulp” o “Dental Pulp Necrosis” o “Dental Pulp Devitalization” y “Glass Ionomer Cements” y “Calcium Hydroxide”. Tras analizar los seis artículos que cumplían los requisitos de inclusión, y que contenían un total de dieciocho tablas de datos acerca de la respuesta inflamatoria pulpar, remineralización, filtración bacteriana y los cambios en la capa odontoblástica, los autores concluyen que no hay evidencia de que los cementos de ionómero de vidrio sean superiores a aquellos con base de hidróxido de calcio.

Por ello, convendría profundizar en futuros estudios en la comparación entre hidróxidos de calcio auto y fotopolimerizables, tanto en su toxicidad, como en sus resultados clínicos, para ver cual se adecúa mejor a las necesidades de la protección pulpar indirecta, y de los tratamientos pulpares en general.

Hidroxiapatita

Aunque no existe bibliografía referente al fluoroseal, el fabricante lo presenta como una sal cálcica de hidroxiapatita con fluoruro sódico, de alta biocompatibilidad, capacidad para crear dentina secundaria similar al hidróxido de calcio, mayor dureza y estabilidad frente a flúidos que el ionómero de vidrio, por lo que sella mejor, y mantiene la liberación de calcio y flúor, aunque no se ha podido contrastar esta información. La falta de información sobre este material fue la principal motivación para incluirlo en nuestro estudio.

Encontramos artículos a favor y en contra del uso de la hidroxiapatita como biomaterial en tratamientos pulpares.

En un estudio sobre premolares que habían de ser extraídos por motivos ortodóncicos observan que la hidroxiapatita no induce la formación de una barrera dentinaria en el sitio de la exposición, sólo genera un infiltrado inflamatorio leve. Al compararlo con un cemento de hidróxido de calcio autopolimerizable (Dycal), la respuesta inflamatoria de la hidroxiapatita fue casi nula, y sí se formó un puente de dentina terciaria (Sübay y Aşci. 1993).

En cambio para Alliot- Licht y colaboradores (1994), en un estudio *in vitro* con hidróxido de calcio, las células expuestas muestran alteraciones dramáticas en su morfología, síntesis de ADN, actividad de fosfatasa alcalina y síntesis protéica, acorde con la necrosis que se crea *in vivo*. Con hidroxiapatita se vio actividad fagocítica de los fibroblastos pulpares contra las partículas menores de 10 micras, y en consecuencia, la síntesis de ADN se vio afectada, así como la actividad de la fosfatasa alcalina. Estos efectos no son señal de daño celular pues se observó actividad metabólica en las células, sólo supone la detención de la fase de diferenciación de los fibroblastos. Confirman una buena respuesta biológica para ser un material sintético, así como otros autores consultados (Boone y Kafrawy. 1979), lo cual va en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Otro autor evaluó la capacidad de sellado de Fluorseal, hallando que tiene una pobre capacidad para prevenir la microfiltración, por lo que no deberá usarse como material restaurador en solitario, ni para cavidades tipo sándwich abierto (Ramos et al. 2002).

Una o dos sesiones

Existe cierta controversia acerca de si se debe realizar el tratamiento en una visita, en la que se restaura el diente de forma definitiva, o en dos sesiones. Incluso se ha valorado si esta filosofía es errónea y si se debería eliminar completamente la caries (Razy. 1999), aunque numerosos autores son partidarios de una eliminación conservadora de la dentina cariada (Farooq et al.

2000; Straffon y Loos. 2000; Falster et al. 2002; Al-Zayer et al. 2003; Marchi et al. 2006; Ricketts et al. 2006; Orhan et al. 2008).

Se han realizado diversos estudios clínicos sobre pacientes para valorar si la caries progresa o no cuando, en vez de eliminar toda la caries, preservamos una última capa de dentina desmineralizada. Se tomaron muestras bacteriológicas de cavidades en que no se había eliminado completamente la caries para evitar la exposición pulpar, previas a la aplicación de un material restaurador. Tras un tiempo se eliminaba el material restaurador y se repetía la evaluación bacteriológica (Nordstrom et al. 1974; Bjørndal et al. 1997; Bjørndal y Larsen. 2000; Maltz et al. 2002; Pinto et al. 2006).

Entre estos estudios había diferencias en la profundidad de la lesión, la cantidad de dentina cariada eliminada en la excavación inicial, el material restaurador usado, y el tiempo de latencia para la reentrada, pero en general detectaron una disminución del número y tipo de bacterias, y la dentina apareció como un tejido más oscuro, seco y duro. Es decir, revelaron la evidencia de que se inactiva la caries remanente en la cavidad (Kidd. 2004). Estos hallazgos hicieron plantear realmente la necesidad de una segunda fase para reapertura.

Numerosos autores concluyen que el tratamiento presenta buenos resultados si se realiza tanto en una como en dos visitas (Kennedy y Kapala. 1985; Bjørndal et al. 1997; Fuks. 2000; Bergenholtz y Spangberg. 2004; Kidd. 2004; Bjørndal y Kidd. 2005).

La justificación de la protección pulpar indirecta es que quedan muy pocas bacterias en el fondo de la cavidad y que una vez la lesión es sellada quedarán inactivas. Esto contradice a la técnica en dos tiempos, en la cual se realiza una reentrada para confirmar la formación de dentina reaccionaria, momento en que se puede causar accidentalmente la exposición pulpar (Dumsha y Hovland. 1985).

Distintos autores aportan los siguientes argumentos a favor de realizar el tratamiento en una sola fase:

- No hay evidencias que respalden la reentrada a la cavidad. Es más, la segunda visita puede provocar la exposición pulpar y dañar la pulpa (Dumsha y Hovland. 1985. Kennedy y Kapala. 1985).
- La presencia de microorganismos a baja concentración, inferior a 1×10^2 CFU/ml (CFU=collony forming units), es clínicamente insignificante (Kidd et al. 1993).
- El proceso carioso es guiado por la actividad en el biofilm, así que el proceso debería detenerse simplemente sellando la cavidad (Kidd. 2004).
- Optimización del tiempo de tratamiento, lo cual es muy importante cuando se trata con pacientes infantiles.
- En cambio, otros autores argumentan a favor de la protección pulpar en dos sesiones:
 - En caso de que la restauración fracase se dejará a la nueva caries en un estado muy avanzado (Ricketts. 2001).
 - La sesión en que se realiza la excavación final ayuda a controlar clínicamente la reacción del diente y permite eliminar lo que queda de dentina desmineralizada antes de realizar la restauración definitiva (Bjørndal y Kidd. 2005).
 - Es útil como método diagnóstico (Bjørndal. 2008).

Los autores que abogan por el tratamiento en dos sesiones justifican este procedimiento principalmente por dos motivos: para poder comprobar la reacción favorable del diente, y para poder eliminar los restos de caries de lenta progresión que puedan quedar (Bjørndal. 2008). Hay una serie de artículos en los que se basan (Law y Lewis. 1961; Nordstrom et al. 1974; Bjørndal et al. 1997; Bjørndal y Thylstrup. 1998; Bjørndal y Larsen. 2000), pero la tendencia de los últimos años y de la mayoría de los trabajos, respalda la realización del tratamiento en una sola visita (Hawes et al. 1964; Eidelman et al. 1965; Aponte et al. 1966; Fairbourn et al. 1980; Straffon et al. 1991; Ribeiro et al. 1999; Farooq et al. 2002; Falster et al. 2002; Massara et al. 2002; Al-Zayer et al. 2003; Kidd.

2004; Marchi et al 2006; Pinto et al. 2006; Franzon et al. 2007; Marchi et al. 2008).

En un estudio (Orhan et al. 2008) se compara el descenso en recuentos bacterianos entre las distintas fases del tratamiento en dos visitas. Para ello diferencian la fase 1, que es cuando limpian toda la caries y colocan el recubrimiento, la fase 2 que es al reabrir pasados tres meses, antes de la excavación final, y la fase 3 que es tras la excavación final en la que se eliminan los restos de caries que puedan quedar. Los autores hallan diferencias estadísticamente significativas en los recuentos bacterianos entre las fases 1 y 2, y entre las fases 1 y 3, pero no entre las fases 2 y 3, lo cual apoya la idea de que se debe realizar el tratamiento en una sola fase. Aponte (Aponte et al. 1966) cultivó la dentina entre 6 y 46 meses después del tratamiento con hidróxido de calcio y amalgama (media de 29 meses), hallándola estéril en el 93% de los casos.

En cambio, en una revisión, Lars Bjørndal (2008) concluye que no existen suficientes ensayos clínicos randomizados, y que no se puede determinar cuál de las dos opciones es mejor. Además añade, que la excavación en dos pasos puede favorecer el cambio de hábitos clínicos, en los que se realizaba una eliminación demasiado agresiva de la dentina cariada.

Pulpotomía o protección pulpar indirecta

Para caries profundas en dientes primarios, las indicaciones de protección pulpar indirecta y pulpotomía son similares (Coll. 2008): lesiones por caries profundas, siempre que el diente esté clínica y radiográficamente vital, o con pulpitis reversible. En el caso de la protección pulpar indirecta se evita la exposición pulpar para favorecer la curación, y en la pulpotomía se elimina toda la caries, y la pulpa cameral. Se considera que existe riesgo de provocar una exposición pulpar cuando al evaluar la radiografía la caries ha progresado unas $\frac{3}{4}$ partes del espesor de la dentina (Bjørndal y Thylstrup. 1998).

