

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto de la melatonina y de HA/ β -TCP/C
sobre la pulpa dental de molares de rata**

**D^a. Julia Guerrero Gironés
2014**

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN	1
2-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 HISTOFISIOLOGÍA PULPAR	4
2.1.1 Zonas morfológicas de la pulpa	4
2.1.2 Componentes estructurales de la pulpa	5
2.1.3 Inervación	8
2.1.4 Vascularización	8
2.1.5 Funciones de la pulpa	9
2.2 MECANISMOS DE RESPUESTA PULPAR	9
2.3 PULPOTOMÍA	13
2.4 AGENTES PARA REALIZAR PULPOTOMÍAS	14
2.4.1 No estimulantes pulpares	14
-Formocresol	14
-Glutaraldehído	16
-Sulfato férrico	18
-Electrocoagulación	19
-Láser	20
-Ledermix®	21
2.4.2 Estimulantes pulpares	22
-Proteínas morfogenéticas del hueso (BMP)	23
-Emdogain® (EMD)	24
-Hidróxido de calcio	25
-Agregado trióxido mineral (MTA)	26
2.5 NUEVOS MATERIALES PARA PULPOTOMÍAS	31
2.5.1 MTA fotopolimerizable (Theracal®)	31
2.5.2 Cemento CEM	32
2.5.3 Hipoclorito de sodio	34
2.5.4 Ankaferd Blood Stopper® (ABS)	35
2.5.5 Propóleo	35
2.5.6 Células madre	36
2.5.7 Biodentine®	37
2.5.8 Aceite de Nigella Sativa	38
2.5.9 Melatonina	39
2.5.10 Biocerámicas: HA y β -TCP	41
3-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3.1 HIPÓTESIS	43
3.2 OBJETIVOS	43

4-MATERIAL Y MÉTODO	44
4.1 ANIMALES Y PROCEDIMIENTO OPERATORIO	44
4.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	45
4.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	47
4.4 ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO	48
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
5-RESULTADOS	50
5.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	50
5.1.1 Grado de inflamación	51
5.1.2 Grado de vitalidad pulpar	51
5.1.3 Puente dentinario y dentina reparativa	51
5.1.4 Capa odontoblástica	51
5.1.5 Grado de fibrosis	52
5.2 OBSERVACIÓN HISTOLÓGICA	53
5.2.1 MTA 30 días	53
5.2.2 Melatonina 30 días	54
5.2.3 MTA + Melatonina v.o.	55
5.2.4 Melatonina + Melatonina v.o.	56
5.2.5 MTA 60 días	57
5.2.6 Melatonina 60 días	58
5.2.7 HA/ β -TCP/C	59
5.3 RESULTADOS TBARS	60
5.4 TABLAS DE CONTINGENCIA.CHI-CUADRADO DE PEARSON	62
6-DISCUSIÓN	67
6.1 DISCUSIÓN DEL MÉTODO	67
6.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	69
7-CONCLUSIONES	77
8-BIBLIOGRAFÍA	78

1- INTRODUCCIÓN

La Odontopediatría es la parte de la Odontología que tiene por objetivo prevenir, diagnosticar y tratar los problemas bucodentales en niños y adolescentes.

La conservación de la integridad de la dentición primaria ejerciendo sus funciones óptimas hasta su período de exfoliación normal constituye una de las metas de la Odontología Pediátrica. Por tanto, es necesario utilizar diversos procedimientos para conservar los dientes temporales afectados ya que, de no ser así, podría darse un efecto perjudicial sobre el posterior desarrollo de la dentición definitiva y del aparato masticatorio en su totalidad (Boj y Cols., 2004).

La pulpotomía es un procedimiento aceptado en el tratamiento de los dientes temporales con exposición de la pulpa dental, debido a caries o a traumatismo. La justificación de este procedimiento radica en el hecho de que el tejido pulpar coronal, situado junto a la exposición, suele contener microorganismos, así como presentar signos inflamatorios y degenerativos. El objetivo ideal de la pulpotomía es la extracción de la pulpa coronal afectada, de manera que los tejidos radiculares, clínicamente normales, puedan seguir desarrollándose de forma fisiológica. Una parte esencial en la técnica consiste en la aplicación de medicamentos que estimulen la cicatrización pulpar y permitan el desarrollo fisiológico del diente hasta su exfoliación. La presencia de cualquier signo o síntoma de inflamación que se extienda más allá de la pulpa coronal es una contraindicación para la pulpotomía. (Boj y Cols., 2004).

Con respecto al agente que se utiliza para recubrir los muñones pulpares en la pulpotomía, existe gran controversia y aún se busca el material ideal. El medicamento más utilizado desde hace más de 60 años a nivel mundial es el formocresol o solución de Buckley, pero su uso está siendo cuestionado por varias razones: la momificación pero no curación de la pulpa, su toxicidad a

nivel local y sistémico, y su potencial mutagénico e incluso carcinogénico (Casas y Cols., 2005). Por estos motivos, la búsqueda de alternativas al formocresol es un tema que en los últimos años ha suscitado un gran interés. Se han probado numerosos materiales y técnicas como el glutaraldehído (Srinivasan y Cols., 2006), sulfato férrico (Casas y Cols., 2004), electrocoagulación (Bahrololoomi y Cols., 2008), láser (Toomarian y Cols., 2008), demeclociclina + triamcinolona (Ledermix[®], Bryson y Cols., 2002), proteínas morfogenéticas del hueso (Kline y Yu, 2009), proteínas de la matriz del esmalte (Emdogain[®]) (Kiatwateratana y Cols., 2009), hidróxido de calcio (Trairatvorakul y Cols., 2012) y el Agregado Trióxido Mineral (MTA). Hoy, es éste último el que más se acerca al material ideal para la realización de pulpotomías, ya que, con su aplicación se obtienen resultados clínicos, radiológicos e histológicos favorables (Simancas-Pallares y Cols., 2010). Sin embargo, el MTA tiene un inconveniente, su elevado precio. Por este motivo, continúa la investigación para encontrar un material ideal para la práctica de este tratamiento con un menor precio.

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es una hormona presente en el organismo de animales superiores que se sintetiza en la glándula pineal (Rajaratnam y Cols., 2004). Algunos estudios demuestran que es un potente antioxidante capaz de promover la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización de la matriz en cultivos celulares, y sugieren que la melatonina puede jugar un papel esencial en la regulación del crecimiento óseo (Roth y Cols., 1999).

Las biocerámicas hidroxiapatita (HA) y fosfato beta-tricálcico (β -TCP) son sustitutos del hueso con cualidades osteoconductoras satisfactorias. Recientemente, la cerámica bifásica de fosfato de calcio (HA / β -TCP) se ha usado como práctico material de soporte y es más eficaz que el uso de HA o β -TCP puros (Tonomura y Cols., 2010; Ghanaati y Cols., 2012; Vahabi y Cols., 2012). Algunos estudios demuestran que HA/ β -TCP también es capaz de promover la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización, e intervenir, por tanto, en la regulación del crecimiento óseo. (Kannan y Cols.,

2011; Comeau y Cols., 2012; Fei y Cols., 2012; Kim y Cols., 2012; Miyamoto y Cols., 2013; Reddy y Cols., 2013).

Cuando se añade a los injertos óseos colágeno (C), estos adquieren una composición más parecida al hueso trabecular, con una fase orgánica y otra inorgánica, lo que le da una excelente bioactividad para promover la unión y la proliferación celular. El colágeno tiene una baja inmunogenicidad, es bioabsorbible, y es una proteína natural estructural que conecta e interactúa con las células. El colágeno se ha utilizado como soporte para la reparación de los tejidos y apoyo del crecimiento celular (Pek y Cols., 2008; Fu y Cols., 2012; Yu y Cols., 2012).

Los objetivos de nuestro trabajo han sido observar la respuesta pulpar, en dientes de rata, de la melatonina y de la mezcla HA/ β -TCP/C, como agentes para pulpotomía, y comparar sus efectos histológicos, a nivel pulpar, con el efecto producido por el MTA. Y comprobar si la Melatonina administrada por vía oral potencia los efectos pulpares del MTA y la Melatonina.

2-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTOFISIOLOGÍA PULPAR

La pulpa es un tejido de origen mesenquimatoso con células especializadas, los odontoblastos, dispuestos periféricamente en contacto directo con la matriz de dentina.

La relación que se establece entre los odontoblastos y la dentina, denominada complejo dentinopulpar, es una de las razones por las que la pulpa y la dentina se deben considerar una unidad funcional.

La pulpa dental está formada por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica. Entre sus componentes se incluyen nervios, vasos, fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos, células inmunocompetentes y otros elementos celulares (Cohen y Burns, 2004).

2.1.1 Zonas morfológicas de la pulpa (desde la predentina hacia la pulpa)

-Zona o capa odontoblástica: es el estrato celular más externo de la pulpa sana. Se localiza bajo la predentina; las proyecciones odontoblásticas, sin embargo, pasan a través de la predentina para llegar a la dentina. En consecuencia, la capa odontoblástica se compone de los cuerpos celulares de los odontoblastos. Además, entre estos últimos se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas. Las conexiones entre los odontoblastos en la zona próxima a la predentina son desmosomas. En cambio, en las caras laterales, las conexiones son en hendidura (Cohen y Burns, 2004).

-Zona basal: también llamada capa subodontoblástica o capa oligocelular de Weil, está situada debajo de la anterior y tiene aproximadamente cuarenta micras de ancho y escasas células. Suele estar bien definida en la región

coronaria de los dientes erupcionados; sin embargo, en la parte radicular suele estar ausente. Esta zona puede no ser aparente en las pulpas jóvenes, donde la dentina se forma con rapidez, o en las pulpas viejas, donde se genera dentina reparadora. En ella se encuentran el plexo nervioso de Raschkow, el plexo capilar subodontoblástico y los denominados fibroblastos subodontoblásticos.

-Zona rica en células: posee una alta densidad celular, entre las que se encuentran células ectomesenquimáticas, fibroblastos, macrófagos y linfocitos. Es especialmente prominente en dientes adultos que poseen un menor número de células en su parte central.

-Zona central: es la masa central de la pulpa, contiene los vasos sanguíneos y fibras nerviosas de mayor diámetro. Tiene células como fibroblastos, células ectomesenquimáticas y macrófagos y escasas fibras (Cohen y Burns, 2004).

2.1.2. Componentes estructurales de la pulpa

A) CÉLULAS

Odontoblastos

Son células específicas de la pulpa, situadas en la periferia y adyacentes a la predentina, que conforman la capa odontoblástica. Durante la dentinogénesis segregan predentina, que se mineraliza, quedando el proceso odontoblástico en el interior de los túbulos, lo que convierte a la dentina en un tejido vital. Por otro lado, el odontoblasto maduro es una célula altamente diferenciada, por lo que los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos lo hacen a expensas de las células ectomesenquimáticas. Los odontoblastos sintetizan sobre todo colágeno tipo I; además también segregan proteoglucanos, sialoproteína de la dentina y fosforina, una fosfoproteína intensamente fosforilada que participa en la mineralización extracelular y es exclusiva de la dentina. El odontoblasto

segrega también fosfatasa alcalina, una enzima íntimamente relacionada con la mineralización (Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

Fibroblastos

Son la mayoría de células del tejido conectivo pulpar. En la corona forman la zona rica en células. Secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas; y de la sustancia fundamental. En la pulpa adulta se transforman en fibrocitos que pueden indiferenciarse y volver a ser fibroblastos. Su función consiste en formar, mantener y regular el recambio de la matriz extracelular fibrilar y amorfa, existiendo distintos tipos de fibroblastos que dan lugar a diversas clases de colágeno (Ingle y Cols., 2008).

Células ectomesenquimáticas o mesenquimáticas indiferenciadas

Derivan del ectodermo de la cresta neural. Tienen la capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos. En la pulpa madura la cantidad de estas células es menor, disminuyendo el potencial regenerativo de la misma (Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

Macrófagos

Son monocitos que han abandonado el torrente sanguíneo, entrando en los tejidos y se han diferenciado en varias subpoblaciones. Una subpoblación importante de macrófagos desempeña funciones activas de endocitosis y fagocitosis. Su función consiste en digerir microorganismos, eliminar bacterias, hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en los tejidos. El material ingerido por los macrófagos es destruido mediante la acción de enzimas lisosomales. Otro subconjunto de macrófagos participa en la función inmunológica, al fagocitar partículas extrañas, y presentarlas a los linfocitos como antígeno (Cohen y Burns, 2004).

Células dendríticas

Son elementos accesorios del sistema inmune. Se hallan sobre todo en los tejidos linfoides, pero también están ampliamente distribuidas por los tejidos conectivos, entre ellos la pulpa. Son células presentadoras de antígeno y desempeñan una función central en la inducción de la inmunidad dependiente de las células T (Cohen y Burns, 2004).

Linfocitos

Los linfocitos tipo T están situados en la pulpa sana y participan en la respuesta inmunológica inicial, mientras que los tipo B están ausentes. Cuando ocurre la interacción entre ambos, los linfocitos T se diferencian en células plasmáticas (Cohen y Burns, 2004).

Eosinófilos y mastocitos

Liberan histamina durante la inflamación pulpar, lo que da lugar a una mayor permeabilidad de los capilares, y produce edema (Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

B) FIBRAS DE LA PULPA

La pulpa está compuesta por (a) fibras colágenas, que forman una vaina alrededor de los nervios de la pulpa, (b) fibras reticulares y (c) fibras elásticas, que están confinadas en las paredes de las arteriolas y, a diferencia de las colágenas, no forman parte de la matriz extracelular (Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

C) SUSTANCIA FUNDAMENTAL

El tejido conectivo es un sistema compuesto por células y fibras, ambas embebidas en la sustancia fundamental. También llamada matriz

extracelular, está constituida por glucoproteínas y agua. Es una sustancia amorfa que se considera como un gel y, por tanto, es diferente de los fluidos tisulares. Los proteoglicanos representan una subclase importante de las glicoproteínas y están formados por glucosaminoglicanos (GAG). En dientes recién erupcionados, el GAG predominante es el dermatán sulfato, que en dientes maduros está en menor proporción, siendo el ácido hialurónico el componente esencial (Cohen y Burns, 2004).

2.1.3 Inervación

La pulpa posee una doble inervación: sensitiva y autónoma. Las fibras nerviosas sensoriales llegan a la pulpa junto a los vasos a través del foramen apical y proceden del nervio trigémino. La inervación está a cargo de las fibras nerviosas tipo A, mielínicas, y las tipo C, amielínicas. Las primeras se ramifican considerablemente en la zona basal de Weil, constituyendo el plexo nervioso subodontoblástico de Raschkow. Algunas fibras llegan hasta los espacios interodontoblásticos y otras penetran en dentina y predentina (Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

2.1.4. Vascularización

Los vasos sanguíneos llegan a la pulpa acompañados de fibras nerviosas y salen a través del foramen apical. Su recorrido es rectilíneo y en su trayecto emiten pequeñas ramas colaterales. En la zona coronaria las arteriolas se ramifican, disminuyen de calibre y forman el plexo capilar subodontoblástico. Esta red proporciona a los odontoblastos una fuente rica de metabolitos. El flujo sanguíneo capilar de la porción coronal de la pulpa es casi dos veces mayor que el de la porción radicular. Además, como cabría esperar, el flujo sanguíneo pulpar es mayor en la capa periférica de la pulpa (plexo capilar subodontoblástico) que en el área central (Ingle y Cols., 2008).

La circulación sanguínea de la pulpa es de tipo terminal, ya que entre los vasos aferentes y los eferentes hay comunicaciones alternativas, como anastomosis arteriovenosas y venovenosas, que proporcionan una comunicación directa entre las arteriolas y las vénulas y que constituyen la llamada microcirculación pulpar, cuya función es la de regular el flujo sanguíneo. Además, existen vasos linfáticos en la parte central de la pulpa y, en menor número, en la zona periférica próxima a la capa odontoblástica.

La pulpa joven normal es la que recibe un volumen más elevado de flujo sanguíneo, comparado con pulpas más maduras (Ingle y Cols., 2008; Gómez-de-Ferraris y Cols., 2009).

2.1.5. Funciones de la pulpa

Las principales funciones pulpares son: la nutritiva; la sensitiva, en la que, independientemente de cuál sea el agente estimulante, la pulpa siempre da una respuesta de tipo doloroso; y por último, la formativa de dentina primaria, secundaria y terciaria o reparativa, que se elabora en respuesta a distintos tipos de agresiones producidas por agentes irritantes biológicos, físicos o químicos.

2.2 MECANISMOS DE RESPUESTA PULPAR

La pulpa dental es un órgano sensorial único. Al estar encerrada en una capa protectora de dentina, cubierta a su vez por esmalte, cabría esperar que tuviese poca capacidad de respuesta frente a los estímulos. Sin embargo, el potencial de curación intrínseco de la pulpa dental es bien conocido. Como en todos los tejidos conectivos, la reparación de la lesión tisular comienza con un desbridamiento por macrófagos, seguido por la proliferación de fibroblastos, formación de brotes capilares y síntesis de colágeno. La circulación local tiene una importancia crítica para la curación y reparación de las heridas. El suministro adecuado de sangre es esencial para transportar

elementos inflamatorios en el área de la lesión pulpar y proporcionar a los fibroblastos jóvenes nutrientes para la síntesis de colágeno. A diferencia de la mayoría de los tejidos, la pulpa no tiene prácticamente circulación colateral; por esta razón, en teoría, es más vulnerable que otros tejidos. Así, en caso de lesión grave, la capacidad de curación estaría afectada en dientes con suministro sanguíneo limitado.

Parece razonable asumir que la pulpa rica en células del diente joven, con un orificio apical amplio e irrigación abundante, tiene un potencial de curación muy superior al del diente viejo, con un orificio estrecho y suministro de sangre restringido. La dentina producida en respuesta a la muerte de odontoblastos primarios se ha designado con nombres diferentes: dentina secundaria irregular, dentina de irritación, dentina terciaria, dentina reparativa; siendo este último término el aplicado con más frecuencia (Frozoni y Cols., 2012).

Como es conocido, la dentina secundaria se deposita alrededor de la pulpa, a un ritmo muy bajo, durante toda la vida del diente. En contraste, la formación de dentina reparativa ocurre en la superficie pulpar de la dentina primaria o secundaria, en lugares correspondientes a zonas de irritación. Por ejemplo, cuando una caries ha invadido la dentina, la pulpa suele responder mediante el depósito de una capa de dentina reparadora sobre los túbulos de la dentina primaria o secundaria que comunican con la caries. De modo similar, cuando se produce el desgaste oclusal, se elimina el esmalte sobreyacente y se expone la dentina al medio ambiente oral, se deposita dentina reparativa sobre la superficie pulpar de la dentina expuesta. Así pues, la formación de dentina reparativa permite que la pulpa quede protegida tras una barrera de tejido mineralizado (Cohen y Burns, 2004; Balic y Cols., 2010; Simon y Cols., 2011).

En comparación con la dentina primaria, la reparativa es menos tubular y sus túbulos tienden a ser más irregulares, con luces de mayor diámetro. En algunos casos no se forman túbulos. Las células que producen la dentina reparadora no son tan cilíndricas como los odontoblastos primarios de la pulpa coronal y tienen, con frecuencia, un aspecto cúbico. La calidad de la

dentina reparativa (es decir, la cuantía en que recuerda a la dentina primaria) es muy variable. Si la irritación de la pulpa es relativamente leve, como en el caso de una caries superficial, la dentina reparativa formada puede recordar a la dentina primaria, en lo que respecta a la tubularidad y el grado de mineralización. Por otra parte, la dentina reparativa depositada en respuesta a una caries más extensa puede ser relativamente atubular y poco mineralizada, con muchas áreas de dentina intertubular. El grado de irregularidad de la dentina reparativa está determinado, probablemente, por factores como intensidad de la inflamación presente, extensión de la lesión celular y estado de diferenciación de los odontoblastos en sustitución (Ten Cate, 1986).

Se ha indagado sobre si la dentina reparadora protege a la pulpa o es simplemente una forma de tejido cicatricial. Para desempeñar una función protectora, esta forma de dentina tendría que proporcionar una barrera relativamente impermeable, capaz de impedir el paso de irritantes, y compensar la pérdida de dentina primaria. Se ha estudiado la unión entre la dentina primaria y la reparativa. Utilizando una técnica de difusión de colorante, algunos autores notaron la presencia de una zona atubular situada entre las dos formas de dentina. Otros, hallaron, además de una reducción espectacular del número de túbulos, que las paredes de los túbulos a lo largo de la unión estaban engrosadas y que muchas luces aparecían ocluidas por un material similar a la dentina peritubular. Estas observaciones podrían indicar que la frontera entre la dentina primaria y la reparativa es una zona atubular con permeabilidad baja. Los investigadores comunicaron que la acumulación de células dendríticas pulpares disminuía después de la formación de dentina reparativa, lo que podría sugerir una reducción de la entrada de antígenos bacterianos (Cohen y Burns, 2004).

Fibrosis pulpar

En determinadas ocasiones, los elementos celulares de la pulpa aparecen sustituidos en gran parte por el tejido conectivo fibroso. Parece que, en

algunos casos, la pulpa responde a los estímulos nocivos con acumulación de grandes fibras de colágeno, en vez de con la elaboración de dentina reparativa. Sin embargo, la fibrosis y la formación de dentina reparativa se combinan con frecuencia, lo que indica que ambos procesos son expresiones de una misma función de reparación (Cohen y Burns, 2004).