Así, cuando no hay exposición pulpar por caries, la capacidad de reparación de la pulpa puede ser excelente, dependiendo de la profundidad de la lesión como comentamos anteriormente, en cambio, tras la exposición pulpar la capacidad de reparación es totalmente impredecible.

También se ha demostrado que cuando hay historia de dolor, la cámara pulpar tiene un área necrótica que se extiende a las raíces (Lin y Langeland. 1981). Estos hallazgos son aplicables a dentición primaria, porque presentan cambios muy similares cuando inician la defensa a caries profundas, un grado similar de vasodilatación y formación de vasos nuevos cuando avanza la caries (Rodd. 2005).

Eliminar toda la dentina hipomineralizada conlleva el riesgo por parte del dentista de introducir partículas de dentina infectada dentro de la cámara pulpar, aumentando el riesgo de iniciar una pulpitis irreversible (Bergenholtz y Spangberg. 2004).

Al valorar las tasas de éxito de la pulpotomía, encontramos que es del 90% en el primer año y disminuye al 70% a los 3 años (Vij et al. 2004; Casas et al. 2004). Estos datos varían mucho en función del material que se emplea, por ejemplo el MTA tiene una tasa de éxito superior al 90% (Eidelman et al. 2001) y con muy pocos estudios a más de 2 años (Holan et al. 2005). También se muestra variabilidad en los resultados entre usar restauraciones de amalgama o coronas de acero (Farooq et al. 2000. Holan et al. 2002).

En cambio, según los distintos autores, la protección pulpar indirecta tiene un éxito del 90% o más independientemente de la técnica usada, base cavitaria, restauración y plazos de tiempo. Se han valorado resultados usando distintos materiales como son hidróxido de calcio (Nirschl y Avery. 1983. Falster et al. 2002. Al-Zayer et al. 2003), ionomero de vidrio (Farooq et al. 2000. Vij et al. 2004) o ningún material (Falster et al. 2002), con buenos resultados en todos los casos. Incluso realizando el estudio con alumnos universitarios con disparidad de habilidad y conocimientos, el éxito llegaba a ser del 95% (Al-Zayer

et al. 2003).

El tipo de restauración no afecta al éxito del tratamiento, siempre que selle adecuadamente (Vij et al. 2004). Incluso cuando no se utilizaba una base y el composite se adhería mediante adhesivos a la dentina desmineralizada se reportaba un éxito superior al 90% (Falster et al. 2002).

Para algunos autores, otro factor a tener en cuenta es el aumento en la exfoliación temprana de dientes pulpotomizados, pues más del 35% se exfoliaban significativamente antes que los no pulpotomizados, mientras que los dientes temporales que recibían protección pulpar indirecta se exfoliaban con normalidad (Falster et al 2002; Vij et al 2003).

Los materiales de uso en pulpotomía también son importantes. Existe cierta controversia acerca del potencial carcinogénico del formocresol (Judd y Kenny. 1987). Según la agencia internacional de investigación sobre cáncer, el formaldehído es cancerígeno en humanos (IARC. 2004), causando cáncer de nasofaringe, cavidad nasal, senos paranasales, y posiblemente leucemia. En cambio otros estudios consideran que tiene un potencial carcinogénico nulo en condiciones de baja exposición (Milnes. 2006).

Puesto que existen estas dudas, se han propuesto numerosos materiales para sustituir al formocresol, como son el hipoclorito sódico (Vargas et al. 2006), electrobisturí (Sasaki et al. 2002), láser (Saltzman et al. 2005), hidroxido de calcio (Schröder. 1978) proteína morfogénica de hueso (BMP) (Nakashima. 1994), sulfato férrico (Smith et al. 2000) o MTA (Holan et al. 2005) dando este último muy buenos resultados (Fuks. 2008).

Se puede concluir que si un diente primario tiene una caries profunda sin sintomatología, permanecer fuera de la pulpa en dientes vitales aumenta mucho la tasa de éxito (Coll. 2008), además, la protección pulpar indirecta es un tratamiento que tiene menor coste, mayor éxito a largo plazo y mejor patrón exfoliativo.

Influencia del pH en la toxicidad de los materiales

Observamos mediante controles que el pH es una variable inespecífica que puede influir en la viabilidad celular, por lo que parte de la citotoxicidad podría deberse a la acidez o alcalinidad del material.

Al valorarlo en el ensayo, se halló que un pH de 5,5 (correspondiente al Vitrebond Plus) reduce esta viabilidad en un 60%, y un pH 8,5 (Calcimol LC) la reduciría en un 37%, por lo que convendría profundizar en el estudio de la influencia del pH sobre la viabilidad celular.

Así, habría que valorar qué parte de la toxicidad que se le atribuye a los ionómeros fotopolimerizables proviene de la presencia del HEMA que liberan, aún estando bien polimerizados, de la propia acidez del material, o de la posible influencia que esta acidez tenga para favorecer la proliferación de bacterias bajo la restauración.

A su vez, el Calcimol LC es un cemento de hidróxido de calcio, y como hemos visto anteriormente su acción bactericida depende del pH alcalino, por lo que conviene formular un material con un pH óptimo, que sea suficientemente bactericida, sin ser demasiado citotóxico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El uso de líneas celulares estandarizadas es adecuado para realizar ensayos de toxicidad de materiales mediante el método de elución, pudiendo optarse también por cultivos primarios.
2. Los datos obtenidos reflejaron que el material más biocompatible al aplicarlo en los cultivos celulares fue el cemento de ionómero de vidrio autopolimerizable (Ketac Bond), y el que indujo una mayor citotoxicidad fue el ionómero de vidrio fotopolimerizable (Vitrebond Plus). Los otros dos materiales, un cemento fotopolimerizable de hidróxido de calcio (Calcimol LC) y un cemento fotopolimerizable de hidroxiapatita (Fluoroseal) obtuvieron resultados similares entre sí, y fueron ligeramente más citotóxicos que Ketac Bond.
3. El análisis estadístico de los resultados obtenidos no mostró diferencias significativas entre los distintos materiales a la concentración total, pero sí para las distintas diluciones ($P < 0,05$). Todos excepto Calcimol LC y Fluoroseal, que fueron muy similares entre sí.
4. El ensayo también mostró que las desviaciones en el pH disminuyen la viabilidad celular. Un pH ácido de 5,5 puede disminuir la viabilidad hasta en un 60%, y un pH básico de 8,5 en un 37%.
5. En el análisis al microscopio se comprobaron los efectos de la citotoxicidad de los distintos materiales sobre las células, que perdían la morfología fusiforme, mostraron irregularidades, defectos en el núcleo, roturas en la membrana, y finalmente aparecían muertas en suspensión.

BIBLIOGRAFÍA

- *Abbas A, Lichtman A. Cytokines. En: Abbas A, Lichtman A, eds. Cellular and molecular immunology. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003;243-74.
- *Abbasi J, Rahmat AB. The pH variation in calcium hydroxide liners. *Quintessence Int.* 1987;18:225-6.
- *Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Cox CF. Biocompatibility of clearfil liner bond 2 and clearfil AP- X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int.* 1998;29:177-88.
- *Alacam A. Long term effects of primary teeth pulpotomies with formocresol, glutaraldehyde-calcium hydroxide and glutaraldehyde-zinc oxide eugenol on succudaneous teeth. *J Pedod.* 1989 Summer;13(4):307-13.
- *Ali H, Maroli S. Glass ionomer cement as an orthodontic bonding agent. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Sep 1;13(5):650-4
- *Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 1994 Jun;39(6):481-9.
- *Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy.* 2006;13:611-20.
- *Alomari QD, Reinhardt JW, Boyer DB. Effect of liners on cusp deflection and gap formation in composite restorations. *Oper Dent.* 2001 Jul-Aug;26(4):406-11.
- *Álvarez Álvarez IM, Rúaiz del Árbol López J, Cortes Lillo O. Tratamientos pulpares en dentición permanente joven. En: *Odontopediatría, la evolución del niño al adulto joven.* Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, Planells. Ed: Ed Ripano (Madrid) 2011. p: 351-60.
- *Al-Zayer MA, Straffon LH, Feigal RJ, Welch KB. Indirect pulp treatment of primary posterior teeth: a retrospective study. *Pediatr Dent.* 2003;25:29-36.
- *American Academy of Pediatric Dentistry. Guidelines on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr. Dent.* 2012 Reference Manual; 34: 222-229.
- *American National Standards Institute/American Dental Association Document no. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. Council on Dental Materials and Devices. *J Am*

Dent Assoc. 1979.

*Anderson RW, Powell BJ, Pashley DH. Microleakage of IRM used to restore endodontic access preparations. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:137-41.

*Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol.* 2002 Jun;18(3):134-7.

*Andreasen JO, Ravn JJ. Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanente teeth in a Danish population sample. *Int J Oral Surg.* 1972;1:235-9.

*Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, Guida L. In vitro biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dent Mater.* 2006 Dec;22(12):1081-5.

*Aponte Aj, Hartsook Jt, Crowley MC. Indirect pulp capping success verified. *J Dent Child.* 1966;33:164-6.

*Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006 Sep;22(9):864-9.

*Ayna B, Celenk S, Atakul F, Sezgin B, Ozekinci T. Evaluation of clinical and microbiological features of deep carious lesions in primary molars. *J Dent Child.* 2003;70:15-8.

*Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AD, Giassin DP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2009 Jan 31;672(2):103-12.

*Bal C, Alacam A, Tuzuner T, Tirali RE, Baris E. Effects of antiseptics on pulpal healing under calcium hydroxide pulp capping: a pilot study. *Eur J Dent.* 2011 Jul;5(3):265-72.

*Baume LJ The biology of pulp and dentin. En: Myers HM, de. *Monographs in oral science*; Basel, Switzerland: Karger, 1980:67-182.

*Beer R, Gängler P, Wutzler P, Krehan F. Comparative biological testing of Ketac-Bond glass ionomer cement. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1990 Apr;45(4):202-8.

*Beertsen W, Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of

- afibrillar acellular cementum. *J Dent Res.* 1991 Mar;70(3):176-81.
- *Bergenholtz G. Factors in pulpal repair after oral exposure. *Adv Dent Res.* 2001;15:84.
- *Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA. Bacterial leakage around dental restorations and bacterial growth in cavities. *J Oral Pathol.* 1982; 11:439-50.
- *Bergenholtz G, Spangberg L. Controversies in endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:99-114.
- *Bernick S, Nedelman C. Effect of aging on the human pulp. *J Endod.* 1975 Mar;1(3):88-94.
- *Bjørndal L. Indirect pulp therapy and stepwise excavation. *Pediatr Dent.* 2008 May-Jun;30(3):225-9. Review.
- *Bjørndal L, Kidd EAM. The treatment of deep dentine caries lesions. *Dent Update* 2005;32:402-13.
- *Bjørndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res.* 1997;31:411-7.
- *Bjørndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.* 2000; 34: 502-8.
- *Bjørndal L, Mjor IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry: 4-dental caries: characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence Int* 2001;32:717-36.
- *Bjørndal L, Thylstrup A. A practice-based study on stepwise excavation of deep carious lesions in permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998;26:122-8.
- *Bishop MA, Malhotra M. An investigation of lymphatic vessels in the felinedental pulp. *Am J Anat.* 1990 Mar;187(3):247-53.
- *Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc.* 2008 Mar;139(3):305-15.
- *Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2011 Jun 1;62(2):155-61.
- *Boj, JR, Cortés O. Endodoncia en la dentición temporal. En *Endodoncia.*

Técnicas clínicas y bases científicas. Canalda Sahli C, Brau Aguade E. 2ª edición Masson 2006: 277-88.

*Bonecker M, Toi C, Cleaton-Jones P: Mutans streptococci and lactobacilli in carious dentin before and after atraumatic restorative treatment. *J Dent* 2003; 31: 423-8.

*Boone ME, Kafrawy AH. Pulp reaction to a tricalcium phosphate ceramic capping agent. *Oral Surg* 1979;47:369-71

*Borum MK, Andreasen JO. Sequelae of trauma to primary maxillary incisors: I – complications in the primary dentition. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14:31-44.

*Boskey AL. Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. *J Dent Res.* 1997 Aug;76(8):1433-6.

*Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Giuichi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. *J Endod* 1996; 22:244-8.

*Brännström M. Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with restorative treatment. *Oper Dent.* 1984 Spring;9(2):57-68.

*Brännström M. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod.* 1986 Oct;12(10):453-7.

*Browning WD. The benefits of glass ionomer self-adhesive materials in restorative dentistry. *Compend Contin Educ Dent* 2006;27(5):308-14.

*Bruce GR, McDonald NJ, Sydiskis RJ. Cytotoxicity of retrofill materials. *J. Endodont.* 1993;19: 288-92.

*Byers M, Narchi M. The dental injury model: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptors functions. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:4.

*Caballín A, Peréa B, De Agustín D, Sánchez JA. Valoración de los cambios histológicos pulpaes para la determinación de la data de la muerte. *Cient dent.* 2010;7;1:9-13.

*Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweickl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009 Mar;42(3):227-37.

- *Camp JH. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. *Pediatr Dent.* 2008 May-Jun;30(3):197-205.
- *Camp JH, Fuks AB. Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. En: Cohen S, Hargreaves K, eds. *Pathways of the pulp* 9th ed. St. Louis, Mo: Mosby, 2006:822-82.
- *Campbell A, Coll JA. Thesis: diagnostic success of the glass ionomer sedative filling determining pulpal vitality in primary molars with deep caries. 2007: Baltimore, MD: University of Maryland Pediatric Dental Department.
- *Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* 2005; 25:101-8.
- *Casagrande L, Bento LW, Dalpian DM, García-Godoy F, de Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. *Am J Dent.* 2010 Feb;23(1):34-8.
- *Casas MJ, Kenny DJ, Johnston DH, Judd PL. Long-term outcomes of primary molar ferric sulfate pulpotomy and root canal therapy. *Pediatr Dent.* 2004;26:44-8.
- *Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *International Endodontic Journal.* 2005; 38: 505-9.
- *Chen CC, Chen RC, Huang ST. Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jun 5;60(3):452-7.
- *Cho E, Kopel H, White SN. Moisture susceptibility of resin-modified glass-ionomer materials. *Quintessence Int.* 1995;26:351-8.
- *Coll JA. Indirect pulp capping and primary teeth: Is the primary tooth pulpotomy out of date?. *Pediatr Dent.* 2008 May-Jun;30(3):230-6.
- *Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, Di Jeso B. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Archives of Oral Biology.* 1998; 43(1):65-71.
- *Correa JA. Biocompatibilidad: conceptos básicos. Pontificia Universidad

Javeriana. Bogotá; 2000.

*Cortés O, Boj JR. Tratamientos pulpares en dentición temporal. En: Odontopediatría, la evolución del niño al adulto joven. Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, Planells. Ed: Ed Ripano (Madrid) 2011. p337-350.

*Cortés O, Boj JR, Canalda C, Carreras M. Pulpal tissue reaction to formocresol vs. ferric sulfate in pulpotomized rat teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 1997 Spring;21(3):247-53.

*Cortés O, Boj J.R., Canalda C. Estado actual de los distintos fármacos utilizados en las pulpotomías en dentición primaria. *Endodoncia.* 1995;13:178-186.

*Cortés O, García-Ballesta C, Pérez L, Boj J, Alcaina A. Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2006;7(2):96-9.

*Costa CA, Giro EM, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mater.* 2003 Dec;19(8):739-46.

*Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003;24:3853-8.

*Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, 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 Jul;27(7):e158-70.

*Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: A review. *Dent Mater.* 2000 May;16:188-97.

*Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater* 2002;18:544-52.

*Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethylmethacrylate. *ASDC J Dent Child.* 1999;66(5):337-42.

*Costa CA, Teixeira HM, Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod.* 2000;26(9):512-6.

- *Costa CAS, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81(1):175-84.
- *Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999 Nov;15(6):434-41.
- *Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Mills JC. Biological basis for clinical success: pulp protection and the tooth-restoration interface. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1999;11:819–26.
- *Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bengenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulp. *J Prosth Dent.* 1987;57:1–8.
- *Croll TP. The “sandwich” technique. *J Esthet Restor Dent.* 2004;16:210-2.
- *Croll TP, Bar-Zion Y, Segura A, Donly KJ. Clinical performance of resin-modified glass ionomer cement restorations in primary teeth. A retrospective evaluation. *J Am Dent Assoc.* 2001;132:1110-6.
- *Croll TP, Nicholson JW. Glass ionomer cements in pediatric dentistry: review of the literature. *Pediatr Dent.* 2002 Sep-Oct;24(5):423-9.
- *Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontol Revy.* 1972;23(1):27-44.
- *Cvek M. Prognosis of luxated nonvital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha: a retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol.* 1992;8:45–55.
- *Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent.* 2012 Spring; 36(3):263-8.
- *Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *J Hist Dent.* 2008 Spring;56(1):9-23.
- *Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* 2001;32(3):211-20.

- *DeRosa TA. A retrospective evaluation of pulpotomy as an alternative to extraction. *Gen Dent*. 2006 Jan-Feb;54(1):37-40.
- *Doherty PJ. Biocompatibility evaluation of glass ionomer cement using cell culture techniques. *Clin Mater*. 1991;7(4):335-40.
- *Donly KJ, Grandgenett C. Dentin demineralization inhibition at restoration margins of Vitremer, Dyract and Compoglass. *Am J Dent*. 1998;11:245-8.
- *Donly KJ, Segura A, Kanellis M, Erickson RL. Clinical performance and caries inhibition of resin-modified glass ionomer cement and amalgam restorations. *J Am Dent Assoc*. 1999;130:1459-66.
- *D'Souza RN, Cavender A, Sood R, Tarnuzzer R, Dichinson D, Roberts A. Dental abnormalities in mice lacking functional TGF-1. *Int J Dev Biol*. 1998;23:119-31.
- *Dumsha T, Hovland E. Considerations and treatment of direct and indirect pulp-capping. *Dent Clin North Am*. 1985;29:251-9.
- *Eidelman E, Finn S, Koulourides T. Remineralization of carious dentin treated with calcium hydroxide. *J Dent Child*. 1965; 32:218-25.
- *Eidelman E, Holan G, Fuks AB. Mineral trioxide aggregate vs formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. *Pediatr Dent*. 2001;23:15-8.
- *Eidelman E, Ulmansky M, Michaeli Y. Histopathology of the pain in primary incisors with deep dentinal caries. *Pediatr Dent*. 1992; 14:1372-5.
- *Fairbourn DR, Charbeneau GT, Loesche WJ. Effect of improved Dycal and IRM on bacteria in deep carious lesions. *J Dent Am Assoc*. 1980;100: 547-52.
- *Falster CA, Araujo FB, Straffon LH, Nor JE. Indirect pulp treatment: In vivo outcomes of an adhesive resin system vs calcium hydroxide for protection of the dentin-pulp complex. *Pediatr Dent*. 2002;22:278-86.
- *Farooq NS, Coll JA, Kuwabara A, Shelton P. Success rates of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in the treatment of deep dentinal caries in primary teeth. *Pediatr Dent*. 2000;22:278-86.
- *Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol*. 1985;30(8):609-13.
- *Felton DA, Cox CF, Odom M, Kanoy BE. Pulpal response to chemically cured

and experimental light-cured glass-ionomer cavity liners. *J Prosthet Dent.* 1991;65:704-12.

*Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990;6:282-7.

*Fitzgerald M, Ghiego JD Jr, Heis R. Autoradiographic analysis of odontoblasts replacement following pulp exposures in primate teeth. *Arch Oral Biol.* 1990;35:707-15.

*Fitzgerald M, Heys RJ. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal treatment in human teeth. *Oper Dent.* 1991;16:101-12.

*Franzon R, Casagrande L, Pinto AS, García-Godoy F, Maltz M, de Araujo FB. Clinical and radiographic evaluation of indirect pulp treatment in primary molars: 36 months follow-up. *Am J Dent.* 2007 Jun;20(3):189-92.

*Franzon R, Gomes M, Pitoni CM, Bergmann CP, Araujo FB. Dentin rehardening after indirect pulp treatment in primary teeth. *J Dent Child.* 2009 Sep-Dec;76(3):223-8.

*Frencken JE, Holgrem CJ. Atraumatic Restorative Treatment for dental caries. STI book Bv, Nijmegen. 1999. pp 76-77.

*Frencken JE, Makoni F, Sithole WD. Atraumatic restorative treatment (ART) and glass ionomer sealants in a school oral health programme in Zimbabwe: evaluation after one year. *Caries Res.* 1996;30:428-33.

*Freund M, Munksgaard EC. Enzymatic degradation of Bis-GMA/ TEGDMA polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res.* 1990;98:351-5.

*Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod.* 2005(31):376-9.

*Friedl KH, Powers JM, Hiller KA. Influence of different factors on bond strength of hybrid ionomers. *Oper Dent.* 1995 Mar-Apr;20(2):74-80.

*Fuks AB. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dent Clin North Am.* 2000; 44:571-96.

*Fuks AB. Current concepts in vital primary pulp therapy. *Eur J Paediatr Dent.* 2002;3:115-20.

*Fuks AB. Pulp therapy for primary dentition. En: Pinkham JR, Casamassimo

PS, Fields HW Jr, McTigue DJ, Nowak AJ, eds. *Pediatric Dentistry: Infancy through adolescence*. 4^a ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2005: 375-94.

*Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: New directions and treatment perspectives. *Pediatr Dent*. 2008 May-Jun;30(3):211-9.

*Fuks AB, Araujo FB, Osorio LB, Hadani PE, Pinto AS. Clinical and radiographic assessment of Class II esthetic restorations in primary molars. *Pediatr Dent*. 2000;22:479-85.

*Fuks AB, Cosack A, Klein H, Eidelman E. Partial pulpotomy as a treatment alternative for exposed pulps in crown-fractured permanent incisors. *Endod Dent Traumatol*. 1987;3:100-2.

*Fukuda R, Yoshida Y, Nakayama Y, Okazaki M, Inoue S, Sano H, Suzuki K, Shintani H, Van Meerbeek B. Bonding efficacy of polyalkenoic acids to hydroxyapatite, enamel and dentin. *Biomaterials*. 2003 May;24(11):1861-7.

*Fulling HJ, Andreasen JO. Influence of maturation status and tooth type of permanent teeth upon electrometric and thermal pulp testing procedures. *Scand J Dent Res* 1976;84:286-90.

*Furey A, Hjelmhaug J, Lobner D. Toxicity of Flow Line, Durafill VS, and Dycal to dental pulp cells: effects of growth factors. *J Endod*. 2010 Jul;36(7):1149-53.

*Fusayama T. Pulp capping following removal of infected dentin using the Caries Detector. *Phillip J Restaur Zahnmed*. 1988 Apr;5(2):105-7.

*Ghafoor R. Post-traumatic apexogenesis of immature non-vital permanent incisors. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2012 Jul;22(7):452-4.

*Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmarlz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod*. 2005 May;31(5):396-9.

*Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy AH. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent*. 1994 Feb;7(1):39-42.

*Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent*. 1996;24:125-8.

*Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical–biological interaction of the resin monomer triethyleneglycoldimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res*. 2001;

80:2046-50.

*Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998;77:2012-9.

*Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2010 Aug;6(8):2863-73. Epub 2010 Feb 1. Review.

*Goering AC, Camp JH. Root canal treatment in primary teeth: a review. *Pediatr Dent.* 1983;5:33-7.

*Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12(1):1-8.

*Goldberg F, Massone EJ, Spielberg C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. *J Endod.* 1984;10(7):318-20.

*Goldberg M, Six N, Decup F. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *American Journal of Dentistry.* 2003;16(1):66-76.

*Gomez de ferraris, Campos Muñoz. *Histología y embriología bucodental.* 2^o ed. Madrid. Editorial Panamericana. 2001: p209-270.

*Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vivo and in vitro. *PNAS.* 2000;97:13625-30.

*Guthrie TJ, McDonald RE, Mirchell DF. Dental hemogram. *J Dent Res.* 1965;44:678-82.

*Gwinnett AJ, Tay FR. Early and intermediate tissue response of the dental pulp to a acid etched technique in vivo. *Am J Dent.* 1998;10:35-44.

*Hahn CL, Falkler WA, Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol.* 1991;36:147-53.

*Hamid A, Hume WR. Diffusion of resin monomers through human carious dentin in vitro. *Endod Dent Traumatol.* 1997;13:1-5.

*Hammarstrom L, Lindskog S. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *Int Endod J.* 1985 Apr;18(2):93-108.

*Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991;70(11):1450-

5.

- *Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules thorough dentine. *J Oral Rehabil.* 1994;21; 475-87.
- *Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated microorganisms in vitro. *J Dent Res.* 1998; 77:60–67.
- *Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *Pediatr Dent.* 2008 May-Jun;30(3):253-60. Review. Erratum in: *Pediatr Dent.* 2008 Jul-Aug;30(4):288.
- *Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, Pashley DM. Fluid movement across the resin–dentin interface during and after bonding. *J Dent Res.* 2004; 83:843-8.
- *Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part1. Intracanal drugs and substances. *Int. Endod. Journal.* 2003;36:75-85.
- *Haveman CW, Summitt JB, Burgess JO, Carlson K. Three restorative materials and topical fluoride gel used in xerostomic patients: a clinical comparison. *J Am Dent Assoc.* 2003 Feb;134(2):177-84.
- *Hawes RR, DiMaggio JJ, Sayegh F. Evaluation of direct and indirect pulp capping. *J Dent Res.* 1964;43:808.
- *Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod.* 1999;25(10):676-82.
- *Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc.* 1975;8:74-93.
- *Heller AL, Koenigs CJF, Brilliant JD, Melfi RC, Driskell TD. Direct pulp capping of permanent teeth in primates using a resorbable form of tricalcium phosphate ceramic. *J Endodon* 1975;1:95–101.
- *Hibbard E, Ireland RL. Morphology of the root canals of the primary molar teeth. *J Dent Child.* 1957;24:250.
- *Hilton TJ. Cavity sealers, liners, and bases: Current philosophies and indications for use. *Oper Dent.* 1996;21:134-46.
- *van der Hoef N, van Amerongen WE. Influence of local anaesthetic on the

quality of class II glass ionomer restorations. *Inter J Paediatr Dent.* 2007;17(4):239-47.

*Holan G, Topf J, Fuks AB. Effect of root canal infection and treatment of traumatized primary incisors on their permanent successors. *Endod Dent Traumatol.* 1992 Feb;8(1):12-5.

*Holan G, Eidelman E, Fuks AB. Long-term evaluation pulpotomy in primary molars using minreal trioxide aggregate of formocresol. *Pediatr Dent.* 2005;27:129-36.

*Holan G, Fuks AB, Keltz N. Success rates of formocresol pulpotomy in primary molars restored with steel crowns vs amalgam. *Pediatr Dent.* 2002;24:212-6.

*Holland R. Histochemical response of amputes pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol.* 1971;4(1-2):83-95.

*Holland R, Souza V, Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni JA Filho. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. *J Am Dent Assoc.* 1979;99(3):472-5.

*Holloway GA, Watkins DW. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol.* 1977;69:306-12.

*Hotz R.S, McLean JW, Seed I, Wilson AD. The bonding of glass-ionomer cements to metal and tooth substances. *Br Dent J.* 1997;142:41-7.

*Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J.* 2002;35:905-9.

*Hume WR. Influence of dentin on the pulpward release of eugenol or acids from restorative materials. *J Oral Rehabil* 1994;21:469-73.

*Hume WR, Mount GJ. In vitro studies on the potential for pulpal cytotoxicity of glass ionomer cements. *J Dent Res.* 1988;6:915-8.

*Ikeda H, Tokita Y, Suda H. Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp. *J Dent Res.* 1997 Jul;76(7):1341-9.

*Innes NP, Ricketts DN, Evans DJ. Preformed metal crowns for decayed primary molar teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jan 24;(1):CD005512. Review.

*International Agency for Research on Cancer. Press release no. 153. Available at: http://www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/archives/pr153a.html. Accessed

June 15, 2004.

*International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro method. Génova. Suiza. 1992.

*International Organization for Standardization, ISO 7405: Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials. Génova 1997.

*International Organization for Standardization, ISO 14.971: Medical Devices – Application of risk management to medical devices. Génova. 2012.

*International Symposium on Adhesives in Dentistry. Omaha, Nebraska, 11-13 July 1991. Oper Dent. 1992;Suppl 5:1-198.

*Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. Biomaterials. 2002; 23:1707-19.

*Jordan RE, Suzuki M, Gwinnett AJ. Conservative applications of acid etch-resin techniques. Dent Clin North Am. 1981 Apr;25(2):307-36.

*Judd PL, Kenny DJ. Formocresol concerns: a review. J Can Dent Assoc. 1987;53:401-4.

*Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. Dent Mater. 2001; 17:333-9.

*Khalichi P, Cvitkovitch DG, Santerre JP. Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. Biomaterials; 2004 25:5467-72.

*Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. J South Calif Dent Assoc. 1966;34:449-51.

*Kamijo Y. Studies on morphological change in the alveolar region of the jaw bone with development of the permanent tooth from the standpoint of clinical anatomy. Bull Tokyo Dent Coll 1967;8:41.

*Kassa D, Day P, High A, Duggal M. Histological comparison of pulpal inflammation in primary teeth with occlusal or proximal caries. International

Journal of Paediatric Dentistry. 2009; 19: 26-33.

*Kasten FH, Pineda LF, Schneider PE, Rawls HR, Foster TA. Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989 Jan;25(1):57-62.

*Kawahara H. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J.* 1988;18:443.

*Kemoli AM, van Amerongen WE, Opinya G. Influence of the experience of operator assistant on the survival rate of proximal ART restorations: two-year results. *European Archives of Paediatric Dentistry.* 2009;10(issue 4):227-32.

*Kennedy DB, Kapala JT. The dental pulp: biological principles of protection and treatment. En: Braham RL, Morris ME (eds) *Textbook of pediatric dentistry.* 2^aed Baltimore: Williams and Wilkins; 1985: 492–502.

*Kerkhove BC Jr, Herman SC, Klein AI, McDonald RE. A clinical and television densitometry evaluation of the indirect pulp capping technique. *Dent Child.* 1967 May;34(3):192-201.

*Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Br Dent J.* 1993; 174:245-8.

*Kidd EAM. How 'clean' must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004;38:305-13.

*Kim S, Trowbridge H, Suda H. Reacción de la pulpa frente a la caries y los procedimientos odontológicos. En: *Las vías de la pulpa.* 8^a Ed. Cohen S, Burns R. Elsevier. 2008: p564-92.

*Kinirons MJ, Srinivasan V, Welbury RR, Finucane D. A study in two centres of variations in the time of apical barrier detection and barrier position in nonvital immature permanent incisors. *Int J Paediatr Dent.* 2001 Nov;11(6):447-51.

*Kopel HM. The pulp capping procedure in primary teeth "revisited". *ASDC J Dent Child.* 1997;64(5):327-33.

*Kreulen CM, de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE. In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer cement and amalgam on dentine. *Caries Res.* 1997;31(5):384-9.

*Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, Jeng JH, Chang MC.

Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003; 28:251-9.

*Lang H, Mertens TH. The use of cultures of human osteoblastlike cells as an In vitro test system for dental materials. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48:606-11.

*Law DB, Lewis TM. The effect of calcium hydroxide on deep carious lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14:1130-7.

*Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater.* 2006 Dec;22(12):1086-92.

*Lee KW, Son HH, Yoshiyama M, Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Sealing properties of a self-etching primer system to normal caries-affected and caries-infected dentin. *Am J Dent.* 2003 Sep;16 Spec No:68A-72A.

*Lefebvre CA, Schuster GS, Rueggeberg FA, Tamareselvy K, Knoernschild KL. Response of oral epithelial cells to dental resin components. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1996 7:965-76.

*Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2005; 26:5130-7.

*Leung RL, Loesche WJ, Charbeneau GT. Effect of Dycal on bacteria in deep carious lesions. *J AM Dent Assoc.* 1980;100:193-7.

*Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick A, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials.* 1998;19:559-64.

*Lin L, Langeland K. Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. *Oral Surg.* 1981;51:292-316.

*Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol in Vitro.* 2002 Feb;16(1):63-9.

*Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:171-83.

*Loyola-Rodriguez JP, García-Godoy F, Lindquist R. Growth inhibition of glass ionomer cements on mutans streptococci. *Pediatr Dent.* 1994;16:346-9.

- *MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent.* 1998 Jan;11 Spec No:S11-6.
- *Magnusson BO, Sundell SO. Stepwise excavation of deep carious lesions in primary molars. *J Int Assoc Dent Child.* 1977;8:36-40.
- *Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int.* 2002;33:151-9.
- *Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell cycle arrest of pulp cells. *Journal of Dental Research.* 2003;82:592-6.
- *Marchi JJ, de Araujo FB, Froner AM, Straffon LH, Nor JE. Indirect pulp capping in the primary dentition: a 4 year follow-up study. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;31:68-71.
- *Marchi JJ, Froner AM, Alves HL, Bergmann CP, Araujo FB. Analysis of primary tooth dentin after indirect pulp capping. *J Dent Child (Chic)* 2008 Sept-Dec; 75(3):295-300.
- *Massara MLA, Alves JB, Brandão PRG. Atraumatic restorative treatment: Clinical, ultrastructural, and chemichal analysis. *Caries Res.* 2002;36:430-6.
- *Massler M. Preventive endodontics: vital pulp therapy. *Dent Clin North Am.* 1967; 11:663-73.
- *McDonald RE, Avery DR, Dean JA. Treatment of deep caries, vital pulp exposure, and pulpless teeth. En: McDonald RE, Avery DR (eds) *Dentistry for the child and adolescent.* 7^a ed. St. Louis: Mosby; 2000: 413-9.
- *McLean JW, Wilson AD. The clinical development of the glass-ionomer cements. i. Formulations and properties. *Aust Dent J.* 1977 Feb;22(1):31-6.
- *Meffert RM, Thomas JR, Hamilton KM, Brownstein CN. Hydroxyapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1985;56:63-73.
- *Mejàre I, Cvek M. Partial pulpotomy in young permanent teeth with deep carious lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1993 Dec;9(6):238-42.
- *Mertz-Fairhust EJ, Curtis JW Jr, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM.

Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *JADA*. 1998;129:55-66.

*Messagne J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597.

*Mickenautsch S, Yengopal V, Banerjee A. Pulp response to resin-modified glass ionomer and calcium hydroxide cements in deep cavities: A quantitative systematic review. *Dent Mater*. 2010 Aug;26(8):761-70.

*Miller WA, Everett MM, Cramer JF. Growth of bovine pulp cells in monolayer culture. *J Endod*. 1976 Dec;2(12):385-9.

*Milnes AR. Persuasive evidence that formocresol use in pediatric dentistry is safe. *J Can Den Assoc*. 2006;72:247-8.

*Mitchell OF, Shankwalker GB. Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *J Dent Res*. 1958;37:1157-63.

*Mitchem JC., Gronas DY. Clinical evaluation of cement solubility. *J Prosthet Dent*. 1978;40:453-8.

*Mitra SB. In vitro fluoride release from a light-cured glass-ionomer liner/base. *J Dent Res*. 1991 Jan;70(1):75-8.

*Mitra SB, Lee CY, Bui HT, Tantbirojn D, Rusin RP. Long-term adhesion and mechanism of bonding of a paste-liquid resin-modified glass-ionomer. *Dent Mater*. 2009 Apr;25(4): 459-66.

*Mjor IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposure: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med*. 1991;20:496-501.

*Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro MF, Santos CF. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):544-54.

*Mount GJ. Glass-ionomer cements: past, present and future. *Oper Dent*. 1994;19:82-90.

*Mount GJ. Glass ionomer cements. En: Mount GJ, Hume WR, editors. *Preservation and restoration of tooth structure*. 2nd Ed. Queensland: Knowledge Books and Software; 2005. p. 163-98.

*Müller J, Hörz W, Bruckner G, Kraft E. Experimental study on the biocompatibility of lining cements based on glass ionomer as compared with

calcium hydroxide. *Dent Mater.* 1990 Jan;6(1):35-40.

*Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2003 Jan;134(1):87-95.

*Murray PE, García-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev* 2004;13:255-62.

*Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Identification of hierarchical factors to guide clinical decision making for successful long-term pulp capping. *Quintessence Int.* 2003; 34:61-70.

*Murray PE, Windsor LJ, Hafez AA, Stevenson RG, Cox CF. Comparison of pulp responses to resin composites. *Oper Dent*, 2003; 28:242-50.

*Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2010;13(6):509-20.

*Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using self-etching primers. *Am J Dent.* 1999 Dec;12(6):309-14.

*Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, Ciucchi B, Russell CM, Pashley DH. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesive. *J Dent Res.* 1995;74:1679-88.

*Nakashima M. Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. *Arch Oral Biol.* 1991;36 (9):655-63.

*Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP)-2 and -4. *J Dent Res.* 1994;73:1515-22.

*Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Therapy.* 2002;9:814-8.

*Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 1994 Mar;162(1):18-28.

*Nascimento AB, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CA. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent.* 2000;13: 28–34.

*Nasjleti CE, Castelli WA, Caffesse RG. Effects of composite restorations on the periodontal membrane of monkeys. *J Dent Res.* 1983;62:75-8.

*Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater.* 2008 Dec;24(12):1702-8.

*Nirschl RF, Avery DR. Evaluation of a new pulp capping agent in indirect pulp therapy. *J Dent Child.* 1983;50:25-30.

*Nitzan DW, Michaeli Y, Weinreb M, Azaz B. The effect of aging on tooth morphology: a study on impacted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986 Jan;61(1):54-60

*Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkman KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res.* 2002; 81:265-9.

*Nordstrom DO, Wei SH, Johnson R. Use of stannous fluoride for indirect pulp capping. *J Am Dent Assoc.* 1974;88:997-1003.

*Nurko C, Ranly DM, García-Godoy F, Lakshmyya KN. Resorption of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth: a case report. *Pediatr Dent.* 2000 Nov-Dec;22(6):517-20.

*Nyborg H. Healing process in the dental pulp on capping: a morphologic study-experiments on surgical lesions of the pulp in dog and man. *Acta Odontol Scand.* 1955; 13(supl 16):1-130.

*Oliva A, Ragione D, Salerno A, Riccio V, Tarataro G, Gozzolino A. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials.* 1996;17:1351-6.

*Oliveira EF, Carminatti G, Fontanella V, Maltz M. The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14–18 months. *Clin Oral Investig.* 2006;10:134-9.

*Onoe N, Inokoshi S, Yamada T. Histopathological evaluation of adhesive resins for direct pulp capping. En: Shimono M, Maeda T, Suda H, eds. *Proceedings of*

the international Conference of Dentin/Pulp Complex. Tokyo: Quintessence; 1996. p.221-6.

*Orban BJ, ed. Oral histology and embryology. 4th ed. St Louis, MO: CV Mosby Co, 1957.

*Orhan AI, Oz FT, Ozelik B, Orhan K. A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. Clin Oral Invest. 2008; 12:369-78.

*Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990 Jun;143(3):420-30.

*Pashley DH. Consideration of dentin permeability in cytotoxicity testing. Int Endod J. 1988;21:143-54.

*Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Braem M, Yildiz E, Yucel T, Vanherle G. The interaction of adhesive systems with human dentin. Am J Dent. 1996;9:167-73.

*Pereira JC, Bramante CM, Berbet A, Mondelli J. Effect of calcium hydroxide in power or in paste form on pulp-capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. Oral Surg. 1980;50(2):176-86.

*Pereira JC, Segala AD, Costa CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. Am J Dent. 2000;13(3):139-47.

*Pereira PNR, Okuda M, Sano H, Yoshikawa T, Burrow MF, Tagami J. Effect of intrinsic wetness and regional difference on dentin bond strength. Dent Mater. 1999;15:46-53.

*Phantumvanit P, Songpaisan Y, Frencken JE. Atraumatic Restorative Treatment (ART): Evaluation after 2 years. WCPD'95 Official Program. 1995. p 53.

*Pinkham JR; Berg JH. The practical importance of pediatric dentistry. En: Pediatric Dentistry. Infancy through adolescence. 4th Ed. Pinkham JR, Casamassino PS, Fields HW, McTigue DJ, Nowak A. Elsevier Saunders. 2005: 2-8.

*Pinto AS, de Araujo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, Garcia-Godoy F,

Maltz M. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent.* 2006;19:382–6.

*Pissiotis E, Spangberg LSW. Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite. *J Endodon* 1990;16:468- 73.

*Prati C, Pashley DH, Montanari G. Hidrostatic intrapulpal pressure and bond strength of bonding systems. *Dent Mater* 1991;7(1):54-8.

*Quintana-Díaz JC. Utilización de la hidroxiapatita en cirugía maxilofacial. Actualización bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol.* 1998;35(1):16-20.

*Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J.* 2002 Jan;35(1):47-55.

*Ramos RP, Chinelatti MA, Chimello DT, Dibb RG. Assessing microleakage in resin composite restorations rebonded with a surface sealant and three low-viscosity resin systems. *Quintessence Int.* 2002 Jun;33(6):450-6.

*Ranly DM. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. *Pediatr Dent.* 1994;16(6):403-9.

*Ranly DM, García-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent.* 2000; 28: 153-61.

*Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74,1602-6.

*Reeves R, Stanley RH. The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg.* 1966;22:59-65.

*Ribeiro CC, Baratieri LN, Perdigao J, Baratieri NM, Ritter AV. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. *Quintessence Int.* 1999;30:591-9.

*Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(6):495–500.

*Ricketts D. Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *Br Dent J.* 2001;191:606–10.

*Ricketts DNJ, Kidd EAM, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative

removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; CD003808.

*Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000 Nov;45(11):1013-6.

*Robertson A, Andreasen FM, Andreasen JO, Noren JG. Long-term prognosis of crown-fractured permanent incisors: the effect of stage of root development and associated luxation injury. *Int J Paediatr Dent* 2000;10:191–9.

*Rodd H. A pain in the pulp: innervation inflammation and management of the compromised primary tooth pulp- synopses. *Newsl Aust N Z Soc Paediatr Dent.* 2005;32:3-5.

*Rodd HD, Waterhouse PJ, Fuks AB, Fayle SA, Moffat MA. UK National Clinical Guidelines in Paediatric Dentistry, Pulp therapy for primary molars. *Int J Paediatr Dent.* 2006;16:15–23.

*Saltzman B, Sigal M, Clokie C, et al. Assessment of a novel alternative to conventional formocresol-zinc oxide eugenol pulpotomy for the treatment of pulpally involved human primary teeth: diode laser-mineral trioxide aggregate pulpotomy. *Int J Paediatr Dent.* 2005;15:437– 47.

*Santiago BM, Ventin DA, Primo LG, Barcelos R. Microhardness of dentine underlying ART restorations in primary molars: an in vivo pilot study. *Br Dent J.* 2005 Jul 23;199(2):103-6.

*Sasaki H, Ogawa T, Koreeda M, Ozaki T, et al. Electrocoagulation extends the indication of calcium hydroxide pulpotomy in the primary dentition. *J Clin Pediatr Dent.* 2002;26:275–7.

*Sasanaluckit P, Albustany KR, Doherty PJ, Williams DF. Biocompatibility of glass ionomer cements. *Biomaterials.* 1993 Oct;14(12):906-16.

*Sawusch RH. Direct and indirect pulp capping with two new products. *JADA.* 1982;104: 459-62.

*Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest.* 1997 Dec;1(4):154-62.

*Schröder U. A 2-year follow-up of primary molars, pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium hydroxide. *Scand J Dent Res.* 1978;86:273– 8.

- *Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *Journal of Endodontics*. 2001;27:259-65.
- *Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater*. 2007 Jun;23(6):688-95.
- *Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*. 1996 Jun;104(3):292-9.
- *Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *Journal of Dental Research*. 2001;80:1615-20.
- *Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research*. 2006;85:870-7.
- *Scott JN, Weber DF. Microscopy of the junctional region between human coronal primary and secondary dentine. *J Morphol*. 1977 Oct;154(1):133-45.
- *Selimović-Dragaš M, Huseinbegović A, Kobašlija S, Hatibović-Kofman S. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosn J Basic Med Sci*. 2012 Nov;12(4):273-8.
- *Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, Yukna RA. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogenic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J Periodontol* 1980;51:625-30.
- *Shovelton DS. A study of deep carious dentin. *Int Dent J*. 1968;18:392-405.
- *Sigusch BW, Pflaum T, Völpel A, Gretsche K, Hoy S, Watts DC, Jandt KD Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. *Dent Mater*. 2012 Mar;28(3):312-9. Epub 2012 Jan 10.
- *Silva AF, Tarquinio SB, Demarco FF, Piva E, Rivero ER. The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2006 Apr; 39(4): 309-16.
- *Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80:459-64.
- *Six N, Lasfargues J-J, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX,

- a glass ionomer cement. *J Dent.* 2000; 28: 413- 22.
- *Smith AJ: Dentin formation and repair. En: Hargreaves KM, Goodies HE, editor. *Seltzer and Bender's dental pulp.* Chicago: Quintessence Int, 2002.
- *Smith AJ, Sloan AJ, Matthews JB, Murray PE, Lumley P. Reparative process in dentine and pulp. En: Addy M, Emery G, Edgar WM, Orchardson R, eds. *Tooth wear and sensitivity 2002:London, UK: Dunitz, 2002:53-66.*
- *Smith DC, Ruse DN. Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. *JADA.* 1986; 112:654-7 .
- *Smith NL, Seale NS, Nunn ME. Ferric sulfate pulpotomy in primary molars: a retrospective study. *Pediatr Dent* 2000;22:192–9.
- *Sneed WD, Looper SW. Shear bond strength of a composite resin to an etched glass ionomer. *Dent Mater.* 1985 Aug;1(4):127-8.
- *Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006 Sep;22(9):838-44.
- *Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass-ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;48:277-88.
- *Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res.* 2003; 66 (A): 476–82.
- *Stanley HR, Going RE, Chauncey HH. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Assoc.* 1975;91:817-25.
- *Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Oper Dent.* 1997;22:1-3.
- *Straffon LH, Loos P. The indirect pulp cap: A review and commentary. *J Israel Dent Assoc.* 2000;17:7-14.
- *Straffon LH, Corpron RL, Bruner FW, Daprai F. Twenty four-month clinical trial of visible-light-activated cavity liner in young permanent teeth. *ASDC J Dent Child.* 1991;58:124-8.