Calcificación pulpar

La calcificación del tejido pulpar es un fenómeno frecuente. Al menos el 50% de todos los dientes presentan una o más calcificaciones pulpares. En la pulpa coronal la calcificación suele adoptar la forma de cálculos concéntricos bien definidos, mientras que en la pulpa radicular, la calcificación tiende a ser difusa. Algunos autores creen que la calcificación de la pulpa es un proceso patológico relacionado con diversas formas de agresión, mientras que otros la consideran un fenómeno natural (Bahetwar y Cols., 2012).

Necrosis pulpar

La necrosis es la expresión morfológica de la muerte celular y va acompañada de respuesta inflamatoria (Martínez-Díaz y Cols., 2005). La pulpa puede reaccionar de manera media o severa: en la primera se verá alteración de la capa odontoblástica, en la segunda los túbulos dentinarios pueden aspirar los núcleos de los odontoblastos. También puede haber hemorragia e inflamación, dando lugar a una degeneración tisular, siendo el resultado una necrosis pulpar (Fuks, 2008).

Cambios debidos a la edad del diente

La formación continuada de dentina secundaria a lo largo de la vida reduce poco a poco el tamaño de la cámara pulpar y los conductos radiculares. Con

el tiempo, existe una disminución gradual de la celularidad y un aumento simultáneo del número y el grosor de las fibras colágenas. Los odontoblastos disminuyen en número y de tamaño y pueden desaparecer totalmente en ciertas áreas de la pulpa. Además, ocurre una reducción progresiva del número de nervios y vasos sanguíneos (Cohen y Burns, 2004).

En cuanto a los dientes temporales en los que se realizan tratamientos pulpares, éstos, en general, están en una etapa en la que ha comenzado la rizolisis. En estos momentos hay una disminución en la vascularización y en el número de células, y un aumento de fibras, por lo que estamos ante una pulpa en una etapa de envejecimiento, o regresión, y con un escaso poder de respuesta (González Rodríguez y Ruiz Linares, 2004).

2.3 PULPOTOMÍA

Consiste en la remoción de la pulpa coronal hasta la región cervical manteniendo el tejido pulpar radicular vital mediante la aplicación de fármacos.

El objetivo de la pulpotomía es conservar los dientes temporales afectados por exposiciones pulpares producidas por caries o traumatismos, manteniéndolos funcionales hasta su exfoliación, sin dañar la dentición permanente o la salud del niño. Evitando, de este modo, la pérdida prematura del diente temporal, de lo que se derivarían problemas de mantenimiento de espacio, funcionales, fonéticos y estéticos (Guidelines AAPD, 2005-2006).

Las indicaciones para poder realizar una pulpotomía, o biopulpectomía parcial, son: (a) el diente no debe tener antecedentes de dolor espontáneo, o tener un dolor agudo menor que se alivia con analgésicos; (b) no debe presentar molestias a la percusión; (c) no debe haber hinchazón vestibular; (d) no debe tener movilidad; (e) el examen radiográfico deber mostrar

aparición normal de la inserción periodontal; (f) la pulpa tiene que estar expuesta durante la remoción de caries o subsiguiente a un traumatismo; (g) el tejido debe aparecer con vitalidad y (h) la hemorragia de la pulpa amputada se tiene que detener con irrigación isotónica dentro de los 2 minutos. (Bordoni y Cols., 2010).

2.4 AGENTES PARA REALIZAR PULPOTOMÍAS

2.4.1 NO ESTIMULANTES PULPARES

Estos tratamientos dañan mínimamente el tejido pulpar pero sin inducir un proceso de reparación de la pulpa. Algunos de ellos pueden fijar completamente el tejido remanente. Teóricamente la pulpa está estéril y desvitalizada.

Formocresol

También llamado solución de Buckley. Fue introducido por este autor en 1904 y desde entonces ha sido el medicamento más frecuentemente utilizado a nivel mundial (King y Cols., 2002)

Está compuesto por formaldehído (19%), cresol (35%) y glicerina (15%) en una base de agua. El formaldehído es un fijador tisular y a determinadas concentraciones un potente germicida contra toda clase de microorganismos. El cresol es un fuerte antiséptico, y contiene orto-, meta- y para-cresol. La glicerina se utiliza como emulsión para prevenir la polimerización del aldehído (Waterhouse y Cols., 2000; Ranly y García Godoy, 2000).

Resultados clínicos y radiográficos

Diversos estudios muestran el éxito del formocresol como agente para pulpotomía. Para algunos autores es el fármaco de elección en las

pulpotomías de dientes temporales. Godhi y Cols. (2011) comparan el formocresol y el MTA en pulpotomías en dientes de niños, y observan un 100% de éxito clínico y de un 88 a un 92% de éxito radiográfico usando formocresol en dentición temporal, siendo estos resultados similares a los de otros estudios como el de Aeinehchi y Cols., 2007.

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

El formocresol actúa fijando el tejido pulpar radicular, permitiendo reemplazar una inflamación crónica por una aguda. La pulpa sufre una momificación, ya que el formocresol provoca la desnaturalización de las proteínas de la pulpa radicular más próxima y difunde hacia la pulpa más apical, fijando los tejidos en mayor o menor medida, yendo la graduación desde el infiltrado inflamatorio hasta la necrosis pulpar. (Boj y Cols., 2004).

Srinivasan y Cols. (2006), tras 12 meses de la aplicación de formocresol en dientes temporales, encontraron un gran incremento de células inflamatorias y atrofia pulpar radicular.

Toxicidad

Desde hace unos años el uso del formocresol está siendo cuestionado por varias razones. Una de ellas es que existe la incertidumbre de que sea seguro debido a su potencial de toxicidad (Saltzman y Cols., 2005).

Algunos autores han observado la difusión de formaldehído y cresol al ligamento periodontal, hueso, dentina, pulpa e, incluso, a la circulación sistémica, lo que se traduce en mayor toxicidad (Chan y cols, 2005). Hauman y Love (2003) afirman que el cresol y el formaldehído coagulan las células indiscriminadamente, produciendo necrosis de coagulación por contacto y que son altamente tóxicos e irritantes para el tejido.

Por otro lado, numerosas investigaciones sugieren que el formocresol tiene efectos mutagénicos y carcinogénicos (Waterhouse y Cols., 2000; Casas y

Cols., 2005; Naik y Hedge, 2005). La Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud lo clasificó, en 2004, como carcinógeno humano (IARC, 2004).

Además, se cuestiona si su uso en dientes temporales posee un efecto negativo en el esmalte de los permanentes sucesores, no encontrándose estudios con diferencias significativas con respecto al grupo control (Saltzman y Cols., 2005). Otro problema que se observa en ocasiones, tras realizar este tratamiento, es la aparición de reabsorción radicular, lo que llevaría a la exfoliación temprana del diente temporal. Casas y Cols. (2005) sugieren que la incidencia de reabsorciones tras su uso es baja, ya que al ser fijada la pulpa, se previene la reacción pulpar que daría lugar a la reabsorción radicular.

Por todas las razones anteriormente mencionadas, los artículos más recientes discuten sobre la necesidad de abandonar el formocresol de la terapéutica actual (Lewis, 2010a, 2010b). Pero, a pesar de esto, este fármaco se sigue utilizando para realizar pulpotomías en dientes temporales. Incluso, el formocresol se usa como grupo control en estudios donde se experimenta con otros materiales, ya que algunos autores lo siguen considerando como el estándar de oro en el tratamiento pulpar de dientes deciduos (Srinivasan y Jayanthi, 2011).

Glutaraldehído

Surgió como sustituto del formocresol para la realización de pulpotomías. En comparación con éste tiene una mayor capacidad de fijación. Es un potente antiséptico, biológicamente más aceptable y menos tóxico por su menor difusión a través de los tejidos. Posee una reacción química más estable (ya que forma enlaces dobles) y mejores niveles de respiración celular (Boj y Cols., 2004; Srinivasan y Cols., 2006).

Resultados clínicos y radiográficos

Estudios poco recientes como el de Prakash y Cols. (1989) han analizado el éxito clínico y radiológico de pulpotomías realizadas con glutaraldehído, obteniendo unos porcentajes de éxito, entre el 92 y el 100%, similar al del formocresol. Sin embargo, la mayoría de estos estudios son a corto plazo, por lo que es posible que, cuando el seguimiento sea más largo, exista un porcentaje mayor de fracasos con esta técnica.

Otro de los problemas que plantea el glutaraldehído es que necesita unas características de pureza, preparación, estabilidad y almacenaje muy meticulosas para que la solución no pierda efectividad. Y, a todo lo anterior, hay que sumarle que no existe preparado comercial, teniendo que conseguirse mediante fórmula magistral (Boj y Cols., 2004).

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

El glutaraldehído es, como ya hemos mencionado, un fijador tisular que actúa produciendo un sellado sobre la pulpa amputada.

Tras el uso del glutaraldehído, se produce una zona superficial fijada con una pequeña capa inflamada por debajo de ésta. A los 15 días del uso de este agente, se aprecia una capa odontoblástica intacta, sin necrosis ni calcificación distrófica, o formación de dentina secundaria apical, en la zona de fijación (Prakash, 1989).

Toxicidad

A pesar de que diversos estudios han demostrado que el glutaraldehído es menos tóxico y produce menos efectos perjudiciales que el formocresol, algunos autores como Srinivasan y Cols. (2006) consideran que las diferencias entre ambos, en términos de mutagenicidad y de distribución sistémica, no son suficientes para sustituir un agente por otro.

Sulfato férrico

Es un agente hemostático con propiedades bacteriostáticas que actúa promoviendo la formación de un coágulo de sangre y precipitando una barrera proteica en el lugar de la extirpación de la pulpa cameral (Casas y Cols., 2004).

Resultados clínicos y radiográficos

Obtiene resultados similares a los del formocresol como agente para pulpotomía (Casas y Cols., 2004; Srinivasan y Cols., 2006). Casas y Cols. (2004), tras dos años de la realización de pulpotomías en incisivos con sulfato férrico, lo que con más frecuencia encontraron fue el ensanchamiento del ligamento periodontal, seguido de una reabsorción interna que hacía claudicar a estos incisivos.

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

Salako y Cols. (2003) al realizar pulpotomías con sulfato férrico en dientes de rata, observaron que, a nivel histológico, aparecían áreas de inflamación, zonas de coagulación y algunos cambios en la calcificación de la pulpa coronal y radicular.

Farrokh Gisoure (2011) y Huth y Cols. (2012) recomiendan el sulfato férrico para el tratamiento fácil y exitoso de los molares primarios con caries y pulpas expuestas, al ser su utilización clínica exitosa.

Además, el sulfato férrico tiene la ventaja de eliminar el uso de aldehídos para la realización de pulpotomías (Casas y Cols., 2004), y no se conoce su distribución sistémica (Cortés y Cols., 1997).

Electrocoagulación

Tras eliminar la pulpa, ya sea manualmente o con electrocoagulación, se consigue la hemostasia pulpar con electrocoagulación para, a continuación, colocar la base y posterior restauración (Ranly y García Godoy, 2000). Es una técnica conservadora, no farmacológica, sencilla, con resultados aceptables (Srinivasan y Cols., 2006) y con ella se acorta el tiempo de trabajo (Bahrololoomi y Cols., 2008).

Resultados clínicos y radiográficos

Ciertos autores han conseguido porcentajes elevados de éxito al utilizar esta técnica para realizar pulpotomías (Yadav y Cols., 2014).

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

Algunos autores han observado que la electrocoagulación induce reabsorción radicular patológica, patología periapical y de furca y una gran variedad de efectos pulpares como inflamación aguda, inflamación crónica, edema, fibrosis y necrosis, posiblemente debido al calor que se genera al realizar la electrocoagulación (Ranly y García Godoy, 2000).

El-Meligy y Cols. (2001) compararon la reacción del tejido pulpar y periapical al formocresol y a la electrocoagulación, obteniendo mejores resultados histológicos con este último. Sin embargo Oztas y Cols. (1994) observaron la presencia de inflamación, fibrosis, necrosis, reabsorción y formación de dentina reparativa en dientes de perros a los que se les había realizado pulpotomías con ambas técnicas, siendo los resultados más favorables con el formocresol.

Ya que no se dispone de unos resultados acerca de la electrocoagulación, su uso sigue en controversia y en la actualidad se ha optado por otras técnicas.

Láser

Fue desarrollado por Maiman en 1960. Actúa transformando la luz de varias frecuencias en una radiación cromática de regiones visibles, infrarrojas y ultravioletas, produciendo un inmenso calor y potencia al acercar el foco (Salzmann y cols 2005; Mohammadi, 2009). Tiene la habilidad de vaporizar los tejidos y de coagular y sellar los vasos sanguíneos, dejando la superficie tratada estéril (Mohammadi, 2009).

Resultados clínicos y radiográficos

El láser consigue un mínimo o ningún sangrado, una curación más rápida, reduce la infección postoperatoria, y elimina o disminuye la necesidad de anestesia (Saltzman y Cols., 2005; Kotlow, 2008).

Tiene algunos inconvenientes, ya que no fija la pulpa ni es bactericida; además con el láser no podemos detectar una hemorragia pulpar previa incontrolable, lo que contraindicaría su aplicación, ya que éste da lugar a una hemostasia pulpar que nos puede llevar a confirmar un diagnóstico erróneo y realizar una pulpotomía en un diente hiperémico (Kotlow, 2008).

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

El láser mejora los resultados obtenidos con la electrocoagulación, favorece la reparación y formación de dentina reparativa permitiendo que la pulpa mantenga su vitalidad y capacidad de curación normal (Ranly y García Godoy, 2000). Cannon y Cols. (2011) y Yadav y Cols. (2014) afirman que se produce mucha menos inflamación que con otras técnicas en la realización de pulpotomías.

Toomarian y Cols. (2008) obtienen mejores resultados que con el formocresol en cuanto a la continuidad de la capa odontoblástica, menor presencia de hemorragia, menor inflamación, menor necrosis, menor reabsorción interna, mayor nivel de vascularización y menor formación de

absceso, convirtiéndose en una posible terapia para la realización de pulpotomías.

Ledermix[®]

Contiene demeclociclina, hidrocortisona cálcica, acetónido de triamcinolona (1%), dimetilclortetraciclina cálcica (3.21%), óxido de zinc, anhídrido de sílice coloidal, macrogolum 400 y natrii sulfis. Sus dos componentes activos son el acetónido de triamcinolona, un corticosteroide, y el dimetilclortetraciclina, un antibiótico de amplio espectro bacteriostático; teóricamente posee el efecto terapéutico de ambos: los esteroides tienen la capacidad de eliminar la inflamación y de inhibir la actividad osteoclástica y las tetraciclinas poseen efecto antimicrobiano y propiedades antiinflamatorias (Wong y Sae-Lim, 2002).

Resultados clínicos y radiográficos

El Ledermix[®] tiene una demostrada actividad antiinflamatoria que disminuiría el proceso de reabsorción radicular. Esto ocurre tanto por la tetraciclina como por el corticoide. La triamcinolona es aproximadamente cinco veces más potente que el cortisol suprimiendo la inflamación (Hauman y Love, 2003).

Bryson y Cols. (2002) realizaron pulpectomías en perros con Ledermix[®] y con hidróxido de calcio. A los cuatro meses con el Ledermix[®] se observaron mejores resultados, ya que, se advertía una disminución en la reabsorción y una mejor reparación.

El Ledermix[®] controla el inicio de la respuesta inflamatoria reduciendo la contaminación bacteriana superficial e inhibiendo la colagenasa y la actividad osteoclástica, minimizando la reabsorción y facilitando la regeneración periodontal (Wong y Sae Lim, 2002).

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

Sazak y Cols. (1996) realizaron un estudio comparándolo con el hidróxido cálcico: con el Ledermix[®] obtenían un mayor grado de inflamación a corto plazo, pero a los tres meses no había diferencias significativas entre ellos, encontrando dentina reparativa sin inflamación en ambos.

Ledermix[®] da lugar a un menor grado de inflamación cuando lo comparamos con el formocresol. A los tres días de la aplicación de los materiales, la infiltración de neutrófilos con el Ledermix[®] era del 81% y con el formocresol del 84%; tras seis semanas, la infiltración de linfocitos era del 66% y del 90% respectivamente (Seow y Thong, 1993)

Toxicidad

Hauman y Love (2003) en su estudio afirman que el Ledermix[®] ha recibido una gran oposición por los efectos secundarios de los corticoesteroides, ya que actúan sobre las células inflamatorias y en la síntesis de proteínas, y podrían interferir en la fagocitosis retrasando la curación del tejido.

2.4.2 ESTIMULANTES PULPARES

Algunas sustancias se han propuesto como inductores de la dentinogénesis. Cuando estas sustancias entran en contacto con la pulpa vital, empieza el proceso de reparación: formación de matriz de fibrodentina y dentina reparativa (Nakamura y Cols., 2002).

Proteínas morfogenéticas del hueso (BMP)

Son los factores capaces de inducir la formación de hueso cuando se implanta una matriz mineralizada de hueso en un lugar ectópico. Dentro de ellas tenemos la BMP 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (Urist y Cols., 1997).

Ike y Urist (1998) demostraron que tanto la dentina desmineralizada como las BMP promueven la dentinogénesis, y por lo tanto la formación de puente dentinario. Por este motivo se cree que podrían dar buenos resultados si se utilizaran para realizar pulpotomías o protecciones pulpares directas.

El mecanismo de acción de las BMP consiste en su dispersión en el coágulo sanguíneo y disolución en los fluidos tisulares durante las primeras cuarenta y ocho horas, lo que promueve la diferenciación de las células mesenquimales en células osteoprogenitoras. Además, estimulan la síntesis de ADN y la replicación de células. Las BMP se reabsorben completamente y pueden producir una gran cantidad de dentina reparativa en la cavidad de la pulpa amputada sin afectar la pulpa radicular (Ike y Urist, 1998).

Algunos autores creen que las BMP podrían ser un buen material para realizar pulpotomías en dientes temporales, pero presentan un elevado precio y, además, no hay suficientes trabajos de investigación para establecer una conclusión, siendo los que hay, a veces, contradictorios (Ranly y García Godoy, 2000). Por ejemplo, Da Silva y Cols. (2008) evaluaron la respuesta pulpar y periapical de dientes de perros después de realizar pulpotomías cuyo agente fue BMP-7 más colágeno. En los resultados, a los 70 días no hallaron ni una respuesta satisfactoria apical ni periapical; además, tampoco se observó la capacidad de inducir la deposición de tejido mineralizado, y sí que condujo a la formación de lesiones periapicales radiográficamente visibles. En cambio, Kline y Yu (2009) realizaron un estudio cuyo propósito fue determinar si la BMP-2, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la calcitonina (CT), o la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) promueven la formación de dentina terciaria u osteodentina en caninos pulpotomizados de hurón. Concluyeron que la formación de dentina

reparativa y osteodentina fue significativamente mayor con BMP-2 y CGRP que con CT y PTHrP, promoviendo, por lo tanto, una mejor curación pulpar.

Emdogain® (EMD)

Es un derivado de la matriz del esmalte de feto de cerdo. Su principal componente es la amelogenina (30 mg/ml) en alginato glicol propileno (PGA). Se ha usado en la regeneración del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar en pacientes con estado avanzado de periodontitis, obteniéndose buenos resultados. Se piensa que la amelogenina actúa en la diferenciación de los odontoblastos y, por tanto, en la formación de dentina (Nakamura y Cols., 2002).

Resultados clínicos y radiográficos

Kiatwateratana y Cols. (2009) realizaron pulpotomías comparando EMD e hidróxido de calcio. Los resultados clínicos y radiológicos fueron similares en ambos grupos. Sabbarini y Cols. (2008) compararon las tasas de éxito de EMD y formocresol. La evaluación clínica y radiográfica de EMD en dientes con pulpotomía en este estudio ofrece evidencia preliminar de que el EMD es un material prometedor que puede ser tan exitoso, o más, que otros agentes para pulpotomía.

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

En diversos estudios en los que realizaron protecciones pulpares directas o pulpotomías con EMD se apreció un infiltrado inflamatorio y tejido duro reparativo (Nakamura y Cols., 2002; Igarashi y Cols., 2003).

El mecanismo por el cual el EMD induce la formación de tejido duro no se conoce con exactitud, pero se sabe que forma una matriz de proteínas insolubles que se mantiene en el lugar de la herida durante más de una

semana; y se cree que induce la formación de dentina por mimetismo biológico normalmente activado durante la dentinogénesis temprana y parece que también recluta nuevos odontoblastos de la parte central de la pulpa dental (Nakamura y Cols., 2002).

Kaida y Cols. (2008) investigaron el proceso de curación de las heridas de los tejidos lesionados con EMD. Se realizaron pulpotomías en primeros molares de ratas con EMD o Vitapex[®], que contiene hidróxido de calcio. Este estudio mostró los diferentes procesos de curación mediados por EMD y Vitapex[®] y reveló que la expresión de BMP por los macrófagos podría jugar un papel importante en la formación de dentina reparativa.

Sabbarini y Cols. (2007) evaluaron histológicamente el efecto del EMD como agente para pulpotomías en caninos temporales. Los dientes se extrajeron después de una semana, dos semanas y seis meses de realizar las pulpotomías. En los dientes extraídos a la semana, la superficie pulpar estaba revestida por una capa celular delgada y hubo un aumento de la angiogénesis. En los dientes extraídos después de dos semanas, la mayoría mostró pequeñas islas de tejido similar a dentina en diferentes etapas de mineralización. En los dientes extraídos después de 6 meses, la mayoría de ellos mostraron islas de tejido similar a la dentina que se iban uniendo para formar un puente dentinario completo.

Además, hay que añadir que la estabilidad, la presencia continua en el lugar de aplicación y el efecto antibacteriano del Emdogain[®], hacen que proporcione un ambiente pulpar beneficioso en el proceso de reparación (Nakamura y Cols., 2002).

Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio es un fármaco que se emplea mucho en odontología, por ejemplo, como base cavitaria, como protección pulpar directa en dientes permanentes, para la realización de apicoformaciones o para la realización de pulpectomías en dentición temporal. Posee un efecto antiinflamatorio y

antimicrobiano (Hauman y Love, 2003; Karabucak y Cols., 2005). Algunos estudios *in vitro* sugieren que, en menos de un día, el hidróxido de calcio produce una inactivación completa de varios tipos de microorganismos, y estudios *in vivo* demuestran que a los siete días de su aplicación se eliminan la mayoría de las bacterias. Conjuntamente, la concentración elevada de iones calcio, la liberación de iones hidroxilos, que hacen que la pulpa tenga un bajo grado de irritación, y el efecto neutralizador, por su alto pH, crean un ambiente favorable para la reparación pulpar (Barekattain y Cols., 2012).

Sin embargo, a pesar de estas características, no se recomienda su uso para realizar pulpotomías en dientes temporales, ya que da lugar a reabsorción radicular (Ranly y García Godoy, 2000; Zurn y Seale, 2008)

Otros autores como Sasaki y Cols. (2002), sí que realizaron pulpotomías con hidróxido de calcio con y sin la ayuda de electrocoagulación. Sus resultados indican que una pulpotomía con hidróxido de calcio es un tratamiento eficaz para la pulpa expuesta a caries en molares de leche y la electrocoagulación puede ampliar su indicación. Trairatvorakul y Cols. (2012), en un estudio reciente, compararon los resultados de la pulpotomía con formocresol y el uso de la pulpotomía parcial con hidróxido de calcio como tratamiento de lesiones cariosas profundas en dentición temporal. Las tasas de éxito de los 6 a los 36 meses para el hidróxido de calcio variaron del 95,03% al 75%, mientras que para el formocresol fueron del 92.7 al 74.2%, no existiendo diferencias significativas entre ambos y concluyendo que el hidróxido de calcio es una buena alternativa al formocresol para la realización de pulpotomías. Estos resultados han planteado de nuevo el uso del hidróxido de calcio para realizar pulpotomías.

Agregado Trióxido Mineral (MTA)

Esta mezcla fue desarrollada por Torabinejad con el propósito de sellar las comunicaciones existentes entre el diente y las superficies externas. Su composición consta de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, aluminato

férrico tetracálcico y silicato dicálcico. También contiene cantidades pequeñas de otros óxidos (hierro, calcio y magnesio), además del sulfato potásico, sulfato cálcico dihidratado y sodio, responsables de sus características físicas y químicas, así como el óxido de bismuto que se añade para convertirlo en un producto radioopaco (Faraco y Holland, 2001; Salako y Cols., 2003; Naik y Hedge, 2005; Srinivasan y Cols., 2006; Camilleri, 2008).

Consiste en finas partículas hidrofílicas que se activan en presencia de agua, dando lugar a un gel coloidal con un pH de 12.5, (durante la mezcla el pH es de 10.2) similar al del hidróxido cálcico. Solidifica en una estructura dura en aproximadamente cuatro horas (Torabinejad y Chivian, 1999). No es reabsorbible, tiene baja solubilidad, tiene gran capacidad selladora, una radioopacidad mayor que la dentina y promueve la reparación pulpar cuando se coloca en contacto con ella (Naik y Hedge, 2005). Es biocompatible, inocuo para el tejido pulpar y para los tejidos de alrededor, es bactericida, promueve la curación de la pulpa y la mantiene sin inflamación, no interfiere con el proceso normal de reabsorción radicular y produce un sellado hermético. Además de ser un material biocompatible es capaz de hacer que las células formen tejido nuevo manteniendo la vitalidad pulpar (Menezes y Cols., 2004).

Actualmente, el MTA es el fármaco indicado para realizar diversas aplicaciones clínicas como apicoformaciones (Karabucak y Cols., 2005; Jaramillo y Cols., 2006), pulpotomías (Naik y Hedge, 2005), protecciones pulpares directas (Faraco y Holland, 2001; Tziafas y Cols., 2002) y perforaciones radiculares (De Deus y Cols., 2006; Noetzel y Cols., 2006).

Resultados clínicos y radiográficos

Al utilizar el MTA en la realización de pulpotomías se consiguen excelentes resultados según diversos estudios (Menezes y Cols., 2004; Camilleri y Pitt, 2006; Asgary y Cols., 2006; Roberts y Cols., 2008; Tabarsi y Cols., 2010). Eidelman y Cols., (2001) realizaron este tratamiento en diecisiete molares

temporales, con un tiempo de seguimiento de trece semanas. Obtuvieron el 100% de éxito tanto clínico como radiográfico. En el estudio realizado en el que lo compararon con el formocresol, tras realizar sesenta y dos pulpotomías en dientes temporales de niños, encontraron un porcentaje de éxito con el MTA del 97% y con el formocresol del 83%.

Aunque el MTA que más frecuente se utiliza es el gris, existe otro blanco que según diversos trabajos tiene un mecanismo de acción y una biocompatibilidad (Camilleri y Cols., 2005; Ribeiro y Cols., 2006) muy similares al primero. Sin embargo, parece que el MTA gris tiene una mayor capacidad de sellado (Bidar y Cols., 2007). En cuanto a los resultados clínicos obtenidos al utilizarlo en la realización de protecciones pulpares directas, Parirokh y Cols. (2005) no encontraron diferencias significativas entre ambos, y Faraco Junior y Holland (2004) lograron valores muy similares del MTA blanco con los obtenidos en otras investigaciones con el MTA gris. Cardoso-Silva y Cols. (2011) compararon ambos materiales y aunque los dos tuvieron unas tasas elevadas de éxito en cuanto a la respuesta biológica, el MTA gris mostró mayor formación de puentes dentinarios.

Tras el uso del MTA se ha observado la decoloración del diente, aunque esto no es importante, ya que tras realizar una pulpotomía se recomienda el uso de coronas metálicas preformadas (Naik y Hedge, 2005). Ioannidis y Cols. (2013) también advierten de los cambios de color que se producen al utilizar el MTA tanto gris como blanco y sugieren no utilizarlos en zonas estéticas, siendo el menos estético de los dos el MTA gris.

También, presenta un inconveniente más a tener en cuenta: su elevado coste. Por este motivo continúa la búsqueda de un agente con las mismas características pero que no tenga un alto precio.

Resultados histológicos. Respuesta pulpar

A nivel histológico, cuando observamos el tejido dentario en contacto con él vemos depósitos de tejido duro recién formado. Estudios a largo plazo han demostrado, incluso, la formación de un puente dentinario completo (Faraco

Junior y Holland, 2004; Karabucak y Cols., 2005; Naik y Hedge, 2005). Pitt Ford y Cols. (1996), Holland (2001) y Faraco y Holland (2001) lo observaron tras realizar protecciones pulpares directas. Éstas y otras investigaciones demuestran el depósito de nuevo tejido en un periodo de dos semanas y una barrera dentinaria de tipo tubular a las tres semanas (Karabucak y Cols., 2005).

Roberts y Cols. (2008) afirman que este material da lugar a un puente dentinario homogéneo y continuo, con menos inflamación pulpar que otros materiales estudiados, como el formocresol y el hidróxido de calcio y, además, tras la realización de pulpotomías, mantiene en un 70% la pulpa vital, sin necrosis y manteniendo los dientes clínica y radiológicamente libres de patología. Asimismo, sugieren que la gran biocompatibilidad del MTA y su alto rendimiento biológico se deben a la formación de hidroxiapatita.

Además de la formación de puente dentinario, el MTA mejora la respuesta pulpar que se obtiene con otros materiales. A las dos semanas, se observa una pulpa con histología normal, con la capa odontoblástica intacta y algunas células de inflamación aguda alrededor de ella. Liu y Cols. (2011) lo compararon con el hidróxido cálcico, y Salako y Cols. (2003) con el sulfato férrico y el formocresol en pulpotomías. Todos ellos demostraron que había una menor inflamación y una mayor formación de puente dentinario en el grupo de dientes en los que el tratamiento se había realizado con MTA. Al igual que los anteriores, Faraco Junior y Holland (2004) observaron un proceso de reparación sin inflamación en los dientes de perro, a los que les realizaron una protección pulpar directa con este material.

También se ha visto que la formación de tejido duro tras su uso es similar al obtenido con hidróxido cálcico (Tziafas y Cols., 2002; Menezes y Cols., 2004). A pesar de que existen algunas diferencias entre ellos, el MTA endurece, se disuelve menos en tejidos fluidos y proporciona una barrera más compacta que la del hidróxido cálcico. Sus mecanismos de acción son similares, ya que el trióxido de calcio que forma parte del MTA, al mezclarse con agua, se transforma en óxido de calcio y éste, al entrar en

contacto con el agua de los tejidos, se transforma en hidróxido de calcio, el cual se disocia en iones hidroxilo e iones calcio. Éstos reaccionan con el dióxido de carbono presente en el tejido conectivo y se forma carbonato de calcio en forma de cristales de calcita. Los cuales, a su vez, estimulan a los fibroblastos para que secreten fibronectina, que va a estimular a los fibroblastos presentes en la zona, para que se transformen en células productoras de tejido duro (Seux, 1991; Menezes y Cols., 2004).

Además, al MTA se le atribuye la inducción de la actividad osteogénica de la fosfatasa alcalina, osteonectina, osteocalcina y osteopontina, dando lugar a la formación de un puente de tejido duro (Srinivasan y Jayanthi, 2011) En un reciente estudio se ha sugerido que la formación del puente dentinario puede ser estimulada por un proceso de solubilización de proteínas desde la dentina expuesta al MTA, con la consiguiente modulación por esas proteínas de la expresión de genes en las células preodontoblásticas (Tziafas y Cols., 2002; Ferracane y Cols., 2010).

En resumen, el MTA es capaz de estimular la dentinogénesis reparativa mediante una combinación de mecanismos. Provoca una necrosis localizada que estimula el mecanismo de reparación mediante la participación de células indiferenciadas tipo odontoblasto, que da lugar a la secreción de matriz extracelular en la que se formarán nuevos compuestos minerales (Ferracane y Cols., 2010). Cuando lo aplicamos en cultivos de células pulpares, el MTA libera iones de calcio produciendo esto la mayor expresión de la osteopontina, osteocalcina, osteonectina y la proteína morfogenética ósea (BMP). Además, el MTA es capaz de solubilizar moléculas bioactivas del diente como el factor de crecimiento TGF- β , para la formación de nuevo tejido (Smith y Cols., 2001). Cuando ponemos en contacto las células pulpares con el MTA, estas células aumentan los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que es un potente inductor de la angiogénesis, la permeabilidad vascular y está implicado en la regulación de la reparación dentino-pulpar (Paranjpe y Cols., 2011). De este modo, los experimentos actuales indican que el MTA es un agente para tratamiento pulpar efectivo, capaz de inducir la diferenciación de células de

la pulpa a células tipo odontoblastos y capaz de formar dentina terciaria con la mínima muerte celular (Masuda-Murakami y Cols., 2010).

Toxicidad

Presenta una menor citotoxicidad y mutagenicidad que otros materiales (Saltzman y Cols., 2005; Yildirim y Cols., 2005). De Menezes y Cols. (2009) compararon la toxicidad del MTA con la del formocresol, el sulfato férrico y el hidróxido de calcio. MTA tuvo la menor toxicidad in vitro y el formocresol de Buckley la mayor, con diferencia estadísticamente significativa. Asgary y Cols. (2012) evaluaron la respuesta de los fibroblastos humanos en contacto con el MTA, obteniendo una respuesta favorable demostrando que el MTA no es citotóxico.

Desde su descubrimiento en los años 90, la mayoría de las evidencias científicas lo proponen como el material más próximo al “material ideal” y sus buenos resultados sugieren que antepongamos su uso a cualquier otro agente para pulpotomía (Simancas-Pallares y Cols., 2010). Pero, como ya hemos mencionado, su elevado precio ha llevado a los investigadores a buscar otro material que produzca efectos similares sobre los procesos reparativos del complejo dentino-pulpar y que sea más económico.

2.5 NUEVOS MATERIALES PARA PULPOTOMÍA

2.5.1 MTA fotopolimerizable (Theracal[®])

TheraCal[®] (Bisco Inc, Schamburg, IL, EE.UU.) es un nuevo material fotopolimerizable, modificado con resina de silicato de calcio, tipo base/catalizador. Está diseñado para recubrimiento pulpar directo e indirecto; contiene aproximadamente un 45% en peso de material mineral (cemento Portland tipo III), un 10% de componentes radiopacos, un 5% de

un agente espesante hidrófilo (sílice ahumado) y aproximadamente el 45% de resina. La patente indica que la resina consta de un componente hidrófobo, monómeros hidrófobos tales como dimetacrilato de uretano (UDMA), bisfenol A-metacrilato de glicidilo (BisGMA), dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA), y un componente hidrófilo, monómeros hidrófilos tales como hidroxietil metacrilato (HEMA) y dimetacrilato de polietilenglicol (PEGDMA). TheraCal[®] tiene una buena capacidad de sellado y es bien tolerado por las células odontoblásticas (Gandolfi y Cols., 2011, 2012).

Gandolfi y Cols. (2011, 2012) en estudios recientes han evaluado la liberación de iones calcio e hidroxilo, la profundidad de polimerización, la solubilidad, la absorción de agua y la radiopacidad de TheraCal[®] en comparación con materiales de recubrimiento pulpar de referencia (PRO ROOT[®] MTA y Dycal[®]). Comprobaron que Theracal[®] era capaz de liberar iones calcio y crear un ambiente con pH cercano al pH fisiológico después de 7 días. Observaron que su capacidad de fotopolimerización a 1,7 mm puede evitar el riesgo de disolución prematura del material. Además, advirtieron que la capacidad de TheraCal[®] para proporcionar iones de calcio libres podría favorecer la formación de la apatita e inducir la diferenciación de los odontoblastos, con la consiguiente formación de dentina nueva.

2.5.2 Cemento CEM

Se trata de un nuevo cemento endodóntico llamado mezcla enriquecida de calcio (CEM; BioniqueDent, Irán). Parece tener un color, una capacidad de sellado, un tiempo de fraguado y un manejo adecuados. Los componentes principales del polvo de cemento CEM en peso son 51,75% de CaO, 9,53% de SO₃, 8,49% de P₂O₅, 6,32% de SiO₂, y los componentes menores son Al₂O₃ > Na₂O > MgO > Cl. Estos constituyentes dan lugar a un material bioactivo, enriquecido de calcio y fosfato, cuando se mezclan con una solución acuosa (Tabarsi y Cols., 2010).

Los resultados de estudios recientes indican que la mezcla del cemento CEM libera iones de calcio y fosfato, que luego forman hidroxiapatita, no sólo en el fluido simulado de tejido corporal, sino también en una solución salina normal (Tabarsi y Cols., 2010).

El cemento CEM presenta un pH similar, pero con él se reduce el tiempo de trabajo, el espesor de película y el precio estimado, comparado con el MTA. Aunque las composiciones químicas del cemento CEM son diferentes, los usos clínicos son idénticos a los del MTA. Los estudios iniciales han sugerido que el cemento CEM tiene resultados comparables a los del MTA cuando se utiliza como agente de recubrimiento pulpar, como material de reparación en las perforaciones de furca o como material para apicoformaciones. También muestra resultados favorables cuando se utiliza en pulpotomía de molares permanentes con pulpitis irreversible y en el tratamiento de la reabsorción radicular interna. Este cemento no sólo parece tener efectos antibacterianos, comparables con el MTA y superiores al cemento Portland, sino que tiene también un bajo efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares, al igual que el MTA. La respuesta histológica del cemento CEM comparado con el hidróxido de calcio y el MTA, cuando se usan como agentes para pulpotomías en la dentición temporal, es similar en todos los casos, pudiendo afirmar que el cemento CEM es un material óptimo para este tipo de tratamientos (Tabarsi y Cols., 2010)

Asgary y Eghbal (2010a, 2010b) llegaron a la conclusión de que el cemento CEM tiene un postoperatorio significativamente mejor, con menos dolor y menor utilización de analgésicos en comparación con la primera instrumentación de un tratamiento pulpar. Por lo tanto, afirman que la pulpotomía con cemento CEM puede ser superior al tratamiento convencional en dentición permanente con pulpitis irreversible.

Asgary y Cols. (2012) demostraron que el cemento CEM no es citotóxico, al ponerlo en contacto con fibroblastos humanos.

2.5.3 Hipoclorito de sodio

De fórmula química NaClO, el hipoclorito de sodio, o hipoclorito sódico es un compuesto químico fuertemente oxidante ya que contiene el cloro en estado de oxidación +1. Son conocidas sus propiedades desinfectantes en endodoncia para la irrigación y limpieza de los conductos radiculares. Es un producto muy económico.

Vargas y Cols. (2006) compararon la eficacia de hipoclorito de sodio al 5% con la del sulfato férrico (FeSO_4) como medicamento para pulpotomías en molares primarios cariados. A los 6 meses de tratamiento el hipoclorito mostró un 100% de éxito clínico y un 91% de éxito radiográfico, y a los 12 meses de tratamiento mostró de nuevo un 100% de éxito clínico y un 79% de éxito radiográfico. Este estudio muestra, por tanto, la evidencia preliminar de que el NaOCl se puede utilizar con éxito como un medicamento para la realización de pulpotomías.

Vostatek y Cols. (2011) realizaron un estudio cuyo propósito fue evaluar el éxito clínico y/o radiográfico a los 21 meses de NaOCl al 5% como medicamento en pulpotomías de molares primarios en comparación con los datos publicados para pulpotomías con formocresol y sulfato férrico. Las pulpotomías con NaOCl tuvieron un 95% de éxito clínico y un 82% de éxito radiográfico. La reabsorción radicular externa fue el hallazgo patológico más común. El éxito de estas pulpotomías fue disminuyendo con el tiempo.

Ruby y Cols. (2013) realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar el hipoclorito sódico al 3% con el formocresol en pulpotomías de molares temporales. El hipoclorito mostró unas medias de un 86% de éxito clínico y un 84% de éxito radiográfico tanto a los 6 como a los 12 meses de tratamiento.

2.5.4 Ankaferd Blood Stopper[®] (ABS) (Trend Teknoloji ilaç AS, Estambul, Turquía)

Consiste en una mezcla estandarizada de 5 extractos de plantas medicinales, que históricamente se ha venido usando en la medicina tradicional turca como agente hemostático. Cada una de las plantas (*Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* y *Urtica dioica*) tienen algunos efectos sobre el endotelio, las células sanguíneas, la angiogénesis, la proliferación celular, la dinámica vascular y los mediadores celulares, sin embargo, el mecanismo básico de acción de los efectos hemostáticos de ABS es todavía desconocido (Goker y Cols., 2008; Aydin, 2009).

Yaman y Cols. (2012) comparan el éxito clínico y radiográfico de ABS y formocresol como materiales para pulpotomías en molares temporales durante un periodo de 12 meses. A los 3 meses, el éxito clínico y radiográfico fue del 100%, a los 6 meses, del 93.3% y a los 12 meses, del 85.7%, no existiendo diferencias significativas con el formocresol. Así, afirman que el ABS puede ser un material alternativo para la realización de pulpotomías.

2.5.5 Propóleo

Resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular, e incluso remineralizante del esmalte dentario (Farré y Cols., 2004).

Varios estudios de los años 90 sostienen que los extractos alcohólicos de propóleo poseen una acción anestésica local, atribuible a su contenido en

pinocembrina y ésteres de cafeato, y efecto cariostático, que depende de su composición. Se ha observado que el extracto etanólico de propóleo brasileño, rico en pinocembrina y galangina, inhibe la actividad glucosiltransferasa y el crecimiento del *Streptococcus mutans*. Las flavanonas, algunos dihidroflavonoles y el sesquiterpeno tt-farnesol, que es el agente antibacteriano más activo, inhiben el crecimiento del *St mutans* y del *St sobrinus* en la cavidad oral, y las flavonas y flavonoles, en particular la apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona), inhiben la actividad glucosiltransferasa del *St mutans* y del *St sanguinis*. La histología dental demuestra que tanto la pasta dental a base de propóleo como la de hidróxido cálcico inhiben el crecimiento bacteriano y estimulan la reparación de la dentina, en cambio, los colutorios a base de propóleo no impiden la formación de placa dental (Farré y Cols., 2004).