- *Subramaniam P, Konde S, Prashanth P. An in vitro evaluation of pH variations in calcium hydroxide liners. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2006 Sep;24(3):144-5.
- *Sübay RK, Aşci S. Human pulpal response to hydroxyapatite and a calcium hydroxide material as direct capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993. Oct;76(4):485-92.
- *Tantbirojn D, Rusin RP, Bui HT, Mitra SB. Inhibition of dentin demineralization adjacent to a glass-ionomer/composite sandwich restoration. *Quintessence Int.* 2009 Apr;40(4):287-94.
- *Tarim B, Yücel T, Alatli C, Acar E, Olgaç V. Histopathological investigation of the effects of various glass-ionomer cements on dental pulp. *J Marmara Univ Dent Fac.* 1994 Sep;2(1):429-33.
- *Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Water movement across bonded dentin-Too much of a good thing. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(special issue):12–25.
- *Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I. Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2000;17:296–308.
- *Tay JR, Pashley DH. Resin bonding to cervical esclerotic dentin: a review. *J Dent.* 2004;32:173-96.
- *Thonemann B, Schmaltz G, Hiler KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002;18:318-23.
- *Tjäderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod J.* 2002 Aug;28(2):68-74.
- *Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A Novel Organ Culture Method to Study the Function of Human Odontoblasts in Vitro: Gelatinase Expresión by Odontoblasts is Differentially Regulated by TGF-B1. *J Dent Res.* 1998;77(7):1489-96.
- *Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-205.
- *Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1980;7:17-21.

- *Trope M, Chivian N, Sigurdsson A, Vann WFJ. Traumatismos. En: Las vías de la pulpa. 8ª Ed. Cohen S, Burns R. Elsevier. 2008: p594-642.
- *Trowbridge HO. Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *J Endod.* 1981 Feb;7(2):52-60.
- *Trowbridge H, Kim S, Suda H. Estructura y funciones del complejo dentino pulpar. En: Las vías de la pulpa. 8ª Ed. Cohen S, Burns R. Elsevier. 2008: p405-447.
- *Tyas MJ. Cariostatic effect of glass ionomer cement: a five-year clinical study. *Aust Dent J.* 1991 Jun;36(3):236-9.
- *Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 22: 278-86.
- *Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38:314-20.
- *Uhl A, Vöpel A, Sigusch B. Influence of heat from light curing units and dental composite polymerization on cells in vitro. *Journal of Dentistry.* 2006;34:298-306.
- *Vargas KG, Packam BS, Lowman D. Preliminary evaluation of sodium hypochlorite for pulpotomies in primary molars. *Pediatr Dent.* 2006;28:511-7.
- *Vij R, Coll JA, Shelton P, Farooq NS. Caries control and other variables associated with success of primary molar vital pulp therapy. *Pediatr Dent.* 2004;26:214-20.
- *Villegas AM, Naranjo E, Gómez DM. Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: revisión de la literatura. *Rev. Estomat.* 2008;16(2):38-44.
- *Wambier DS, Guedes-Pinto AC, Simionato MRL. Ultrastructural and microbiological analysis of the dentin layers affected by caries lesions in primary molars treated by minimum intervention. *Pediatr Dent.* 2007;29:228-34.
- *Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The journal of prosthetic dentistry.* 2001 Aug;86(2):203-9.
- *Wataha JC. Biocompatibilidad de los materiales dentales. En: Anusavice KJ. *Phillips Ciencia de los materiales dentales*, 11ª edición, Madrid: Elsevier; 2004. 171-202.

Bibliografia

- *Watson TF, Pagliari D, Sidhu SK, Naasan MA. Confocal microscopic observation of structural changes in glass-ionomer cements and tooth interfaces. *Biomaterials*. 1998 Mar;19(6):581-8.
- *Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987 Oct;64(4):466-74.
- *Weerheijm KL, Groen HJ. The residual caries dilemma. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999; 27:436-41.
- *Weyant R. Complete caries removal may not be indicated in symptomless deep lesions. *J Evid Based Dent Pract*. 2006 Dec;6(4):258-9.
- *Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *Pediatr Dent*. 2008 May-Jun;30(3):220-4.
- *Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements, *Int. J. Prosthodont*. 1990;3:425-9.
- *Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement, *Br Dent J*. 1972;132:133-5.
- *Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spanberg SL. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and zinc oxide eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent*. 1994; 16:102-6.
- *van Wyk CW, Olivier A, Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med*. 2001 Mar;30(3):168-77.
- *Xie J, Flaitz CM, Hicks MJ, Powers JM. Bond strength of composite to sound and artificial carious dentin. *Am J Dent*. 1996;9:31-3.
- *Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2000;16:129-38.
- *Xie D, Chung ID, Wu W, May J. Synthesis and evaluation of HEMA-free glass-ionomer cements for dental applications. *Dent Mater*. 2004; 20:470-8.
- *Yanpiset K, Vongsavan N, Sigurdsson A, Trope M. Efficacy of laser Doppler flowmetry for the diagnosis of revascularization of reimplanted immature dog teeth. *Dent Traumatol*. 2001 Apr;17(2):63-70.

- *Yiu CKU, Tay FR, King NM, Pashley DH. Interaction of resin-modified glass-ionomer cements with moist dentine, *J Dent*. 2004; 32:521-30.
- *Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int*. 2000 Feb;66(2):139-44.
- *Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Histological observations of hard tissue barrier formation in amputated dental pulp capped with tricalcium phosphate containing hydroxide. *Endod Dent Traumatol*. 1994;10:113-20.
- *Yoshida Y, van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, Vanherle G, Wakasa K. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res*. 2000 Feb;79(2):709-14.
- *Yu C, Gao XJ, Deng Dm, Yip HK, Smales RJ. Survival of glass ionomer restorations in primary molars using atraumatic restorative treatment (ART) and conventional cavity preparations: 2-year results. *Int Dent J*. 2004;54:42-6.
- *Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*. 2010: 856087. Epub 2010 Apr 28.

ANEXO

Resultados programación espectrofotómetro

	1	2	3	4	5	6	7	8	10
A	0,008	0,002	0,007	0,002	0,004	0,015	0,003	0,012	0,013
B	0,000	0,026	0,040	0,091	0,275	0,535	1,103	1,516	0,008
C	0,000	0,025	0,024	0,081	0,300	0,554	1,131	1,587	0,010
D	0,003	0,018	0,025	0,103	0,316	0,525	1,158	1,627	0,009
E	0,004	0,036	0,023	0,119	0,245	0,453	1,199	1,705	0,008
F	0,005	0,016	0,014	0,098	0,252	0,519	1,156	1,721	0,008
G	0,004	0,013	0,044	0,085	0,239	0,447	1,194	1,710	0,007
H	0,004	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003
x	-	0,022	0,028	0,096	0,271	0,505	1,157	1,64	-
		0,011	0,014	0,031	0,045	0,037	0,082	0,001	

Resultados curva de crecimiento: placa 24 horas

24 horas	1.250	2.500	5.000	10.000	Blanco
B	0,153	0,297	0,609	1,175	0,018
C	0,143	0,295	0,639	1,073	0,025
D	0,131	0,299	0,667	0,978	0,035
E	0,185	0,300	0,633	1,105	0,041
F	0,148	0,315	0,659	1,146	0,055
G	0,140	0,285	0,611	1,114	0,043
x- blanco	0,114	0,262	0,600	1,062	0,036

Resultados curva de crecimiento: placa 48 horas

48 horas	1.250	2.500	5.000	10.000	Blanco
B	0,250	0,566	1,103	1,899	0,027
C	0,205	0,536	1,133	1,922**	0,025
D	0,259	0,558	1,171	1,975**	0,030
E	0,251	0,563	1,113	1,848	0,029
F	0,251	0,598	1,064	1,958**	0,024
G	0,241	0,576	1,110	1,539	0,027
x- blanco	0,216	0,539	1,089	1,830	0,027

Resultados curva de crecimiento: placa 72 horas

72 horas	1.250	2.500	5.000	10.000	Blanco
B	0,517	1,103	1,788	2,174**	0,031
C	0,566	1,244	1,719	2,158**	0,045
D	0,645	1,233	1,834	2,163**	0,034
E	0,607	1,087	1,759	2,189**	0,036
F	0,679	1,182	1,784	2,221**	0,034
G	0,633	1,184	1,852	2,334**	0,034
x-Blanco	0,572	1,136	1,753	****	0,036

Resultados curva de crecimiento: placa 96 horas

96 horas	1.250	2.500	5.000	10.000	Blanco
B	0,894	1,573	2,095**	2,626***	0,019
C	1,058	1,926**	2,325**	2,359**	0,021
D	1,300	1,909	1,903	2,258**	0,021
E	1,144	1,924	2,065**	2,362**	0,020
F	1,088	1,998**	2,245**	2,446**	0,021
G	1,086	2,077**	2,424**	2,452**	0,023
x-blanco	1,074	1,880**	**	**	0,021

** Resultados fuera del rango del espectrofotómetro.

Resultados MTT del ensayo de toxicidad.