Ozório y cols (2012) realizaron un estudio donde evaluaron las características histológicas del tejido pulpar en dientes de cerdo primarios sometidos a pulpotomía con una base de hidróxido de calcio, una base estandarizada de extracto de própolis, y la combinación de ambas pastas. A los 42 días, en todos los dientes de los 3 grupos de estudio, se observó la formación de una capa de tejido duro y bajo ella pulpa sana sin inflamación. De acuerdo con estos hallazgos, el hidróxido de calcio y el extracto de propóleo favorecieron la formación de una barrera de tejido duro en dientes de cerdo primarios sometidos a pulpotomía.

2.5.6 Células madre

La pulpa dental tiene muchas funciones importantes y esenciales en la homeostasis y el mantenimiento de los dientes. El objetivo de las investigaciones debería centrarse en regenerar el complejo dentino-pulpar y restaurar las funciones de una pulpa comprometida por la caries o la inflamación. Un enfoque prometedor para ello es la terapia celular con células madre/progenitoras de la pulpa, dirigida por morfógenos tales como

proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factores crecimiento o factores de diferenciación (Casagrande y Cols., 2011; Huang, 2011).

Algunos autores afirman que tanto la angiogénesis/vasculogénesis como la neurogénesis son esenciales para la regeneración de la pulpa. En sus estudios aislaron dos subfracciones de células madre progenitoras, CD31-/CD146- y CD105+. Estas células presentan un potencial altamente vasculogénico y neurogénico para la regeneración de la pulpa. Tras un largo proceso cuyo último paso fue el trasplante celular en los modelos de pulpotomía y pulpectomía en dientes de perro, se logró con éxito la regeneración pulpar (Nakashima y Cols., 2009; Nakashima y Iohara, 2011)

2.5.7 Biodentine[®] (Septodont, St Maur des Fossés, Francia)

Es un cemento a base de calcio. El componente principal del polvo es el silicato tricálcico, con la adición al polvo de CaCO_3 y ZrO_2 . El líquido es una solución de CaCl_2 con un agente reductor de agua. Como todo cemento, la reacción de fraguado conduce a una estructura de gel, lo que permite posibles intercambios iónicos. En comparación con otros cementos basados en calcio, este material presenta dos ventajas, un menor tiempo de ajuste, de aproximadamente 12 minutos, y mayores propiedades mecánicas. Estas propiedades físico-químicas asociadas con el comportamiento biológico sugieren que se puede utilizar como un sustituto de la dentina permanente (Koubi y Cols., 2013).

Biodentine[®] tiene un mejor tiempo de fraguado, mejor manipulación y mejores propiedades mecánicas que el MTA. Se está empezando a utilizar en clínicas dentales como material de restauración y también ha sido propuesto como agente de recubrimiento pulpar directo, aunque su efecto directo sobre el tejido de la pulpa no está bien demostrado (Tran y Cols., 2012).

Tran y Cols. (2012) realizaron un estudio para demostrar el efecto de Biodentine[®] como agente para protección pulpar directa. Los resultados de

este estudio sugieren que el cemento evaluado proporciona un entorno óptimo para la cicatrización de pulpa, comparable con el obtenido con el MTA. El análisis de estos datos apunta a que este cemento reconstituyente es biocompatible y puede ser también utilizado para el recubrimiento pulpar.

Laurent y Cols. (2012) realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la capacidad de este nuevo cemento de silicato tricálcico para inducir la síntesis de dentina reparativa e investigar su capacidad para modular la secreción de TGF- β 1 por las células de pulpa. Cuando Biodentine[®] se aplicó directamente sobre la pulpa, indujo una forma temprana de dentina reparativa que podría ser debido a una modulación de la secreción de TGF- β 1 por las células de la pulpa.

Zanini y Cols. (2012) realizaron un trabajo para conocer el efecto biológico de Biodentine[®] en las células de la pulpa (OD-21) cultivadas. Los resultados sugieren que Biodentine[®] es un cemento bioactivo porque aumentó la proliferación celular de OD-21 y la biomineralización en comparación con los controles. Debido a su bioactividad, Biodentine[®] puede ser considerado como un material adecuado para las indicaciones clínicas que requieren regeneración del complejo dentino-pulpar, tales como recubrimiento pulpar directo.

Leiendecker y Cols. (2012) advierten que el contacto prolongado de la dentina mineralizada con Biodentine[®] tiene un efecto adverso sobre la integridad de la matriz de colágeno dentinaria. Aunque, la cantidad de colágeno dañado se limita solamente a la superficie de contacto y afirman que Biodentine[®] puede seguir utilizándose, recomiendan tener precaución cuando se aplique el material en paredes dentinarias estrechas.

2.5.8 Aceite de Nigella Sativa (NS)

La Nigella Sativa es una especie de planta herbácea de la familia de las Ranunculaceae originaria de Asia occidental. Omar y Cols. (2012) inmersos en la búsqueda de nuevos agentes de recubrimiento pulpar, realizaron

pulpotomías en dientes de perro comparando el formocresol y el aceite de NS. Tras cuatro semanas de tratamiento observaron que el grupo de NS mostró una vasodilatación de leve a moderada, una capa odontoblástica continua y algunos ejemplares mostraron infiltración de células inflamatorias. Mientras que el grupo de formocresol mostró una vasodilatación de moderada a severa con infiltración de numerosas células inflamatorias y cambios degenerativos en la pulpa. Concluyeron, por lo tanto, que NS posee un efecto anti-inflamatorio y que la pulpa mantiene su vitalidad después de su aplicación, lo que podría permitir su uso como un medicamento para la realización de pulpotomías en la práctica clínica.

2.5.9 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es una hormona presente en el organismo de animales superiores y sintetizada en la glándula pineal de los mismos, situada en el centro del cerebro, sobre el techo del tercer ventrículo cerebral. Desde que a mediados de los años setenta aparecieran los primeros anticuerpos altamente específicos para melatonina, ésta se ha ido identificando en órganos, tejidos y células muy dispares, lo cual ha puesto de manifiesto la posibilidad de fuentes extrapineales de melatonina como son el cerebelo, el tracto gastrointestinal y el sistema inmunitario.

La melatonina es un compuesto pleiotrópico con importantes propiedades cronobióticas. Se ha observado, en efecto, su capacidad para resincronizar el ritmo circadiano en diferentes situaciones, desde el ciclo circadiano libre de control medioambiental hasta el trabajo por turnos, pasando por el malestar que acompaña a los viajes transoceánicos. Además de su capacidad para resincronizar los ritmos circadianos parece ser la responsable de la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (Sletten y Cols., 2010).

Posee, además, capacidad antioxidante: constituye un neutralizador directo de radicales libres y potencia el efecto de antioxidantes clásicos y enzimas antioxidantes. Tiene capacidad oncostática, puesta de manifiesto en modelos

tumorales *in vivo* e *in vitro*, sobre todo en aquellos dependientes de hormonas; sin olvidar sus propiedades demostradas de adyuvante en diversas terapias antitumorales (Jardim-Perassi y Cols. 2014).

Algunos estudios demuestran que es capaz de promover la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización de la matriz en cultivo, y sugieren que la melatonina puede jugar un papel esencial en la regulación del crecimiento óseo (Roth y Cols., 1999). Además, se ha contemplado que la melatonina estimula la proliferación y actividad de la fosfatasa alcalina de los osteoblastos humanos en una forma dosis-dependiente a concentraciones farmacológicas; también promueve la expresión de genes del colágeno tipo I, la osteopontina, la sialoproteína del hueso, la osteocalcina de manera dosis-dependiente, y estimula la formación de matriz mineralizada *in vitro* (Nakade y Koyama, 1999), al igual que el MTA. Por otra parte, la administración intraperitoneal de melatonina en ratones aumentó el volumen de hueso neoformado en la cortical del fémur. Estos estudios demuestran que la melatonina acelera la diferenciación de los osteoblastos de los humanos, así como en roedores y pollos y también sugieren que la melatonina puede ser aplicada como un agente farmacéutico para promover la regeneración ósea (Satomura y Cols., 2007). La melatonina parece prevenir la reabsorción ósea a través de varios mecanismos que incluyen la diferenciación de osteoblastos y el aumento de la actividad osteoblástica, así como la reducción de la actividad y la diferenciación de los osteoclastos, junto con el aumento de la expresión de osteoprotegerina y la neutralización de los radicales libres responsables de la reabsorción ósea (Cardinalli y Cols., 2003; Cutando y Cols., 2007; Calvo-Guirado y Cols., 2010; Sánchez-Barceló y Cols., 2010; Muñoz y Cols., 2012).

Poco es conocido sobre los efectos de la melatonina en el crecimiento y desarrollo del diente. Un estudio en dientes humanos y de ratón sugiere que la melatonina podría influir en el desarrollo del diente al igual que actúa en la formación del hueso. Así, mediante un análisis inmunohistoquímico, se reveló que el receptor M1a de la melatonina se expresa en ameloblastos secretores, células del estrato intermedio y retículo estrellado, células del

epitelio dental externo, odontoblastos y en células del saco dentario, influyendo en la regulación de la función celular de los odontoblastos (Kumasaka y Cols., 2010).

2.5.10 Biocerámicas: Hidroxiapatita (HA) y Fosfato Beta-Tricálcico (β -TCP)

Está ampliamente comprobado en la literatura que ambas biocerámicas, HA y β -TCP son idóneas como sustitutos óseos y que tienen cualidades osteoconductoras satisfactorias. Estos materiales se han injertado para producir la regeneración ósea de, por ejemplo, defectos periodontales, elevación de seno, rellenos post extracción, apiceptomías, quistes o aumento del reborde alveolar (Abd El-Fattah y Cols., 2010; Calvo-Guirado y Cols., 2012).

Tomomura y Cols. (2010) han experimentado con la mezcla de HA y β -TCP, usando esta cerámica bifásica como base para la formación de un puente dentinario usando un cultivo de células pulpares porcinas y transplantándolas junto con el material en el lomo de ratones. Indican que, con este material se mantiene el espacio de regeneración, siendo una guía para el nuevo tejido dentinario, biocompatible, obteniendo un diseño estructural y un tiempo de degradación adecuados.

Shayegan y Cols. (2008, 2009) evaluaron los efectos del β -TCP con otros materiales en pulpotomías en dientes de cerdo. Tras 3 semanas de actuación del material, no existieron diferencias significativas entre el beta fosfato tricálcico, y el MTA en términos de respuesta pulpar primaria, formación de tejido duro y conservación normal de la pulpa. Siendo estos dos materiales más eficaces histológicamente que el formocresol y el sulfato férrico con los que también se compararon.

Higashi y Okamoto ya en 1996 llevaron a cabo un estudio, donde realizaron pulpotomías en dientes de perro, cuyo objetivo era evaluar qué tamaño de partícula, tanto de HA como de β -TCP, era el más adecuado para la

realización de este tratamiento dental. Los resultados obtenidos fueron que, cuando las partículas de HA o β -TCP tienen 300 micras, la formación de dentina terciaria es mayor y se observa menos inflamación que cuando las partículas son de 40 micras. Concluyendo, de este modo, que el tamaño de las partículas de estos materiales es un factor a tener en cuenta cuando realizamos un tratamiento de este tipo y pretendemos formar dentina reparativa.

3- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

- La melatonina usada como agente para la realización de protecciones pulpares directas en molares de rata produce un efecto sobre pulpa dental similar al producido por el MTA.
- La administración oral de melatonina mejora la respuesta de la pulpa dental al MTA y la Melatonina cuando se usan como agentes para la realización de protecciones pulpares directas.
- La mezcla de hidroxiapatita, fosfato beta-tricálcico y colágeno (HA/ β -TCP/C) usada como agente para la realización de protecciones pulpares directas en molares de rata produce un efecto similar al producido por el MTA.

3.2 OBJETIVOS

- Objetivo 1. Evaluar la respuesta de la pulpa de molares de rata a la melatonina cuando se usa como agente para la realización de protecciones pulpares directas.
- Objetivo 2. Comparar el efecto sobre la pulpa dental de molares de rata del MTA y la melatonina cuando se usan como agentes para la realización de protecciones pulpares directas.
- Objetivo 3. Evaluar la respuesta de la pulpa de molares de rata a HA/ β -TCP/C cuando se usa como agente para la realización de protecciones pulpares directas.
- Objetivo 4. Comparar el efecto sobre la pulpa dental de molares de rata del MTA y HA/ β -TCP/C cuando se usan como agentes para la realización de protecciones pulpares directas.
- Objetivo 5. Evaluar el efecto antioxidante sistémico de la melatonina administrada por vía oral, y su influencia sobre el efecto que el MTA y la melatonina tienen sobre la pulpa dental cuando se usan como agentes para la realización de protecciones pulpares directas en molares de rata.

4- MATERIAL Y MÉTODO

4.1 ANIMALES Y PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Nuestro estudio se ha realizado conforme al Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Las ratas utilizadas proceden del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, cuyo número de registro es ES300305440012 en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, como centro usuario de la actividad de cría. Según Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

Se usaron 28 ratas Sprague-Dawley (SD) con un peso medio de 230 gramos. Se dividieron en 7 grupos de 4 ratas cada uno. Se realizaron 4 protecciones pulpares directas por cada rata en los primeros y segundos molares superiores, estando éstos sanos y libres de caries.

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular con una mezcla (0,2 ml/100 g de peso) de Rompun[®] (clorhidrato de xilacina 2%; Bayer. Kiel, Alemania) e Imalgene[®] 1000 (clorhidrato de ketamina 100 mg + Clorobutanol 5 mg; Merial. Barcelona, España) al 50% (Figura 1).



Figura 1: Anestesia intramuscular

Se limpiaron las superficies de los dientes con clorhexidina PerioAid[®] (clorhexidina 0,12%; Dentaïd. Barcelona, España). El procedimiento para

realizar la protección pulpar directa fue el siguiente: apertura de la cámara pulpar de los molares con fresa piriforme de carburo de tungsteno de 0,8 mm de diámetro (KOMET, Lemgo, Alemania) montada en una turbina (KaVo SMART torque LUX S615 L, Biberach an der Riss, Alemania) con abundante refrigeración acuosa para evitar el sobrecalentamiento del diente (Figura 2); se eliminó la pulpa cameral. Se controló la hemorragia con bolita de algodón estéril y puntas de papel en un tiempo no superior a 5 minutos (Figura 3). Se colocó el material de estudio sobre la pulpa expuesta. Posteriormente se colocó una base de óxido de zinc-eugenol IRM® (Dentsplay Tulsa, EE.UU.) (Figura 4) y se obturó la cavidad con amalgama de plata (Syllanoy, TERNaire 94152 Rungis, Francia) (Figura 5). Finalmente, se realizó el control de la oclusión.



Figura 2: Apertura de la cámara pulpar



Figura 3: Control de la hemorragia con puntas de papel



Figura 4: Colocación material de estudio e IRM



Figura 5: Obturación con amalgama

4.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

-GRUPO MTA 30 días (n=16). Usamos PRO ROOT® MTA (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Suiza) como material para realizar las protecciones pulpares directas según las instrucciones del fabricante. Dejamos actuar el material durante 30 días.

-GRUPO Melatonina 30 días (n=16). Usamos una mezcla de 5 mg de una preparación de melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y 245 mg de almidón de maíz (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) que mezclamos con agua destilada hasta conseguir una consistencia crema. La mezcla se aplicó sobre la pulpa expuesta y se dejó actuar durante 30 días.

-GRUPO MTA + Melatonina vía oral (v.o.) (n=16). Usamos PRO ROOT[®] MTA (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Suiza) como material para realizar las protecciones pulpares según las instrucciones del fabricante. Dejamos actuar el material durante 30 días. A las 4 ratas pertenecientes a este grupo se les añadió en el agua de bebida melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a una concentración de 10 mg por cada 100 ml de agua, que las ratas bebieron ad libitum durante los 30 días del experimento.

-GRUPO Melatonina + Melatonina v.o. (n=16). Usamos una mezcla de 5 mg de una preparación de melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y 245 mg de almidón de maíz (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) que mezclamos con agua destilada hasta conseguir una consistencia crema. La mezcla se aplicó sobre la pulpa expuesta y se dejó actuar durante 30 días. A las 4 ratas pertenecientes a este grupo se les añadió en el agua de bebida melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a una concentración de 10 mg por cada 100 ml de agua, que las ratas bebieron ad libitum durante los 30 días del experimento.

-GRUPO MTA 60 días (n=16). Usamos Pro Root MTA[®] (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Suiza) como material para realizar las protecciones pulpares directas según las instrucciones del fabricante. Dejamos actuar el material durante 60 días.

-GRUPO Melatonina 60 días (n=16). Usamos una mezcla de 5 mg de una preparación de melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y 245 mg de almidón de maíz (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) que mezclamos con agua destilada hasta conseguir una consistencia crema. La mezcla se aplicó sobre la pulpa expuesta y se dejó actuar durante 60 días.

-GRUPO HA/ β -TCP/C (n=16). Usamos una mezcla de hidroxiapatita al 40%, β -TCP al 30% y colágeno al 30% que mezclamos con agua destilada hasta conseguir una consistencia crema. El tamaño de partícula de la HA y β -TCP fue de 600 micras. La mezcla se aplicó sobre la pulpa expuesta y se dejó actuar durante 30 días.

Procedimiento histológico

Se anestesiaron y sacrificaron las ratas realizándoles una laparotomía amplia, se les diseccionó la aorta abdominal, se canuló y se extrajo un mínimo de 5 ml de sangre. Inmediatamente, se procedió a la extracción de ambos riñones y del hígado. Tanto la sangre como los riñones y los hígados se congelaron a una temperatura de -80 °C.

Se separaron los fragmentos de maxilar que contenían los molares de estudio, se lavaron y limpiaron los restos de material orgánico, y se introdujeron en formaldehído al 10% durante 15 días para fijar los tejidos y 30 días en TBD-2 (Ácido fórmico 26% + citrato sódico 8,5%; Anatomical Pathology International. Runcorn. Gran Bretaña) para descalcificar los tejidos duros. Posteriormente, se deshidrataron, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 8 micras para su tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y con tricrómico de Masson para teñir el colágeno, y se observaron al microscopio óptico (Leica DM 5000 B).

4.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

En los molares de estudio se valoró el grado de inflamación pulpar, la presencia de vitalidad pulpar, presencia de puente dentinario y de dentina reparativa a lo largo de los conductos, la presencia y regularidad de la capa odontoblástica y la presencia de fibrosis en la pulpa siguiendo los criterios de evaluación de Horsted y Cols. (1981) modificados por Fuks y Cols. (1991) (Tabla 1).

GRADO DE INFLAMACIÓN	0- Ausencia de inflamación 1- Inflamación leve 2- Inflamación moderada 3- Inflamación severa 4- Absceso
VITALIDAD PULPAR	0- Ausencia 1- Presencia
PUENTE DENTINARIO Y DENTINA REPARATIVA	0- Ausencia 1- Presencia
CAPA ODONTOBLÁSTICA	0- Ausencia 1- Regular 2- Irregular
FIBROSIS	0- Ausencia 1- Presencia

Tabla 1. Criterios histológicos

4.4 ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Se realizó un ensayo TBARS de tejido plasmático, renal y hepático como una medida de la peroxidación lipídica, mediante un método colorimétrico como sigue (Ortiz y Cols., 2003): se utilizó una muestra de 200 µl de plasma, riñón o hígado lisados. Se añadió 0.5 ml de tampón fosfato a las muestras de los lisados. Después de mezclar, se añadió 1 ml de una solución de reactivo que contiene 66 mg% de mesilato de deferoxamina, 7.5% de TCA, 0.25M de HCl y 0.37% ácido tiobarbitúrico. La mezcla fue agitada, cubierta con papel de aluminio y se calentó a 100 °C durante 15 minutos en un heatblock (Heatblock II, VWR). Una vez que la temperatura descendió a temperatura ambiente, las muestras para los TBARS estándares preparadas y lisadas (preparado a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano), fueron extraídas en 1 ml de 1-butanol. Finalmente, se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. El color de la capa de butanol fue leído a 532 nm en un espectrofotómetro

(Biophotometer plus, Eppendorf). Los valores se expresaron en nmol/ml en las muestras de plasma y nmol/mg de proteínas en el tejido renal y hepático. La concentración de proteínas se midió mediante un kit de ensayo de ácido bicinconínico (Novagen[®], Calbiochem).

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los resultados histológicos, se ha utilizado una estadística descriptiva obteniéndose una distribución de frecuencias de cada variable. La comparación de grupos se ha realizado mediante análisis de tablas de contingencia con el test de la X^2 de Pearson. Este análisis se ha complementado con un análisis de residuos con objeto de determinar las asociaciones significativas.

Para analizar los resultados de TBARS de plasma, riñón e hígado se realizó un análisis de varianza simple ANOVA para plasma e hígado, ya que los resultados mostraron una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Para las muestras de riñón utilizamos un análisis de varianza sobre rangos de Kruskal-Wallis ya que aunque presentaron normalidad no presentaron homogeneidad de varianzas.

5- RESULTADOS

5.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En la siguiente tabla (Tabla 2) podemos observar los resultados histológicos de los diferentes grupos de tratamiento expresados en porcentajes. Siendo los grupos:

Grupo 1 (G1): MTA 30 días

Grupo 2 (G2): Melatonina 30 días

Grupo 3 (G3): MTA + Melatonina v.o.