Vitrebond P	Conc. Total	1/2	1/4	1/8	1/16
Prueba 1a	0,100	0,106	0,113	0,122	0,113
Prueba 1b	0,090	0,103	0,111	0,115	0,120
Prueba 1c	0,083	0,093	0,109	0,111	0,112
Prueba 2a	0,067	0,066	0,061	0,077	0,075
Prueba 2b	0,068	0,070	0,070	0,079	0,076
Prueba 2c	0,066	0,070	0,073	0,079	0,076

Ketac Bond	Conc. Total	1/2	1/4	1/8	1/16
Prueba 1a	0,059	0,406	0,615	0,955	0,910
Prueba 1b	0,059	0,508	0,775	0,978	0,805
Prueba 1c	0,071	0,387	0,671	0,933	0,757
Prueba 2a	0,254	0,588	0,758	0,849	0,926
Prueba 2b	0,164	0,492	0,774	0,678	0,925
Prueba 2c	0,154	0,298	0,175	0,282	0,219

Fluoroseal	Conc. Total	1/2	1/4	1/8	1/16
Prueba 1a	0,331	0,472	0,705	0,541	0,657
Prueba 1b	0,286	0,326	0,256	0,526	0,597
Prueba 1c	0,337	0,601	0,434	0,520	0,642
Prueba 2a	0,064	0,292	0,425	0,688	0,748
Prueba 2b	0,092	0,265	0,530	0,721	0,788
Prueba 2c	0,085	0,276	0,274	0,351	0,737

Calcimol LC	Conc. Total	1/2	1/4	1/8	1/16
Prueba 1a	0,124	0,323	0,472	0,541	0,490
Prueba 1b	0,104	0,290	0,564	0,620	0,464
Prueba 1c	0,122	0,356	0,437	0,471	0,516
Prueba 2a	0,065	0,233	0,578	0,603	0,695
Prueba 2b	0,067	0,007	0,411	0,478	0,510
Prueba 2c	0,070	0,032	0,122	0,226	0,463

Control	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5	Blanco
0,644	0,547	0,409	0,673	0,593	0,067
0,648	0,366	0,449	0,695	0,350	0,067
0,456	0,360	0,369	0,581	0,504	0,073
	0,279	0,452	0,848	0,555	0,024
	0,280	0,456	0,871	0,538	0,019
	0,232	0,406	0,864	0,465	0,029

Viabilidad interpretada por materiales

Vitrebond Plus

Concentración	Viabilidad en %
Total	6,43
1/2	7,60
1/4	8,38
1/8	9,94
1/16	9,55

Ketac Bond

Concentración	Viabilidad en %
Total	10,25
1/2	60,88
1/4	94,54
1/8	98,12
1/16	99,80

Fluoroseal

Concentración	Viabilidad en %
Total	18,92
1/2	44,21
1/4	58,61
1/8	79,81
1/16	90,84

Calcimol LC

Concentración	Viabilidad en %
Total	8,96
1/2	23,73
1/4	61,74
1/8	68,95
1/16	69,53

Análisis estadístico

Pruebas no paramétricas

Concentracion en Numero = ,06. Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	VitreBond Plus	6	3,50
	KetacBond	6	20,17
	Fluoroseal	6	16,17
	Calcimol LC	6	10,17
	Total	24	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	19,824
gl	3
Sig. asintót.	0,000

Concentracion en Numero = ,13 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	VitreBond Plus	6	3,50
	KetacBond	6	21,00
	Fluoroseal	6	14,25
	Calcimol LC	6	11,25
	Total	24	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	19,418
gl	3
Sig. asintót.	0,000

Concentracion en Numero = ,25 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	VitreBond Plus	6	3,50
	KetacBond	6	21,17
	Fluoroseal	6	12,33
	Calcimol LC	6	13,00
	Total	24	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	19,141
gl	3
Sig. asintót.	0,000

Concentracion en Numero = ,50 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	VitreBond Plus	6	5,50
	KetacBond	6	20,17
	Fluoroseal	6	15,33
	Calcimol LC	6	10,50
	Total	24	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	17,595
gl	3
Sig. asintót.	0,001

Concentracion en Numero = 1,00 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	VitreBond Plus	6	9,70
	KetacBond	6	14,67
	Fluoroseal	6	18,42
	Calcimol LC	6	11,75
	Total	24	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	2,754
gl	3
Sig. asintót.	0,431

Contrastes planificados para comparar Vitrebond Plus frente a los otros 3 (excepto concentración total)

Concentracion en Numero = ,06. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	K+F+C	18	15,50	279,00
	Vitrebond Plus	6	3,50	21,00
	Total	24		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	21,000
Z	-3,645
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,000 *

Concentracion en Numero = ,13. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	K+F+C	18	15,50	279,00
	Vitrebond Plus	6	3,50	21,00
	Total	24		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	21,000
Z	-3,645
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,000 *

Concentracion en Numero = ,25. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	K+F+C	18	15,50	279,00
	Vitrebond Plus	6	3,50	21,00
	Total	24		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	21,000
Z	-3,636
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,000 *

Concentracion en Numero = ,50. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	K+F+C	18	15,33	276,00
	Vitrebond Plus	6	5,50	33,00
	Total	24		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	12,000
W de Wilcoxon	33,000
Z	-2,801
Sig. asintót. (bilateral)	0,005
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,003 *

Comparación entre KetacBond, Calcimol LC y Fluoroseal.

Concentración en Numero = ,06. Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	KetacBond	6	14,17
	Fluoroseal	6	10,17
	Calcimol LC	6	4,17
	Total	18	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	11,321
gl	2
Sig. asintót.	0,003

Concentracion en Numero = ,13 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	KetacBond	6	15,00
	Fluoroseal	6	8,25
	Calcimol LC	6	5,25
	Total	18	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	10,733
gl	2
Sig. asintót.	0,005

Concentracion en Numero = ,25 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	KetacBond	6	15,17
	Fluoroseal	6	6,33
	Calcimol LC	6	7,00
	Total	18	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	10,293
gl	2
Sig. asintót.	0,006

Concentracion en Numero = ,50 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	KetacBond	6	14,17
	Fluoroseal	6	9,33
	Calcimol LC	6	5,00
	Total	18	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	8,854
gl	2
Sig. asintót.	0,012

Concentracion en Numero = 1,00 Prueba de Kruskal-Wallis

	Material	N	Rango promedio
Viabilidad interpretada	Ketac Bond	6	9,67
	Fluoroseal	6	12,92
	Calcimol LC	6	5,92
	Total	18	

	Viabilidad interpretada
Chi-cuadrado	5,490
gl	2
Sig. asintót.	0,064

Contrastes planificados (Ketac Bond vs Fluoroseal + Calcimol LC, todas concentraciones excepto para concentración total por no haber diferencias significativas)

Concentracion en Numero = ,06. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Ketac Bond	6	14,17	85,00
	F+C	12	7,17	86,00
	Total	18		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	8,000
W de Wilcoxon	86,000
Z	-2,702
Sig. asintót. (bilateral)	0,007
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,007 *

Concentracion en Numero = ,13. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Ketac Bond	6	15,00	90,00
	F+C	12	6,75	81,00
	Total	18		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	3,000
W de Wilcoxon	81,000
Z	-3,125
Sig. asintót. (bilateral)	0,002
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,001 *

Concentracion en Numero = ,25. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Ketac Bond	6	15,17	91,00
	F+C	12	6,67	80,00
	Total	18		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	2,000
W de Wilcoxon	80,000
Z	-3,201
Sig. asintót. (bilateral)	0,001
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,000 *

Concentracion en Numero = ,50. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Ketac Bond	6	14,17	85,00
	F+C	12	7,17	86,00
	Total	18		

	Viabilidad interpretada
--	-------------------------

U de Mann-Whitney	8,000
W de Wilcoxon	86,000
Z	-2,622
Sig. asintót. (bilateral)	0,009
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,007 *

Contrastes planificados (Fluoroseal vs Calcimol LC, todas concentraciones excepto para concentración total por no haber diferencias significativas)

Concentracion en Numero = ,06. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Fluoroseal	6	8,83	53,00
	Calcimol LC	6	4,17	25,00
	Total	12		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	4,000
W de Wilcoxon	25,000
Z	-2,246
Sig. asintót. (bilateral)	0,025
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,026 *

Concentracion en Numero = ,13. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Fluoroseal	6	7,75	46,50
	Calcimol LC	6	5,25	31,50
	Total	12		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	10,500
W de Wilcoxon	31,500
Z	-1,203
Sig. asintót. (bilateral)	0,229
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,240 *

Concentracion en Numero = ,25. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Fluoroseal	6	6,00	36,00
	Calcimol LC	6	7,00	42,00
	Total	12		

	Viabilidad interpretada

U de Mann-Whitney	15,000
W de Wilcoxon	36,000
Z	-0,480
Sig. asintót. (bilateral)	0,631
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,699 *

Concentracion en Numero = ,50. Prueba de Mann-Whitney

	Materiales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Viabilidad interpretada	Fluoroseal	6	8,00	48,00
	Calcimol LC	6	5,00	30,00
	Total	12		

	Viabilidad interpretada
U de Mann-Whitney	9,000
W de Wilcoxon	30,000
Z	-1,441
Sig. asintót. (bilateral)	0,150
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,180 *

* No corregido para los empates.