Grupo 4 (G4): Melatonina + Melatonina v.o.

Grupo 5 (G5): MTA 60 días

Grupo 6 (G6): Melatonina 60 días

Grupo 7 (G7): HA/ β -TCP/C

		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
GRADO DE INFLAMACIÓN	Ausencia	100	100	100	87,5	83,33	87,5	100
	Leve	-	-	-	-	-	12,5	-
	Moderada	-	-	-	12,5	16,66	-	-
	Severa	-	-	-	-	-	-	-
	Absceso	-	-	-	-	-	-	-
VITALIDAD PULPAR	Ausencia	-	-	-	12,5	16,66	-	-
	Presencia	100	100	100	87,5	83,33	100	100
PUENTE DENTINARIO Y DENTINA REPARATIVA	Ausencia	12,5	25	20	50	16,33	37,5	75
	Presencia	87,5	75	80	50	83,33	62,5	25
CAPA ODONTOBLÁSTICA	Ausencia	-	18,75	-	12,5	33,33	43,75	43,75
	Regular	100	81,25	86,66	87,5	66,66	56,25	56,25
	Irregular	-	-	13,33	-	-	-	-
FIBROSIS	Ausencia	-	18,75	-	12,5	16,66	25	25
	Presencia	100	81,25	100	87,5	83,33	75	75

Tabla 2. Resultados histológicos más notables de cada grupo experimental. Datos expresados en porcentajes (%).

5.1.1 Grado de inflamación (Tablas 4 y 5)

Todos los grupos presentaron ausencia de inflamación en el 100% de las muestras, salvo el grupo 4 (Melatonina + Melatonina v.o.) y el grupo 5 (MTA 60 días) que presentaron en un 12,5% y 16,66%, respectivamente, un grado de inflamación moderado; y el grupo 6 (Melatonina 60 días) que presentó en un 12,5% un grado de inflamación leve. No se observó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p=0,024$).

5.1.2 Grado de vitalidad pulpar (Tablas 6 y 7)

Para el grado de vitalidad pulpar tampoco se aprecian diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p=0,61$). Los grupos 1, 2, 3, 6 y 7 presentaron vitalidad pulpar en el 100% de las muestras. El grupo 4 (Melatonina + Melatonina v.o.) presentó necrosis en el 12,5% de los casos y el grupo 5 (MTA 60 días) en el 16,66 %.

5.1.3 Puente dentinario y dentina reparativa (Tablas 8 y 9)

Para la variable puente dentinario y dentina reparativa, sí existen diferencias significativas ($p=0,002$). El grupo 1 (MTA 30 días) se asocia a la presencia de puente dentinario y dentina reparativa y el grupo 7 (HA/ β -TCP/C) se asocia a la ausencia, ambos de forma significativa.

5.1.4 Capa odontoblástica (Tablas 10 y 11)

Para la variable capa odontoblástica hay diferencias significativas entre los grupos ($p=0,002$). El grupo 1 (MTA 30 días) se asocia significativamente a la presencia de una capa odontoblástica regular. El grupo 3 (MTA 30 días + Melatonina v.o.) se asocia significativamente a la presencia de capa odontoblástica ya sea regular o irregular. Los grupos 6 (Melatonina 60 días)

y 7 (HA/ β -TCP/C) se asocian significativamente a la ausencia de una capa odontoblástica regular.

5.1.5 Grado de fibrosis (Tablas 12 y 13)

En cuando a la variable fibrosis no se aprecian diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p=0,194$).

5.2 OBSERVACIÓN HISTOLÓGICA

5.2.1 MTA 30 días

En este grupo de tratamiento se evaluaron 16 dientes. A los 30 días la histología mostró un tejido pulpar con presencia de fibrosis y dentina reparativa atubular en contacto con el MTA (Figura 6). Observamos una capa odontoblástica que se mantiene regular y ausencia de inflamación en la pulpa dental (Figura 7).

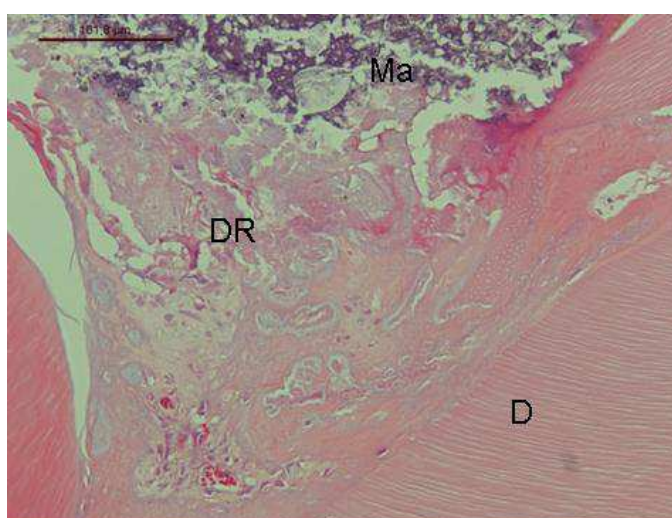


Figura 6. MTA 30 días. Presencia de dentina reparativa atubular (DR), en contacto con el material (Ma). Dentina tubular (D). H-E 20x.

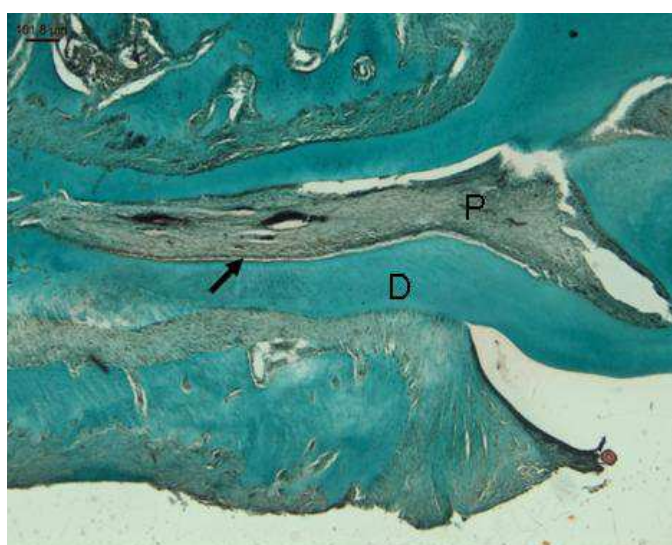


Figura 7. MTA 30 días. Pulpa sana (P), capa odontoblástica regular (flecha) y dentina tubular (D). Masson 5x.

5.2.2 Melatonina 30 días

En este grupo experimental se evaluaron 16 dientes histológicamente. 30 días después del tratamiento, el patrón más común fue el de una pulpa sana, vital y sin inflamación, con presencia de una capa odontoblástica regular (Figura 8). A nivel apical observamos frecuentemente la presencia de fibrosis (Figura 9).

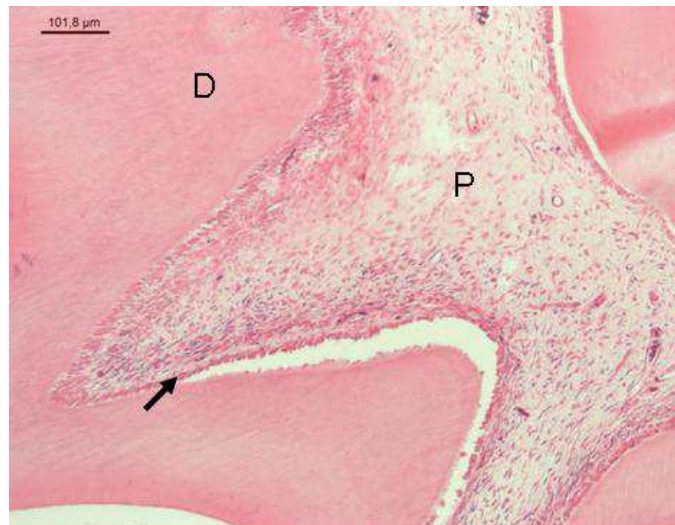


Figura 8. Melatonina 30 días. Pulpa sana (P), capa odontoblástica regular (flecha) y dentina tubular (D). H-E 10x.

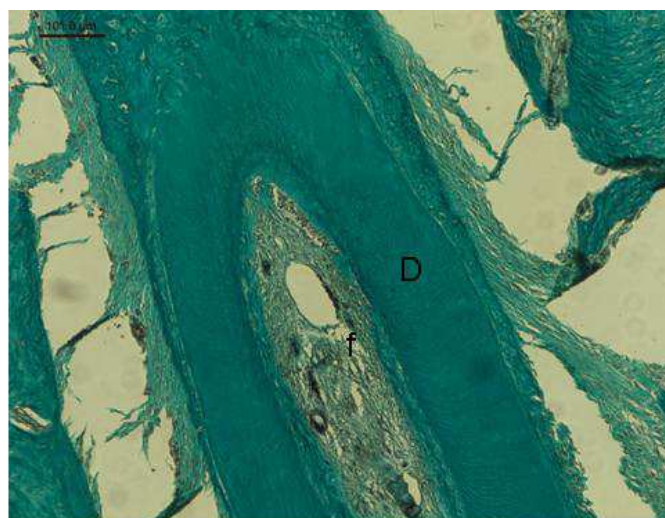


Figura 9. Melatonina 30 días. Presencia de fibrosis (f) a nivel apical y dentina tubular (D). Masson 10x.

5.2.3 MTA + Melatonina v.o.

En este grupo se trataron 15 dientes ya que uno de ellos se perdió debido a un fallo en el procesado de la muestra para su histología. A los 30 días, la histología mostraba una pulpa sana vital y sin inflamación, con presencia de muchos vasos sanguíneos y la capa de odontoblastos se mantenía regular en el 86,66% de los casos (Figura 10). También fue característico encontrar fibrosis a nivel del tercio apical (Figura 11).

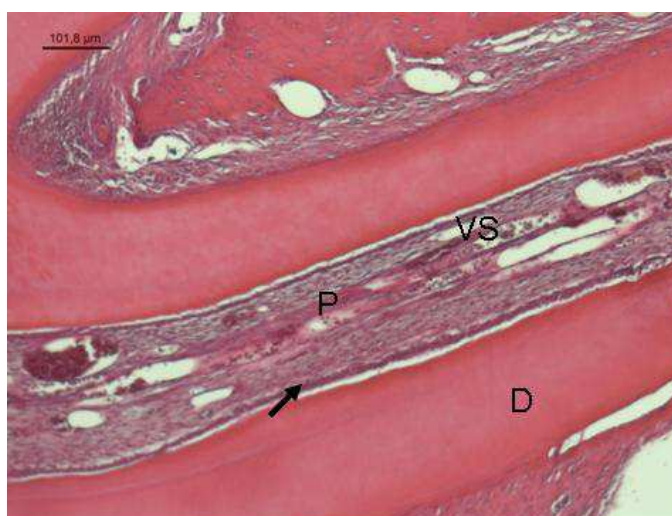


Figura 10. MTA + Melatonina v.o. Pulpa sana (P) con presencia de vasos sanguíneos (VS) y capa odontoblástica regular (flecha). Dentina tubular (D). H-E 10x.

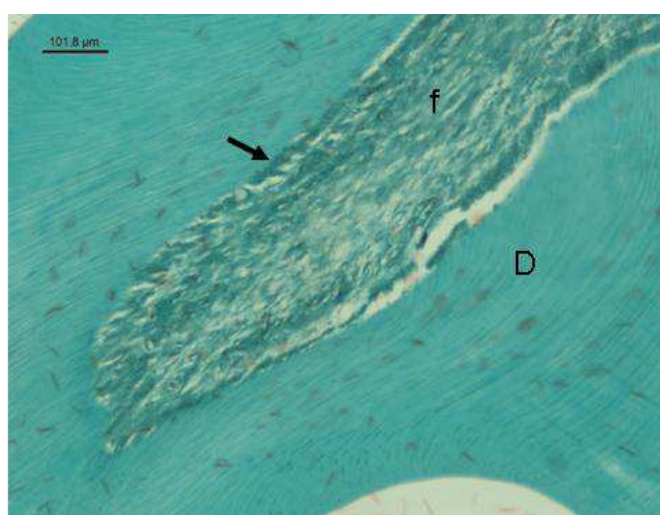


Figura 11. MTA + Melatonina v.o. Fibrosis (f) a nivel apical, capa odontoblástica regular (flecha) y dentina tubular (D). Masson 10x.

5.2.4. Melatonina + Melatonina v.o.

En este grupo experimental se trataron 16 dientes. De ellos, 2 dientes perdieron su amalgama correspondiente durante el periodo de actuación del material. 30 días después del tratamiento, la histología mostraba una pulpa sana con presencia de vasos sanguíneos y una capa odontoblástica regular en el 87,5% de los casos (Figura 12). Fue característico encontrar fibrosis a lo largo del conducto radicular (Figura 13). Solo en el 50% de las muestras encontramos formación de dentina reparativa.

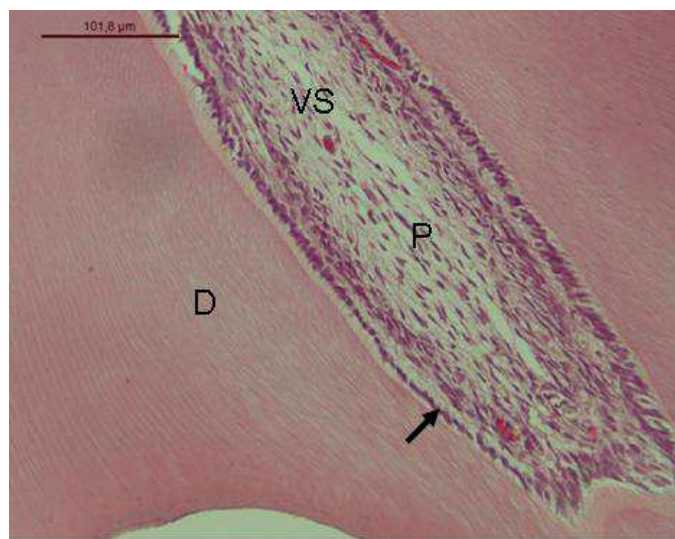


Figura 12. Melatonina + Melatonina v.o. Pulpa sana (P) con presencia de vasos sanguíneos (VS) y capa odontoblástica regular (flecha). Dentina tubular (D). H-E 20x.



Figura 13. Melatonina + Melatonina v.o. Presencia de fibrosis (f) a lo largo del conducto radicular. Dentina tubular (D). Masson 10x.

5.2.5 MTA 60 días

En este grupo se trataron 12 dientes, ya que uno de los animales falleció durante el periodo experimental. Uno de estos 12 dientes perdió la amalgama durante el periodo de actuación del material. A los 60 días la histología mostraba ausencia de inflamación y vitalidad pulpar en el 83,33% de los casos y una capa odontoblástica regular en el 66,6% (Figura 14). Se observa la presencia de dentina reparativa y fibrosis en el 83,33% de las muestras (Figura 15). Un molar de este grupo presenta degeneración vacuolar, es decir, un grado más avanzado de necrosis, producida probablemente, por una microfiltración del material de estudio.

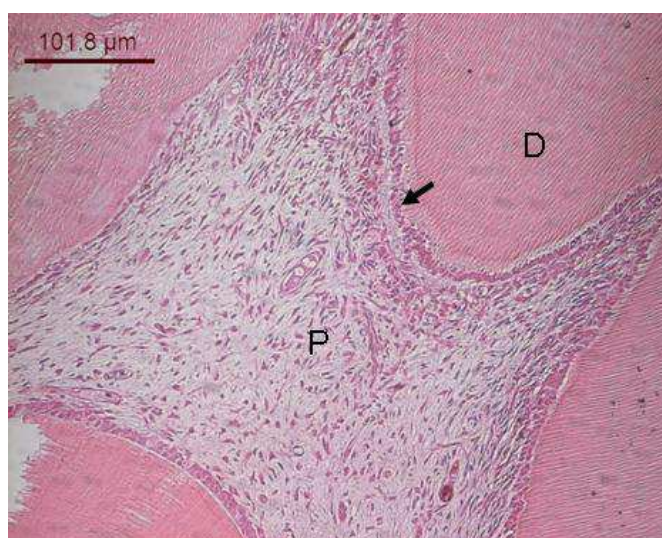


Figura 14. MTA 60 días. Pulpa sana (P), capa odontoblástica regular (flecha). Dentina tubular (D). H-E 10x.

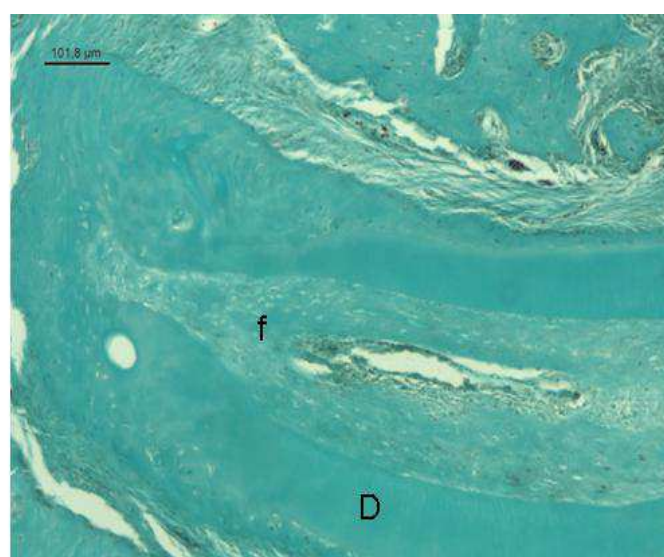


Figura 15. MTA 60 días. Fibrosis (f) y dentina reparativa a lo largo del conducto radicular. Dentina tubular (D). Masson 10x.

5.2.6 Melatonina 60 días

En este grupo se estudiaron 16 molares. Todos los dientes estuvieron vitales. En cuanto a la capa odontoblástica, en el 56,25% de los casos ésta es regular, estando ausente en el 43,75% (Figuras 16 y 17). Además, se observa la presencia de puente dentinario y dentina terciaria, en el 62,5% de los casos, originada por un proceso de fibrosis (75%) seguido de un proceso de calcificación de los conductos radiculares.

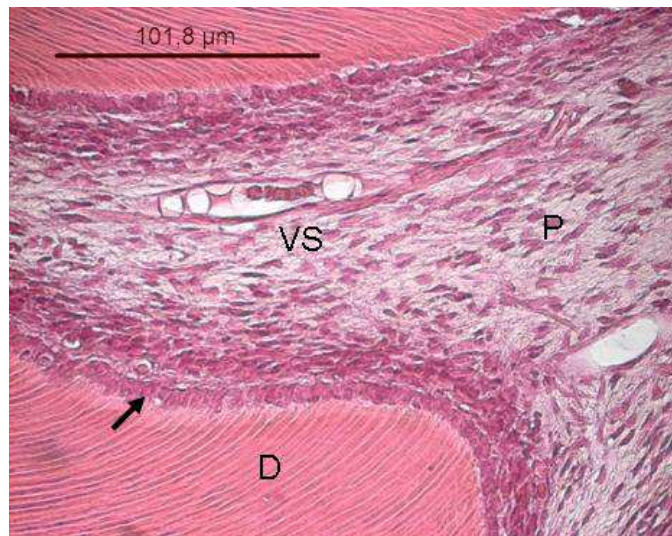


Figura 16. Melatonina 60 días. Pulpa sana (P) con presencia de vasos sanguíneos (VS), capa odontoblástica regular (flecha). Dentina tubular (D). H-E 20x.

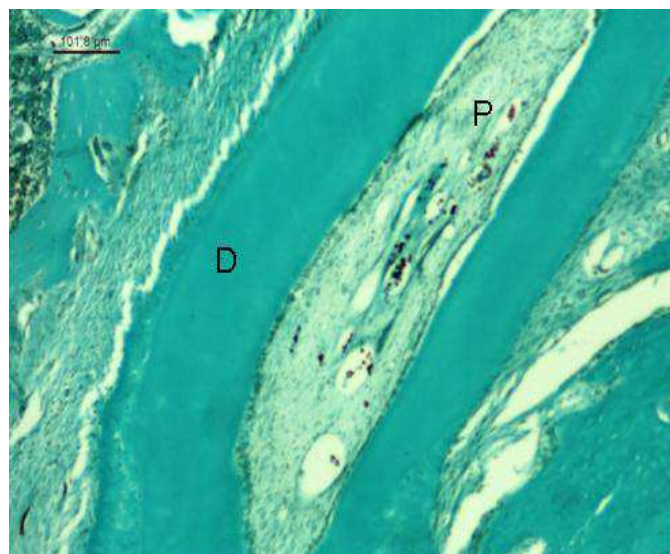


Figura 17. Melatonina 60 días. Pulpa sana (P). Masson 10x.

5.2.7 HA/ β -TCP/C

En este grupo experimental se evaluaron 16 dientes. 30 días después del tratamiento, el patrón más común era el de una pulpa con presencia de vasos sanguíneos, sin inflamación ni necrosis, y con una capa odontoblástica regular en el 56,25% de las muestras (Figura 18), estando ausente en el 43,75% restante. A lo largo del conducto radicular observamos fibrosis en el 75% y dentina reparativa solo en el 25% de las muestras (Figura 19).

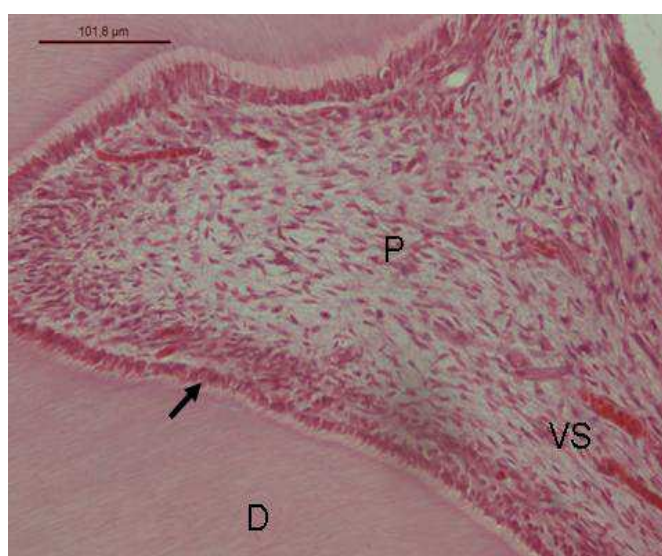


Figura 18. HA/ β -TCP/C. Pulpa sana (P) con capa odontoblástica regular (flecha) y presencia de vasos sanguíneos (VS). Dentina tubular (D). H-E 20x.

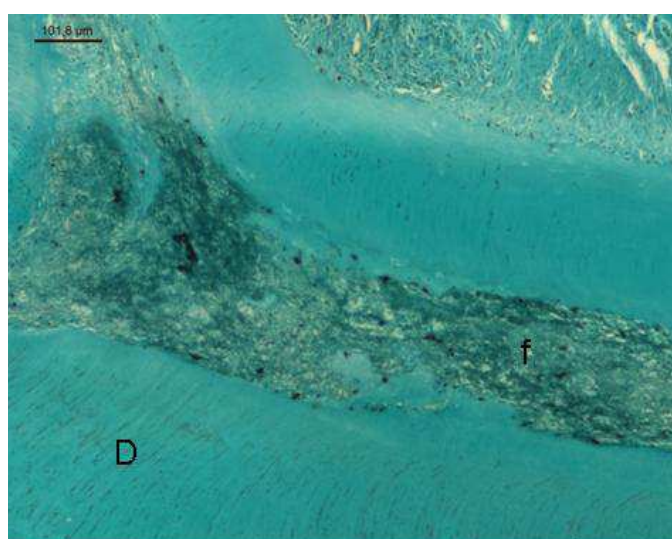


Figura 19. HA/ β -TCP/C. Fibrosis (f) y dentina reparativa a lo largo del conducto. Dentina tubular (D). Masson 10x.

5.3 RESULTADOS DE TBARS

En el análisis del estrés oxidativo, los resultados a nivel plasmático, renal y hepático se observan en las figuras 20, 21 y 22, respectivamente, y en la tabla 3. Los valores de concentración de proteínas se expresan en nmol/ml en las muestras de plasma y nmol/mg de proteína en el tejido renal y hepático.

No existen diferencias significativas entre los grupos: Plasma ($p=0.799$), riñón ($P=0.130$) e hígado ($p=0.724$).

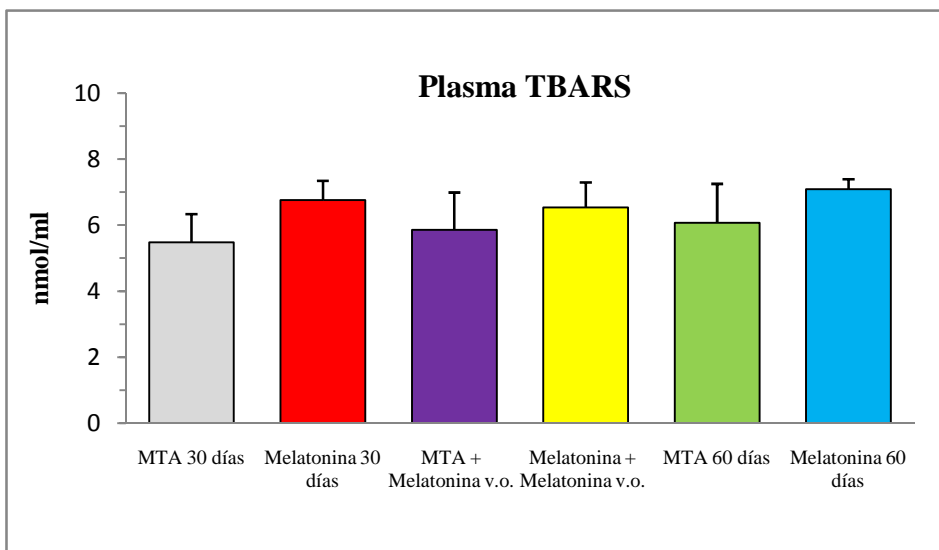


Figura 20. Resultados del análisis del estrés oxidativo a nivel plasmático. Valores de concentración de proteínas expresados en nmol/ml.

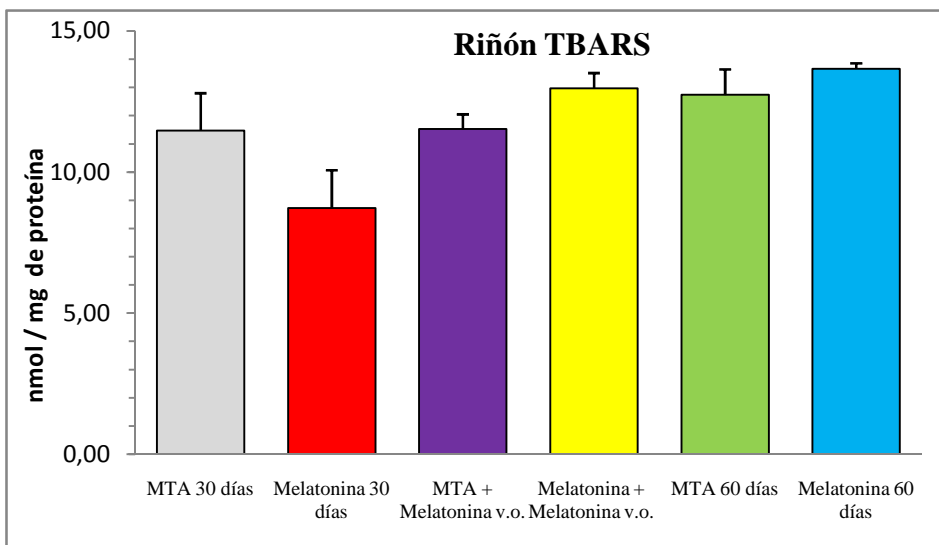


Figura 21. Resultados del análisis del estrés oxidativo a nivel renal. Valores de concentración de proteínas expresados en nmol/mg de proteína.

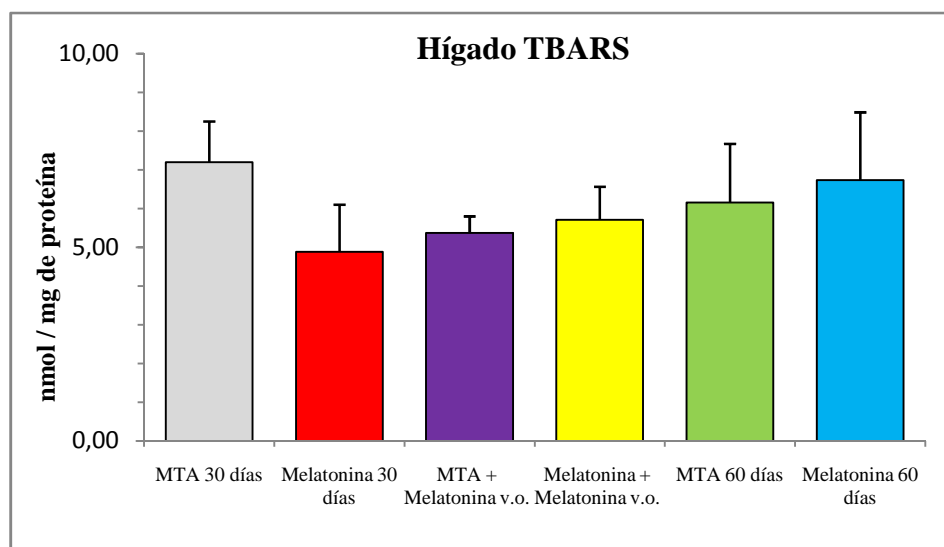


Figura 22. Resultados del análisis el estrés oxidativo a nivel hepático. Valores de concentración de proteínas expresados en nmol/mg de proteína.

	Plasma	Riñón	Hígado
MTA 30	5.48 ± 0.86	11.47 ± 1.33	7.19 ± 1.16
Melatonina 30	6.76 ± 0.58	8.72 ± 1.35	4.88 ± 1.22
MTA + Melatonina v.o.	5.86 ± 1.13	11.53 ± 0.52	5.37 ± 0.43
Melatonina + Melatonina v.o.	6.54 ± 0.76	12.96 ± 0.55	5.71 ± 0.85
MTA 60	6.07 ± 1.18	12.74 ± 0.90	6.16 ± 1.51
Melatonina 60	7.09 ± 0.31	13.66 ± 0.20	6.74 ± 1.75

Tabla 3. Resultados del análisis del estrés oxidativo. Los valores están expresados como media ± error estándar.

5.4 TABLAS DE CONTINGENCIA. CHI-CUADRADO DE PEARSON

Tabla de contingencia

		GRADO DE INFLAMACIÓN			Total
		0	1	2	
GRUPO 1	Recuento	16	0	0	16
	Frecuencia esperada	15,1	,3	,6	16,0
	Residuos corregidos	1,1	-,6	-,9	
2	Recuento	16	0	0	16
	Frecuencia esperada	15,1	,3	,6	16,0
	Residuos corregidos	1,1	-,6	-,9	
3	Recuento	15	0	0	15
	Frecuencia esperada	14,2	,3	,6	15,0
	Residuos corregidos	1,0	-,6	-,8	
4	Recuento	14	0	2	16
	Frecuencia esperada	15,1	,3	,6	16,0
	Residuos corregidos	-1,3	-,6	2,0	
5	Recuento	10	0	2	12
	Frecuencia esperada	11,3	,2	,4	12,0
	Residuos corregidos	-1,8	-,5	2,5	
6	Recuento	14	2	0	16
	Frecuencia esperada	15,1	,3	,6	16,0
	Residuos corregidos	-1,3	3,4	-,9	
7	Recuento	16	0	0	16
	Frecuencia esperada	15,1	,3	,6	16,0
	Residuos corregidos	1,1	-,6	-,9	
Total	Recuento	101	2	4	107
	Frecuencia esperada	101,0	2,0	4,0	107,0

Tabla 4. Tabla de contingencia para la variable grado de inflamación.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	23,506 ^a	12	,024
Razón de verosimilitudes	18,941	12	,090
Asociación lineal por lineal	,962	1	,327
N de casos válidos	107		

Tabla 5. Prueba chi-cuadrado para la variable grado de inflamación.

Tabla de contingencia

			VITALIDAD PULPAR		Total
			0	1	
GRUPO 1	Recuento	0	16	16	
	Frecuencia esperada	,6	15,4	16,0	
	Residuos corregidos	-,9	,9		
2	Recuento	0	16	16	
	Frecuencia esperada	,6	15,4	16,0	
	Residuos corregidos	-,9	,9		
3	Recuento	0	15	15	
	Frecuencia esperada	,6	14,4	15,0	
	Residuos corregidos	-,8	,8		
4	Recuento	2	14	16	
	Frecuencia esperada	,6	15,4	16,0	
	Residuos corregidos	2,0	-2,0		
5	Recuento	2	10	12	
	Frecuencia esperada	,4	11,6	12,0	
	Residuos corregidos	2,5	-2,5		
6	Recuento	0	16	16	
	Frecuencia esperada	,6	15,4	16,0	
	Residuos corregidos	-,9	,9		
7	Recuento	0	16	16	
	Frecuencia esperada	,6	15,4	16,0	
	Residuos corregidos	-,9	,9		
Total	Recuento	4	103	107	
	Frecuencia esperada	4,0	103,0	107,0	

Tabla 6. Tabla de contingencia para la variable grado de vitalidad pulpar.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,055 ^a	6	,061
Razón de verosimilitudes	11,271	6	,080
Asociación lineal por lineal	,277	1	,598
N de casos válidos	107		

Tabla 7. Prueba chi-cuadrado para grado de vitalidad pulpar.

Tabla de contingencia

			PUENTE DENTINARIO		Total
			0	1	
GRUPO 1	Recuento		2	14	16
	Frecuencia esperada		5,5	10,5	16,0
	Residuos corregidos		-2,0	2,0	
2	Recuento		4	12	16
	Frecuencia esperada		5,5	10,5	16,0
	Residuos corregidos		-,9	,9	
3	Recuento		3	12	15
	Frecuencia esperada		5,2	9,8	15,0
	Residuos corregidos		-1,3	1,3	
4	Recuento		8	8	16
	Frecuencia esperada		5,5	10,5	16,0
	Residuos corregidos		1,4	-1,4	
5	Recuento		2	10	12
	Frecuencia esperada		4,1	7,9	12,0
	Residuos corregidos		-1,4	1,4	
6	Recuento		6	10	16
	Frecuencia esperada		5,5	10,5	16,0
	Residuos corregidos		,3	-,3	
7	Recuento		12	4	16
	Frecuencia esperada		5,5	10,5	16,0
	Residuos corregidos		3,7	-3,7	
Total	Recuento		37	70	107
	Frecuencia esperada		37,0	70,0	107,0

Tabla 8. Tabla de contingencia para variable puente dentinario y dentina reparativa.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,506 ^a	6	,002
Razón de verosimilitudes	20,766	6	,002
Asociación lineal por lineal	11,455	1	,001
N de casos válidos	107		

Tabla 9. Pueba chi-cuadrado para la variable puente dentinario y dentina reparativa.

Tabla de contingencia

			CAPA ODONTOBLÁSTICA			Total
			0	1	2	
GRUPO 1	Recuento		0	16	0	16
	Frecuencia esperada		3,4	12,3	,3	16,0
	Residuos corregidos		-2,3	2,4	-,6	
2	Recuento		3	13	0	16
	Frecuencia esperada		3,4	12,3	,3	16,0
	Residuos corregidos		-,3	,5	-,6	
3	Recuento		0	13	2	15
	Frecuencia esperada		3,2	11,5	,3	15,0
	Residuos corregidos		-2,2	1,0	3,5	
4	Recuento		2	14	0	16
	Frecuencia esperada		3,4	12,3	,3	16,0
	Residuos corregidos		-,9	1,1	-,6	
5	Recuento		4	8	0	12
	Frecuencia esperada		2,6	9,2	,2	12,0
	Residuos corregidos		1,1	-,9	-,5	
6	Recuento		7	9	0	16
	Frecuencia esperada		3,4	12,3	,3	16,0
	Residuos corregidos		2,3	-2,1	-,6	
7	Recuento		7	9	0	16
	Frecuencia esperada		3,4	12,3	,3	16,0
	Residuos corregidos		2,3	-2,1	-,6	
Total	Recuento		23	82	2	107
	Frecuencia esperada		23,0	82,0	2,0	107,0

Tabla 10. Tabla de contingencia para la variable capa odontoblástica.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	31,262 ^a	12	,002
Razón de verosimilitudes	31,862	12	,001
Asociación lineal por lineal	14,518	1	,000
N de casos válidos	107		

Tabla 11. Prueba chi-cuadrado para la variable capa odontoblástica.

Tabla de contingencia

			FIBROSIS		Total
			0	1	
GRUPO 1	Recuento	0	16	16	
	Frecuencia esperada	2,2	13,8	16,0	
	Residuos corregidos	-1,8	1,8		
2	Recuento	3	13	16	
	Frecuencia esperada	2,2	13,8	16,0	
	Residuos corregidos	,6	-,6		
3	Recuento	0	15	15	
	Frecuencia esperada	2,1	12,9	15,0	
	Residuos corregidos	-1,7	1,7		
4	Recuento	2	14	16	
	Frecuencia esperada	2,2	13,8	16,0	
	Residuos corregidos	-,2	,2		
5	Recuento	2	10	12	
	Frecuencia esperada	1,7	10,3	12,0	
	Residuos corregidos	,3	-,3		
6	Recuento	4	12	16	
	Frecuencia esperada	2,2	13,8	16,0	
	Residuos corregidos	1,4	-1,4		
7	Recuento	4	12	16	
	Frecuencia esperada	2,2	13,8	16,0	
	Residuos corregidos	1,4	-1,4		
Total	Recuento	15	92	107	
	Frecuencia esperada	15,0	92,0	107,0	

Tabla 12. Tabla de contingencia para la variable grado de fibrosis.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,653 ^a	6	,194
Razón de verosimilitudes	12,433	6	,053
Asociación lineal por lineal	5,003	1	,025
N de casos válidos	107		

Tabla 13. Prueba chi-cuadrado para la variable grado de fibrosis.

6- DISCUSIÓN

6.1 DISCUSIÓN DEL MÉTODO

Los códigos de ética internacionales para la investigación biomédica consideran una obligación realizar ensayos con animales antes de efectuarlos en seres humanos. Según el Código de Núremberg (1947), cualquier experimento realizado en seres humanos debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal (Shuster y Cols., 1997). La Declaración de Helsinki considera que la investigación clínica en seres humanos debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales. El animal de experimentación constituye un buen modelo para evaluar el efecto de un producto químico, pues en él se examina el potencial tóxico, las vías de acceso, la excreción y el metabolismo (Rodríguez Yunta, 2012). Aunque no todas las conclusiones a las que se llega pueden ser extrapoladas a los humanos debido a las diferencias anatómicas, fisiológicas y metodológicas existentes entre las especies, los datos experimentales nos aportan una ayuda muy importante antes de iniciar la fase clínica (Cortés Lillo y Cols., 2001).

Se han utilizado numerosas especies en la investigación dental como hámster, ratas, conejos, cabras, perros, cerdos y monos. En la actualidad, la rata es uno de los animales de experimentación más utilizado. Su reducido tamaño y el bajo coste de cría, alimentación y alojamiento permiten realizar estudios a gran escala. La respuesta histológica de las ratas es inicialmente severa y continua, con inflamación crónica que persiste. El tiempo que hemos de esperar para observar el resultado del tratamiento es más corto que en otras especies, así a los 21 días ya es posible valorar un proceso inicialmente reparativo (formación de puente dentinario) o, por el contrario, una inflamación severa (Cortés Lillo y Cols., 2001).

Son varias las razas de ratas utilizadas, entre las que destacan: Sprague-Dawley, Wistar y Long-Evans. En nuestro estudio se utilizó la rata Sprague-

Dawley, que se caracteriza por ser albina, presentar una cabeza delgada y cola larga, tener un tamaño mediano, un crecimiento rápido, ser prolífica, dócil y fácil de manejar, y susceptible a las infecciones respiratorias. Las ratas son animales monofiodontos, es decir, que sólo poseen una dentición, carecen de dientes temporales. Cada hemiarcada consta de un incisivo y tres molares (Sáiz Moreno y Cols., 1983).

Por el pequeño tamaño de sus dientes, para realizar pulpotomías se usan solamente los molares. Además, debido a que los molares mandibulares quedan en la profundidad del suelo de la boca y su acceso es muy complicado, nos vemos limitados a trabajar únicamente en los molares maxilares.

El pequeño tamaño de la boca y los dientes dificultó la realización de una pulpotomía reglada y en su lugar realizamos una exposición pulpar. Por este motivo, los resultados de nuestro estudio no pueden ser extrapolados al hombre como resultados de materiales para pulpotomía, aunque sí reflejan la respuesta de la pulpa dental a los distintos materiales con los que hemos experimentado. Además se usaron dientes sanos, sin patología previa que indicase la necesidad de realizar la pulpotomía, es decir, sin inflamación ni infección. De todas formas, habría sido difícil inducir una pulpitis reversible en dientes de rata por la complejidad de realizar un diagnóstico correcto diferenciando una pulpitis reversible de una irreversible.

La imposibilidad de colocar un elemento de aislamiento, por el pequeño tamaño de la boca y los dientes, hace fácil la contaminación durante el procedimiento operatorio. Sin embargo, cuando observamos los cortes histológicos, no detectamos presencia de signos de infección en ninguno de los grupos. Solo aparece degeneración vacuolar en un molar del grupo de MTA 60 días en el que se desprendió la obturación de amalgama durante el periodo de acción del material, y probablemente hubo microfiltración.

En nuestro trabajo, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de clorhidrato de xilacina y clorhidrato de ketamina y Clorobutanol por vía intramuscular. Por razones éticas, al trabajar con animales se emplea

anestesia general, en cambio cuando se realizan tratamientos pulpares en niños lo más común es utilizar anestesia local con vasoconstrictor. Nosotros decidimos no utilizar anestesia local ya que el vasoconstrictor podría facilitar la hemostasia durante el tratamiento, y la general no produce ningún efecto en el control de la hemorragia.

El material de obturación elegido fue la amalgama de plata. A pesar de que la Norma ISO 7405 (2008) aconseja el uso de cemento de óxido de zinc eugenol o policarboxilato cubierto por una restauración con base de resina de composite o un cemento de ionómero de vidrio, decidimos colocar tras el óxido de zinc eugenol la amalgama para evitar filtraciones y contaminación salivar, ya que se necesita menos tiempo para realizar la obturación con este material.

En cuanto a la muestra, tenemos 7 grupos y en cada uno de ellos hay 16 dientes, un número superior al que recomienda la Norma ISO 7405 (2008) que es de 7, y similar al de otros trabajos que han empleado distintos materiales para la realización de pulpotomías como Menezes y Cols. (2004), que emplearon 4 grupos de 19 dientes cada uno, o Salako y Cols. (2003) que usaron 4 grupos de 20 dientes.

6.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los criterios que determinan el éxito del tratamiento de una pulpitis reversible en un diente temporal, mediante la preservación de la pulpa radicular, son la eliminación del dolor e inflamación y el mantenimiento del diente temporal en la arcada para que su ausencia no dé lugar a problemas de maloclusión en el niño (Simancas-Pallares y Cols., 2010). Según los resultados de nuestro estudio, tanto el MTA como la melatonina y la mezcla HA/ β -TCP/C, podrían dar buenos resultados como material para tratamiento pulpar directo.

En los tres grupos en los que se aplicó MTA directamente sobre la pulpa sana observamos, una pulpa vital estructurada sana (100%) con la presencia de una capa odontoblástica regular, existiendo una significativa asociación estadística con el grupo MTA 30 días (100%) y el grupo MTA + Melatonina v.o. (86,66%). En el grupo MTA 60 días no observamos esa significación estadística ya que la ausencia de la capa odontoblástica es del 33,33%. Los procesos adaptativos producidos por la agresión de la preparación cavitaria y el material usado como recubrimiento pulpar directo estimulan los procesos de reparación del diente que van evolucionando desde fibrosis (100%, 100%, 83,33%) hasta la formación de una dentina reparativa (87,5%, 80%, 83,33 %), como puede apreciarse en las imágenes (Figuras 6, 11 y 15).

En nuestro estudio entre el 83,33 y el 100% de pulpas de molares de rata tratadas con MTA no presentan inflamación. Esto puede ser debido a que hemos realizado el estudio histológico a los 30 y 60 días de haber practicado la injuria y el tratamiento sobre el complejo dentino-pulpar, y los procesos inflamatorios aparecen en los primeros momentos y van desapareciendo paulatinamente a medida que la pulpa sufre los cambios adaptativos. La desaparición de los fenómenos inflamatorios ha sido observada por otros autores, en protecciones pulpares directas, tras dos meses de tratamiento, y también en perforaciones de furca tratadas con MTA (Yildirim y Cols., 2005).

En nuestro trabajo del 75% al 87,5% de los molares de rata en los que se utilizó melatonina como protector pulpar directo mostraron fibrosis y del 50% al 75% la creación de un puente dentinario, una pulpa vital estructurada sana del 87,5% al 100% y, la presencia de una capa odontoblástica regular (56,25% - 87,5%). Nosotros hemos querido comprobar si la melatonina podría tener acciones de estimulante pulpar similares a las que presenta en el hueso. Se sabe que una gran variedad de estructuras dentales en humanos y ratones expresan el receptor M1a de la melatonina durante el desarrollo del diente. Kumakasa y Cols. (2010) sugieren que el receptor de melatonina M1 se expresa en los ameloblastos,

en las células secretoras del estrato intermedio y el retículo estrellado, en las células del epitelio dental externo, en los odontoblastos y en las células del saco dental. De esta forma, la melatonina podría regular la proliferación, diferenciación y función de las células odontogénicas, así como armonizar el crecimiento del diente junto con el crecimiento del hueso mandibular que lo rodea. Así mismo el receptor M1a, el más potente receptor transmembrana para la melatonina es el responsable de la formación de hueso estimulada por la melatonina.

La melatonina provoca efectos estimulantes sobre la diferenciación y actividad de los osteoblastos. En cultivos de osteoblastos humanos promueve la expresión de colágeno tipo I, estimula la producción y la actividad de la fosfatasa alcalina, osteopontina, sialoproteína del hueso y osteocalcina y estimula la formación de matriz mineralizada (Sánchez-Barceló y Cols., 2010). Además, la melatonina estimula la diferenciación osteoblástica a través de las BMP-2 y 4 y factores de crecimiento y reduce el periodo de diferenciación de osteoblastos desde 21 a 12 días. Todas estas acciones las realiza a través de receptores de membrana (Cutando y Cols., 2007).

Efectos similares a los descritos anteriormente están involucrados en la estimulación de la dentinogénesis reparativa promovida por el MTA (Bai y Cols., 2010) y podrían ser los responsables del efecto que nosotros hemos observado de la melatonina cuando la hemos utilizado como material para protección pulpar directa. La melatonina podría actuar, como otros factores locales y hormonas sistémicas, de forma similar en hueso y diente, ya que tanto la dentinogénesis como la osteogénesis son similares en muchos aspectos. Por tanto, no resulta sorprendente que los odontoblastos y los osteoblastos compartan muchas características. Estas células producen una matriz compuesta de fibras colágenas y proteoglicanos, capaz de mineralizarse. Además, las características ultraestructurales de ambos también son similares y tienen un retículo endoplasmático rugoso (RER) altamente ordenado, un aparato de Golgi destacado, gránulos secretores y numerosas mitocondrias. Además, estas células son ricas en ARN, y sus

núcleos contienen uno o varios nucleolos prominentes. Estas características corresponden a células secretoras de proteínas (Cohen y Burns, 2004).

Los molares que fueron tratados con melatonina mostraron un nivel de inflamación que está ausente entre el 87,5 y 100%. Reiter y Cols. (2000) afirman que la melatonina es un potente agente antiinflamatorio en numerosos modelos experimentales ya que, directamente, neutraliza una gran variedad de especies reactivas de oxígeno incluyendo el radical hidroxilo (-OH), el radical peróxido de los lípidos (ROO-), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻). Asimismo, regula la producción de óxido nítrico (NO-) por su interacción con las enzimas que lo sintetizan e, indirectamente da lugar a la reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, que contribuyen a la inflamación y al daño celular (Reiter y Cols., 2000; Cutando y Cols., 2007).

Además, se ha asociado la melatonina con un potente efecto antioxidante y una reducción del estrés oxidativo (Czesnikiewicz-Guzik y Cols., 2007). Así, en nuestro estudio evaluamos si la administración de melatonina por vía oral tendría efecto sobre la reparación de la pulpa dental. Nuestros resultados demuestran que en los grupos a los que se administró melatonina en el agua de bebida no se produce ningún efecto beneficioso añadido al efecto pulpar del material utilizado (MTA o melatonina): El grupo MTA 30 días presenta una significativa asociación estadística con la presencia de puente dentinario y capa odontoblástica regular y el grupo Melatonina 30 días presenta una significativa asociación estadística con la presencia de capa odontoblástica, regular o irregular; al añadir melatonina en el agua de bebida estas fuertes relaciones desaparecen. Si bien la acción local de la melatonina sobre la pulpa dental tiene un efecto similar al del MTA que nos hace pensar en un posible fármaco para realizar pulpotomías, la administración sistémica de la misma no añade ningún efecto beneficioso. De hecho, los valores de estrés oxidativo (medidos como TBARS a nivel hepático, renal y de plasma) son similares en animales con melatonina en el agua de bebida, y aquellos que no bebieron melatonina durante los 30 días del experimento. Esta observación ya la han realizado otros investigadores

quienes han detectado que la administración exógena de antioxidantes como vitamina E (Alcaraz y Cols., 2006) o melatonina (Pekárková y Cols., 2001; Tahan y Cols., 2004; Dakshayani y Cols., 2005) en animales sanos no reduce los niveles de estrés oxidativo. Sugiriendo que los antioxidantes pueden ejercer efectos protectores sobre los órganos diana sin afectar el estrés oxidativo sistémico. Los antioxidantes externos como la vitamina E y la melatonina se acumularían en los tejidos y lo que hacen es evitar que la balanza se incline a favor del estrés oxidativo.

Es posible que los mecanismos de formación de matriz mineralizada en hueso de la melatonina, sean extrapolables al diente. Podemos, de este modo, considerar la melatonina como un potencial material para pulpotomía, siendo otra de sus ventajas poseer un menor coste que el MTA. No obstante, serían necesarios más estudios *in vivo* y a largo plazo para apoyar nuestros resultados.

Respecto al otro material de estudio, el HA/ β -TCP/C, también hemos querido comprobar si la mezcla de estas biocerámicas y el colágeno podría también tener efecto de estimulante pulpar similar al que presenta en el hueso. En nuestro estudio el 75% de los molares de rata en los que se utilizó HA/ β -TCP/C como protector pulpar directo mostraron fibrosis y un 25% la creación de un puente dentinario, una pulpa vital estructurada sana 100% y la presencia de una capa odontoblástica regular 56,25%.

Algunos estudios demuestran que las biocerámicas β -TCP y HA provocan efectos estimulantes sobre la diferenciación y actividad de los osteoblastos. En cultivos de osteoblastos humanos promueve la expresión de colágeno tipo I, estimulan la producción y actividad de la fosfatasa alcalina, la osteopontina, la sialoproteína del hueso, la osteocalcina y estimula la formación de matriz mineralizada (Podaropoulos y Cols., 2009; Kannan y Cols., 2010; Polini y Cols., 2011; Comeau y Cols., 2012; Fei y Cols., 2012; Miyamoto y Cols., 2013; Reddy y cols, 2013), al igual que sucede con el MTA y la melatonina.

Se sabe que algunas moléculas, como el factor 1 (Cbfa 1), están directamente implicadas en la diferenciación de los osteoblastos. Se trata de un factor de transcripción que es necesario para la activación de este proceso y regula los genes responsables de la síntesis de proteínas específicas de hueso (Franceschi y Cols., 2003; Afzal y Cols., 2004).

El β -TCP ha sido usado en ortopedia, cirugía oral y maxilofacial, así como en tratamiento periodontal de defectos óseos (Döri y Cols., 2005). En nuestro estudio, hemos utilizado el β -TCP como material pulpar debido a su alta biocompatibilidad y capacidad para la regeneración de tejido duro. Los resultados de este estudio confirman la biocompatibilidad del β -TCP, donde no observamos signos de respuesta inflamatoria en el 100% de los casos. Además, cuando se utiliza la mezcla HA/ β -TCP como soporte para formación de hueso, ésta mantiene el espacio de regeneración, es una guía para el nuevo tejido óseo, biocompatible, tiene un adecuado diseño estructural y un adecuado tiempo de degradación (Ghanaati y Cols., 2012).

En relación a la formación de puente dentinario, se obtuvo mejor resultado en el grupo de MTA (87,5%) que en el grupo HA/ β -TCP/C (25 %). Esto coincide con otros estudios, donde la formación de tejido duro se debe a la liberación de iones calcio después de la biodegradación del material en contacto con fluidos titulares (Suárez-González y Cols., 2012). En el caso del HA/ β -TCP/C no se produce liberación de iones calcio.

El efecto de la melatonina y del HA/ β -TCP/C está bien estudiado en hueso y no tanto en diente. La dentina comparte muchas características con el hueso y los odontoblastos de la pulpa expresan la mayor parte de los genes marcadores de los osteoblastos (sialoproteína del hueso, osteopontina, osteocalcina), sin embargo, los niveles de expresión de estos genes son diferentes. Así, aunque los odontoblastos y los osteoblastos muestran casi idéntico perfil genético, existe una clara diferencia entre el proceso de odontogénesis y el de osteogénesis. En primer lugar, los pre-odontoblastos requieren señales de las células epiteliales durante su diferenciación en odontoblastos. En segundo lugar, los odontoblastos necesitan alinearse en la superficie de la matriz o tener dentina preexistente para la formación de

nueva dentina, mientras que los osteoblastos no muestran ninguna polaridad y producen la matriz de hueso a su alrededor. Eventualmente, los osteocitos se embeben y quedan incrustados en la matriz ósea (Tonomura y Cols., 2010).

Es bien conocido que las células derivadas de la pulpa contienen células madres pluripotenciales que pueden diferenciarse en osteoblastos o en odontoblastos. Durante el desarrollo de los dientes, la diferenciación odontogénica requiere células dentales epiteliales e interacciones epitelio-mesenquimales para iniciar la formación de la dentina en la interfase. Aunque la regeneración del hueso se puede lograr mediante ingeniería de tejidos convencionales utilizando andamios con varias células mesenquimales del estroma, el método para inducir selectivamente la regeneración de la dentina no se conoce bien (Tonomura y Cols., 2010).

En cuanto al tamaño de partícula de los biomateriales, algunos estudios demuestran que son más eficaces los de partícula grande. Ghanaati y Cols. (2012) usaron un tamaño de partícula de 100-350 μm en su estudio para conocer la respuesta tisular a las biocerámicas HA y β -TCP. Higashi y Okamoto (1996) compararon la HA y el β -TCP como recubrimiento pulpar, tanto con partículas de 40 μm como de 300 μm y corroboraron que las partículas de mayor tamaño dan lugar a un nuevo y abundante tejido duro, mientras que con las partículas pequeñas la formación de barrillo dentinario fue más pobre y se encontraron infiltraciones de células inflamatorias o formación de absceso, demostrando de este modo que el tamaño de la partícula de estos materiales es un factor importante a tener en cuenta en la formación de dentina reparativa.

Tonomura y Cols. (2010) en su estudio sobre la regeneración de la dentina usaron una porosidad del 60% y un tamaño de poro de 300 μm para regenerar la dentina, que es considerado como un tamaño adecuado y es similar a la utilizada para la formación de hueso. El tamaño de poro del biomaterial se conoce como un factor crítico que afecta a la nutrición, la adhesión celular, la migración, y el crecimiento tisular. Se sabe que un tamaño de poro de al menos 50 μm se recomienda y el tamaño de poro

óptimo de la HA y β -TCP para la formación ósea es de 300-400 y 200-400 μm , respectivamente.

Un estudio similar al nuestro avala nuestros resultados. En éste, Higashi y Okamoto (1996), postularon que, puesto que la HA y el β -TCP han sido usado como materiales de regeneración de defectos óseos periodontales, podrían usarse también como material de recubrimiento pulpar, en la formación de una barrera de tejido duro tras la amputación de la pulpa, dando buenos resultados. A los treinta días después de realizar la pulpotomía, la porción más coronal de la pulpa contenía partículas de los materiales usados y más de la mitad de los dientes habían formado tejido duro cuyas características eran las de la dentina o parecidas a osteodentina. Las muestras restantes mostraron una inflamación moderada.

De este modo, aunque con algunas diferencias, los efectos involucrados en la formación de hueso, podrían ser similares a los implicados en la estimulación de la dentinogénesis reparativa promovidas por el MTA (Bai y Cols., 2010) y además podrían ser equivalentes a los descritos para HA/ β -TCP cuando lo usamos como material para pulpotomías. Así, HA/ β -TCP podría actuar como otros factores locales y hormonas sistémicas, de forma similar en hueso y diente.

En nuestro estudio el material que produce mayor puente dentinario es el MTA, con diferencia de los otros dos. El peor es el HA/ β -TCP/C. Este producto no es osteoinductor es osteoconductor (en nuestro caso sería dentinoconductor), es probable que necesite más tiempo para que se produzca la sustitución del mismo por dentina reparativa, pero previamente se deben formar y trasladar hasta él células formadoras de dentina (odontoblastos u odontoblastos-like). El MTA y la melatonina son osteoinductores (en nuestro caso dentinoinductores, es decir son capaces de estimular la producción de dentina por odontoblastos ya existentes o promover la diferenciación de células indiferenciadas de la pulpa) por lo que el proceso de formación de dentina sería más rápido.

7- CONCLUSIONES

1. En general, los efectos sobre pulpa dental de la melatonina y HA/ β -TCP/C usados como materiales de recubrimiento pulpar, son similares a los del MTA cuando valoramos el grado de inflamación, la vitalidad pulpar y la presencia de fibrosis pulpar.
2. El MTA a los 30 días es el material que muestra la mayor presencia de capa odontoblástica regular y la mayor frecuencia de formación de puente dentinario.
3. La melatonina usada como material de recubrimiento pulpar condiciona a los 60 días la presencia de pulpas con ausencia de capa odontoblástica.
4. El uso de HA/ β -TCP/C como material de recubrimiento pulpar produce reparaciones pulpares con ausencia de capa odontoblástica y de puente dentinario.
5. El consumo de melatonina por vía oral no añade ningún efecto histológico al producido por el MTA y la melatonina aplicados directamente sobre la pulpa dental.
6. El nivel de estrés oxidativo en plasma, riñón e hígado no se modifican en ninguno de los grupos por el consumo de melatonina en el agua de bebida.

8- BIBLIOGRAFÍA

1. Abd El-Fattah H, Helmy Y, El-Kholy B, Marie M. In vivo animal histomorphometric study for evaluating biocompatibility and osteointegration of nano-hydroxyapatite as biomaterials in tissue engineering. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2010;22(4):241-50.
2. Aeinehchi M, Dadvand S, Fayazi S, Bayat-Movahed S. Randomized controlled trial of mineral trioxide aggregate and formocresol for pulpotomy in primary molar teeth. *Int Endod J.* 2007;40:261-7.
3. Afzal F, Polak J, BATTERY L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J Pathol.* 2004;202(4):503-10.
4. Alcaraz A, Iyú D, Atucha NM, García-Estañ J, Ortiz MC. Vitamin E supplementation reverses renal altered vascular reactivity in chronic bile duct-ligated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;292:1486-93.
5. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Ghoddusi J, Eskandarizadeh A. SEM evaluation of neodentinal bridging after direct pulp protection with mineral trioxide aggregate. *Aust Endod J.* 2006;32:26-30.
6. Asgary S, Eghbal MJ. The effect of pulpotomy using a calcium-enriched mixture cement versus one-visit root canal therapy on postoperative pain relief in irreversible pulpitis: a randomized clinical trial. *Odontology.* 2010;98(2):126-33.
7. Asgary S, Eghbal MJ. A clinical trial of pulpotomy vs root canal therapy of mature molars. *J Dent Res.* 2010;89(10):1080-5.

8. Asgary S, Moosavi SH, Yadegari Z, Shahriari S. Cytotoxic effect of MTA and CEM cement in human gingival fibroblast cells. Scanning electronic microscope evaluation. *N Y State Dent J*. 2012;78(2):51-4.
9. Aydin S. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*. 2009;37(1):279.
10. Bahetwar SK, Pandey RK, Singh RK, Bahetwar TS, Wahid A. A biochemical and histopathological evaluation of generalized pulp calcification in young permanent teeth. *Indian J Dent Res*. 2012;23(1):123.
11. Bahrololoomi Z, Moeintaghavi A, Emtiazi M, Hosseini G. Clinical and radiographic comparison of primary molars after formocresol and electrosurgical pulpotomy: a randomized clinical trial. *Indian J Dent Res*. 2008;19(3):219-23.
12. Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Kokubu E, Wang X, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. *Cell Tissue Res*. 2010;342:221-31.
13. Balic A, Aguila HL, Mina M. Identification of cells at early and late stages of polarization during odontoblast differentiation using pOBCol3.6GFP and pOBCol2.3GFP transgenic mice. *Bone*. 2010;47:948–58.
14. Barekattain B, Hasheminia SM, Shadmehr E, Attary Z. The effect of calcium hydroxide placement on pH and calcium concentration in periapical environment: An in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2012;23(2):226-9.

15. Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H, Bidad S. Comparative SEM study of the marginal adaptation of White and Grey MTA and Portland cement. *Aust Endod J.* 2007;33(1):2-6.
16. Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A. Odontopediatría. Barcelona: Ed Masson. 2004;173-180.
17. Bordoni N, Escobar-Rojas A, Castillo-Mercado R. Odontología Pediátrica: la salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual. 1ªEd. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2010;496-7.
18. Bryson EC, Levin L, Banchs F, Abbott PV, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste[®] on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol.* 2002;28(6):316-21.
19. Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz R, Guardia J, y Cols. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits. *J Pineal Res.* 2010;49:356-63.
20. Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Maté-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus A. Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(6):667-75.
21. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2005;38(11):834-42.
22. Camilleri J, Pitt TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J.* 2006;39:747-54.

23. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008;11(4):141-3.
24. Cannon M, Wagner C, Thobaben JZ, Jurado R, Solt D. Early response of mechanically exposed dental pulps of swine to antibacterial-hemostatic agents or diode laser irradiation. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;35(3):271-6.
25. Cárdenas-Jaramillo D. *Odontología Pediátrica*. 3ªEd. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas. 2003;231-3.
26. Cardinalli DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res*. 2003;34:81-7.
27. Cardoso-Silva C, Barbería E, Maroto M, García-Godoy F. Clinical study of Mineral Trioxide Aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA--a long term follow-up (84 months). *J Dent*. 2011;39(2):187-93.
28. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011;99(1):1-7.
29. Casas MJ, Kenny DJ, Johnston DH, Judd PL, Layug MA. Outcomes of vital primary incisor ferric sulphate pulpotomy and root canal therapy. *J Can Dent Assoc*. 2004;70(1):34-8.
30. Casas MJ, Denny DJ, Judd PL, Johnston DH. Do we still need formocresol in pediatric dentistry? *J Can Dent Assoc*. 2005;71(10):749-51.
31. Chan C, Yuan-Soon H, Wang YJ, Lan WH, Chen LI, Chen YJ, y Cols. Inhibition of cyclooxygenase activity, platelet aggregation and

tromboxane B2 production by two environmental toxicants: m- and o-cresol. *Toxicology*. 2005;208(1):95-104.

32. Cohen S, Burns RC. Vías de la pulpa. 8ª Ed. Madrid: Editorial Elsevier España. 2004;404-47.

33. Comeau PA, Frei H, Yang C, Fernlund G, Rossi FM. In vivo evaluation of calcium polyphosphate for bone regeneration. *J Biomater Appl*. 2012;27(3):267-75.

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

35. Cortés Lillo O, Boj Quesada JR, Canalda Sali C, García Ballesta C. Metodología para estudios histológicos pulpaes en ratas. *Endodoncia*. 2001;19(1)31-9.

36. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol*. 2007;78:1094-102.

37. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, y Cols. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res*. 2008;45:174-9.

38. Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58 Suppl 3:5-19.

39. Dakshayani KB, Subramanian P, Manivasagam T, Essa MM, Manoharan S. Melatonin modulates the oxidant– antioxidant imbalance

during N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2005;8:316-21.

40. 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;36(3):263-8.

41. da Silva LA, de Paula e Silva FW, Leonardo MR, Assed S. Radiographic evaluation of pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J Dent Child (Chic).* 2008;75(1):14-9.

42. De-Deus G, Petruccelli V, Gurgel-Filho E, Coutinho-Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J.* 2006;39(4):293-8.

43. de Menezes JV, Takamori ER, Bijella MF, Granjeiro JM. In vitro toxicity of MTA compared with other primary teeth pulpotomy agents. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;33(3):217-21.

44. Döri F, Arweiler N, Gera I, Sculean A. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with either a natural bone mineral or beta-tricalcium phosphate. *J Periodontol.* 2005;76(12):2236-43.

45. Eidelman E, Holan G, Fuks AB. Mineral Trioxide Aggregate vs formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. *Pediatr Dent.* 2001;23(1):15-18.

46. El-Meligy O, Abdalla M, El-Baraway S, El-Tekya M, Dean JA. Histological evaluation of electrosurgery and formocresol pulpotomy techniques in primary teeth in dogs. *J Clin Pediatr Dent.* 2001;26(1):81-5.

47. Faraco IM Jr , Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol.* 2001;17(4):163-6.
48. Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2004;15(2):104-8.
49. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica.* 2004;45(1):21-43.
50. Farrokh Gisoure E. Comparison of three pulpotomy agents in primary molars: a randomised clinical trial. *Iran Endod J.* 2011;6(1):11-4.
51. Fei L, Wang C, Xue Y, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenic differentiation of osteoblasts induced by calcium silicate and calcium silicate/ β -tricalcium phosphate composite bioceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100(5):1237-44.
52. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology.* 2010;98:2-14.
53. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:109-16.
54. Frozoni M, Balic A, Sagomonyants K, Zaia AA, Line SR, Mina M. A feasibility study for the analysis of reparative dentinogenesis in pOBCol3.6GFPTpz transgenic mice. *Int Endod J.* 2012;45(10):907-14.

55. Fu S, Ni P, Wang B, Chu B, Zheng L, Luo F, y Cols. Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite forguided bone regeneration. *Biomaterials*. 2012;33(19):4801-9.
56. Fuks AB, Jones PC, Michaeli Y, Bimstein E. Pulp response to collagen and glutaraldehyde in pulpotomized primary teeth of baboons. *Pediatr Dent*. 1991;13:142-50.
57. Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Pediatr Dent*. 2008;30(3):211-9.
58. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behaviour. *Dent Mater*. 2011;27(7):134-57.
59. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J*. 2012;45(6):571-9.
60. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, y Cols. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater*. 2012;7(1):015005.
61. Godhi B, Sood PB, Sharma A. Effects of mineral trioxide aggregate and formocresol on vital pulp after pulpotomy of primary molars: An in vivo study. *Contemp Clin Dent*. 2011;2(4):296-301.

62. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, y Cols. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res.* 2008;36(1):163-70.
63. Gómez-de-Ferraris ME, Campos-Muñoz A. Complejo dentino-pulpar I: pulpa dental. En: Gómez-de-Ferraris ME, Campos-Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería tisular Bucodental.* 3th ed. Madrid: Médica Panamericana. 2009;241-2.
64. González Rodríguez E, Ruiz Linares M. Diagnóstico y tratamiento pulpar en dentición temporal. En: Boj JR, Catalá M, García C, Mendoza A. *Odontopediatría.* Barcelona: Ed. Masson. 2004;173-84.
65. Guidelines American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr Dent.* 2005-2006;27:133-4.
66. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part I. Intracanal drugs and substance. *Int Endod J.* 2003;36(2):75-85.
67. Higashi T, Okamoto H. Influence of particle size of calcium phosphate ceramics as a capping agent on the formation of a hard tissue barrier in amputated dental pulp. *J Endod.* 1996;22(6):281-3.
68. Hill SD, Berry CW, Seale NS, Kaga M. Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(1):89-95.
69. Holland R, De Souza V, Murata SS; Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, y Cols. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001;12(2):109-13.

70. Horsted P, El Attar K, Langeland K. Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;52:531-53.
71. Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;1(3):788-800.
72. Huth KC, Hajek-Al-Khatat N, Wolf P, Ilie N, Hickel R, Paschos E. Long-term effectiveness of four pulpotomy techniques: 3-year randomised controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2012;16(4):1243-50.
73. IARC. Formaldehyde, 2 Butoxyethanol and 1 tert butoxy 2 propanol. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2004;88:2-9.
74. Igarashi R, Sahara T, Shimizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electro Microsc.* 2003;52(2):227-36.
75. Ike M, Urist MR. Recycled dentin root matrix for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein. *J Oral Implantol.* 1998;24(3):124-32.
76. Ioannidis K, Mistakidis I, Beltes P, Karagiannis V. Spectrophotometric analysis of coronal discolouration induced by grey and white MTA. *Int Endod J.* 2013;46(2):137-44.
77. Ingle J, Bakland LK, Baumgartner JC. Ingle's endodontic 6. 6^a Ed. USA: Editorial BC Decker Inc. 2008:118-50.

78. Jaramillo A, Fernández R, Villa P. Endodontic treatment of dens invaginatus: A 5-year follow-up. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(1):15-21.
79. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, y Cols. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(1):e85311.
80. Kaida H, Hamachi T, Anan H, Maeda K. Wound healing process of injured pulp tissues with emdogain gel. *J Endod.* 2008;34(1):26-30.
81. Kannan S, Vieira SI, Olhero SM, Torres PM, Pina S, da Cruz e Silva OA, y Cols. Synthesis, mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate mixtures. *ActaBiomater.* 2011;7(4):1835-43.
82. Karabucak B, Li D, Lim J, Iqbal M. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. *Dental Traumatol.* 2005;21(4):240-3.
83. Kiatwateeratana T, Kintarak S, Piwat S, Chankanka O, Kamaolmatyakul S, Thearmontree A. Partial pulpotomy on caries-free teeth using enamel matrix derivative or calcium hydroxide: a randomized controlled trial. *Int Endod J.* 2009;42(7):584-92.
84. Kim J, McBride S, Tellis B, Alvarez-Urena P, Song YH, Dean DD, y Cols. Rapid-prototyped PLGA/ β -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model. *Biofabrication.* 2012;4(2):025003.
85. King SR, McWhorter AG, Seale NS. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. *Pediatr Dent.* 2002;24(2):157-9.

86. Kline LW, Yu DC. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod.* 2009;35(6):866-9.
87. Kotlow L. Lasers and pediatric dental care. *Gen Dent.* 2008;56(7):618-27.
88. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, y Cols. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):243-9.
89. Kumakasa S, Shimosuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, y Cols. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem Cell Biol.* 2010;133:577-84.
90. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45(5):439-48.
91. Leienhecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, y Cols. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod.* 2012;38(6):829-33.
92. Lewis B. The obsolescence of formocresol. *J Calif Dent Assoc.* 2010;38(2):102-7.
93. Lewis B. Formocresol should be abandoned. *Dent Today.* 2010;29(5):10-14.

94. Liu H, Zhou Q, Qin M. Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide for pulpotomy in primary molars. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):121-5.
95. Martínez-Díaz F, Ortuño Pacheco G. Inflamación. En: Ortuño-Pacheco G, Martínez-Díaz FJ, Pastor-Quirante FA, Blasco-Muñoz PD. Lecciones de Anatomía Patológica General para estudiantes de Medicina y Odontología. 2ª Ed. Murcia: Diego Marín. 2005;119-46.
96. Martínez-Díaz F, Ortuño-Pacheco G, Pastor-Quirante F. Lesiones celulares elementales y muerte celular. En: Ortuño-Pacheco G, Martínez-Díaz FJ, Pastor-Quirante FA, Blasco-Muñoz PD. Lecciones de Anatomía Patológica General para estudiantes de Medicina y Odontología. 2ª Ed. Murcia: Diego Marín. 2005;25-36.
97. Martínez-Díaz F. Reparación e inmunidad. En: Ortuño-Pacheco G, Martínez-Díaz FJ, Pastor-Quirante FA, Blasco-Muñoz PD. Lecciones de Anatomía Patológica General para estudiantes de Medicina y Odontología. 2ª Ed. Murcia: Diego Marín. 2005;147-65.
98. Masuda-Murakami Y, Kobasashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, y Cols. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem.* 2010;112:452-8.
99. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and White Portland cements as wound dressing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004,9(3):376-9.

100. Miyamoto S, Shinmyozu K, Miyamoto I, Takeshita K, Terada T, Takahashi T. Histomorphometric and immunohistochemical analysis of human maxillary sinus-floor augmentation using porous β -tricalcium phosphate for dental implant treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24Suppl A100:134-8.
101. Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2009;59(1):35-46.
102. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(2):226-35.
103. Naik S, Hedge AM. Mineral trioxide aggregate as a pulpotomy agent in primary molar. An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2005;23(1):13-6.
104. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* 1999;27:106-10.
105. Nakamura Y, Hammarstrom L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentin by enamel proteins. *Int Endod J.* 2002;35(5):407-17.
106. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):435-40.
107. Nakashima M, Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):313-9.

108. Noetzel J, Ozer K, Reissbauer BH, Anil A, Rossier R, Neumann K, y Cols. Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Investig*. 2006;10(1):77-83.
109. Norma ISO 7405. Evaluación precínica de la biocompatibilidad de los productos sanitarios usados en odontología. Métodos de ensayo para materiales dentales. 2008.
110. Nosrat A, Asgary S. Apexogenesis treatment with a new endodontic cement: a case report. *J Endod*. 2010;36(5):912-4.
111. Nosrat A, Asgary S. Apexogenesis of a symptomatic molar with calcium enriched mixture. *Int Endod J*. 2010;43(10):940-4.
112. Omar OM, Khattab NM, Khater DS. Nigella sativa oil as a pulp medicament for pulpotomized teeth: a histopathological evaluation. *J Clin Pediatr Dent*. 2012;36(4):335-41.
113. Ortiz MC, Manriquez MC, Nath KA, Lager DJ, Romero JC, Juncos LA. Vitamin E prevents renal dysfunction induced by experimental chronic bile duct ligation. *Kidney Int*. 2003;64:950-61.
114. Ozório JE, Carvalho LF, de Oliveira DA, de Sousa-Neto MD, Perez DE. Standardized propolis extract and calcium hydroxide as pulpotomy agents in primary pig teeth. *J Dent Child (Chic)*. 2012;79(2):53-8.
115. Oztas N, Ulusu T, Oygyr T, Cokpekin F. Comparison of electrosurgery and formocresol as pulpotomy techniques in dog primary teeth. *J Clin Pediatr Dent*. 1994;18(4):285-89.
116. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod*. 2011;37:1691-5.

117. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A, y Cols. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol.* 2005;21(3):150-4.
118. Pek YS, Gao S, Arshad MS, Leck KJ, Ying JY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29(32):4300-5.
119. Pekárková I, Parara S, Holeček V, Stopka P, Trefil L, Racek J, y Cols. Does Exogenous Melatonin Influence the Free Radicals Metabolism and Pain Sensation in Rat? *Physiol Res.* 2001;50:595-602.
120. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Backland LK, Kariyawasam SP. Using Mineral Trioxide Aggregate as a pulp capping material. *J Am Dent Assoc.* 1996;127(10):1491-4.
121. Podaropoulos L, Veis AA, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *J Oral Implantol.* 2009;35(1):28-36.
122. Polini A, Pisignano D, Parodi M, Quarto R, Scaglione S. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One.* 2011;6(10):e26211.
123. Prakash C, Chandra S, Jaiswal JN. Formocresol and glutaraldehyde pulpotomies in primary teeth. *J Pedod.* 1989;13(4):314-23.
124. Rajaratnam SM, Middleton B, Stone BM, Arendt J, Dijk DJ. Melatonin advances the circadian timing of EEG sleep and directly facilitates sleep without altering its duration in extended sleep opportunities in humans. *J Physiol.* 2004;561:339-51.

125. Ranly DM, García Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent*. 2000;28(3):153-61.
126. Reddy S, Wasnik S, Guha A, Kumar JM, Sinha A, Singh S. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: in vitro and preliminary in vivo studies. *J Biomater Appl*. 2013;27(5):565-75.
127. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:376-86.
128. Ribeiro DA, Matsumoto DA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Ex vivo biocompatibility tests of regular and white forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod*. 2006;39(1):26-30.
129. Rivera N, Reyes E, Mazzaoui S, Moron A. Pulpal therapy for primary teeth: formocresol vs electrosurgery: a clinical study. *J Dent Child*. 2003;70(1):71-3.
130. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*. 2008;24:149-64.
131. Rodríguez Yunta E. Ethical challenges of genetic manipulation and research with animals. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(4):535-40.
132. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*. 1999;274:22041-7.

133. Ruby JD, Cox CF, Mitchell SC, Makhija S, Chompu-Inwai P, Jackson J. A randomized study of sodium hypochlorite versus formocresol pulpotomy in primary molar teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2013;23(2):145-52.
134. Sabbarini J, Mounir M, Dean J. Histological evaluation of enamel matrix derivative as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediatr Dent*. 2007;29(6):475-9.
135. Sabbarini J, Mohamed A, Wahba N, El-Meligy O, Dean J. Comparison of enamel matrix derivative versus formocresol as pulpotomy agents in the primary dentition. *J Endod*. 2008;34(3):284-7.
136. Sae Lim V, Wang CY, Trope M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of repanted dog's teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14(5):216-20.
137. Sáiz Moreno L, García de Osma JL, Compairé Fernández C. Animales de laboratorio. Cría, manejo y control sanitario. 1ªEd Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 1983;98-9.
138. Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulphate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol*. 2003;19(6):314-20.
139. Saltzman B, Sigal M, Clokie C, Rukavina J, Titley K, Kulkarni GV. 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 Pediatr Dent*. 2005;15(6):437-47.
140. Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. *J Osteoporos*. 2010;1:830231.

141. Sasaki H, Ogawa T, Koreeda M, Ozaki T, Sobue S, Ooshima T. Electrocoagulation extends the indication of calcium hydroxide pulpotomy in the primary dentition. *J Clin Pediatr Dent.* 2002;26(3):275-7.

142. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, y Cols. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res.* 2007;42:231-9.

143. Sazak H, Günday M, Alatli C. Effect of calcium hydroxide and combinations of Ledermix and calcium hydroxide on inflamed pulp in dog's teeth. *J Endod.* 1996;22(9):447-9.

144. Seow WK, Thong YH. Evaluation of the novel anti-inflammatory agent tetrandrine as a pulpotomy medicament in a canine model. *Pediatr Dent.* 1993;15(4):260-6.

145. Seux D. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulps in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol.* 1991;36:117-28.

146. Shalan H, Awad S, El-Fallal AA. Influence of pulpotomy medicaments on the ultrastructure and shear bond strength of a self-etch adhesive to primary tooth dentin. *Quintessence Int.* 2012;43(6):517-23.

147. Shayegan A, Petein M, Abbeele AV. Shayegan A, Petein M, Abbeele AV. Beta-tricalcium phosphate, white mineral trioxide aggregate, white Portland cement, ferric sulfate, and formocresol used as pulpotomy agents in primary pig teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(4):536-42.

148. Shayegan A, Petein M, Vanden Abbeele A. The use of beta-tricalcium phosphate, white MTA, white Portland cement and calcium hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dent Traumatol*. 2009;25(4):413-9.
149. Shuster E, Markman JR, Markman M. Fifty Years Later: The Significance of the Nuremberg Code. *N Engl J Med*. 1997;337:1436–40.
150. Simancas-Pallares MA, Díaz-Caballero AJ, Luna-Ricardo LM. Mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy. A systematic literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15:942-6.
151. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Advances in Dental Research*. 2011;23:340–5.
152. Sletten TL, Vincenzi S, Redman JR, Lockley SW, Rajaratnam SM. Timing of sleep and its relationship with the endogenous melatonin rhythm. *Front Neurol*. 2010;1:137.
153. Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res*. 2001;15:51-4.
154. Srinivasan V, Patchett CL, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's Formocresol? Part I- A narrative review of alternative interventions and materials. *Int J Paediatr Dent*. 2006;16(2):117-83.
155. Srinivasan D, Jayanthi M. Comparative evaluation of formocresol and mineral trioxide aggregate as pulpotomy agents in deciduous teeth. *Indian J Dent Res*. 2011;22(3):385-90.
156. Suárez-González D, Lee JS, Lan Levengood SK, Vanderby R Jr, Murphy WL. Mineral coatings modulate β -TCP stability and enable growth factor binding and release. *Acta Biomater*. 2012;8(3):1117-24.

157. Tabarsi B, Parirokh M, Eghbale, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J.* 2010;43:565-71.
158. Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, y Cols. Melatonin reduces dimethylnitrosamine- induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res.* 2004;37:78–84.
159. Ten Cate AR. Histología oral. Desarrollo, estructura y función. 2ª Ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana. 1986; 203-27.
160. Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, Sumita Y, y Cols. Differential effect of scaffold shape on dentin regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(4):1664-71.
161. Toomarian L, Fekrazad R, Sharifi D, Baghaei M, Rahimi H, Eslami B. Histopathological evaluation of pulpotomy with Er,Cr:YSGG laser vs formocresol. *Lasers Med Sci.* 2008;23(4):443-50.
162. Torabinejad M, Chivian N. Clinical application of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-206.
163. Trairatvorakul C, Koothiratrakarn A. Calcium hydroxide partial pulpotomy is an alternative to formocresol pulpotomy based on a 3-year randomized trial. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(5):382-9.
164. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, y Cols. Effect of a Calcium-silicate-based Restorative Cement on Pulp Repair. *J Dent Res.* 2012;91(12):1166-71.
165. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short term capping experiments. *Int Endod J.* 2002;35(3):245-54.

166. Urist MR, Behnam K, Kerendi F, Raskin K, Nuygen TD, Shamie AN, y Cols. Lipids closely associated with bone morphogenetic protein (BMP)-an induced heterotopic bone formation. With preliminary observations of deficiencies in lipid and osteoinduction in lathyrism in rats. *Connect Tissue Res.* 1997;36(1):9-20.
167. Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, y Cols. A comparison between the efficacy of Bio-Oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J.* 2012;35(1):28-37.
168. Vargas KG, Packham B, Lowman D. Preliminary evaluation of sodium hypochlorite for pulpotomies in primary molars. *Pediatr Dent.* 2006;28(6):511-7.
169. Vostatek SF, Kanellis MJ, Weber-Gasparoni K, Gregorsok RL. Sodium hypochlorite pulpotomies in primary teeth: a retrospective assessment. *Pediatr Dent.* 2011;33(4):327-32.
170. Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM, Soames JV. Primary molar pulp therapy – histological evaluation of failure. *Int J Paediatr Dent.* 2000;10(4):313-21.
171. Wong KS, Sae-Lim V. The effect of intracanal ledermix on root resorption of delayed replanted monkey teeth. *Dent Traumatol.* 2002;18(6):309-15.
172. Yadav P, Indushekar K, Saraf B, Sheoran N, Sardana D. Comparative evaluation of Ferric Sulfate, Electrosurgical and Diode Laser on human primary molars pulpotomy: an "in-vivo" study. *Laser Ther.* 2014;23(1):41-7.

173. Yaman E, Görken F, Pinar Erdem A, Sepet E, Aytepe Z. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper[®] in vital primary molar pulpotomy. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2012;13(4):197-202.
174. Yildirim T, Gencoglu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Hiltologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dog's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(1):120-4.
175. Yu X, Wang L, Peng F, Jiang X, Xia Z, Huang J, y Cols. The effect of fresh bone marrow cells on reconstruction of mouse calvarial defect combined with calvarial osteoprogenitor cells and collagen-apatite scaffold. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;7(12):974-83.
176. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod*. 2012;38(9):1220-6.
177. Zurn D, Seale NS. Light-cured calcium hydroxide vs formocresol in human primary molar pulpotomies: a randomized controlled trial. *Pediatr Dent*. 2008;30(1):34-41.