



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Valoración de la Microdureza y la Estructura
Química de la Dentina en Endodoncia
Regenerativa**

D^a Sonia Guzmán Pina

2018



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**“VALORACIÓN DE LA MICRODUREZA Y LA ESTRUCTURA
QUÍMICA DE LA DENTINA EN ENDODONCIA
REGENERATIVA”**

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
AÑO 2018

AUTOR: SONIA GUZMÁN PINA

DIRECTORES:

OLGA CORTÉS LILLO

M^a ANTONIA ALCAINA LORENTE

JUAN RAMÓN BOJ QUESADA

Facultad de Medicina

Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores, los doctores: Olga Cortés Lillo, M^a Antonia Alcaina Lorente y Juan Ramón Boj Quesada; por el apoyo incondicional recibido durante todo este tiempo.

Quisiera mencionar especialmente a la Dra. Olga Cortés, que por cercanía ha estado día tras día al pie del cañón. Darle las gracias por haberme acompañado en este largo camino lleno de altibajos, en el cual me ha ayudado a ver la luz cuando yo no la veía. Por haber dedicado muchas horas de su tiempo a gestionar esta investigación y a empujarla hacia delante sin perder nunca la ilusión en este trabajo. Y gracias por los valiosos consejos, tanto en lo profesional como en lo personal. Sin su motivación, esta tesis no habría sido posible.

Al profesor Manuel Canteras Jordana, catedrático de estadística, y a la profesora Matilde Campos Aranda; por acogernos siempre tan gratamente y ayudarnos en el desarrollo de la estadística de la tesis.

Al profesor Alberto Requena Rodríguez, catedrático de química física, y al profesor José Miguel Bolarín Guillén; por colaborar en el análisis e interpretación de los resultados.

A mi familia, formando parte de ella mis amigos y cualquier otra persona que me ha acompañado durante este viaje con alguna palabra de ánimo y de suerte. Este trabajo es también de todos ellos.

Ítaca

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.*

(...)

*Aunque la halles pobre,
Ítaca no te ha engañado
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Ítacas.*

Kavafis.

ÍNDICE

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	4
ABSTRACT	5
KEYWORDS	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 BASES TEÓRICAS.	8
Complejo dentino-pulpar. Concepto básicos.	8
Factores etiológicos de la enfermedad pulpar y periapical.	14
Fisiopatología pulpar.	15
Clasificación de las enfermedades pulpares.....	16
Microbiología de las infecciones pulpares y periapicales.	18
Tratamientos pulpares en dentición permanente joven.	21
1.2 REVASCULARIZACIÓN PULPAR.	24
Evolución histórica.	24
Apicoformación vs endodoncia regenerativa.....	25
Células madre, factores de crecimiento y armazones.	30
Protocolo de revascularización.	33
1.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS.	39
Antibióticos: pasta tri-antibiótica.	40
Hidróxido de calcio.....	43
Irrigantes y solventes.	44
1.4 TÉCNICAS PARA VALORAR LA ESTRUCTURA DEL DIENTE.	47
Mecánicas.	47
Químicas.....	48
2 OBJETIVOS.....	53
3 MATERIAL Y MÉTODO	54
4 RESULTADOS.	60
4.1 Análisis de los resultados	60
5 DISCUSIÓN.	72
6 CONCLUSIONES.....	85
7 BIBLIOGRAFÍA.....	86
8 ANEXOS.....	96

RESUMEN

Introducción: La necrosis pulpar en dientes permanentes jóvenes con ápices abiertos es uno de los mayores retos que tiene el odontólogo para conseguir el éxito de tratamiento. Habitualmente, el tratamiento de elección es la apicoformación mediante la inducción de una barrera apical con hidróxido de calcio o como alternativa con MTA. Sin embargo este tratamiento conduce a un elevado riesgo de fractura a largo plazo. Ante esta situación, se propone la revascularización o endodoncia regenerativa como alternativa. Este procedimiento se basa principalmente en la introducción de un medicamento intraconducto que se irá aplicando en distintos periodos de tiempo. Entre los medicamentos propuestos se encuentra la pasta tri-antibiótica (3-ATB) y el hidróxido de calcio. Varios estudios han descrito que la aplicación de estos medicamentos y sus solventes puede afectar la estructura química y microdureza del diente a lo largo del tiempo.

Objetivo: El objetivo de este estudio es investigar los efectos de la pasta tri-antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y clindamicina) y el hidróxido de calcio, utilizados con agua destilada y propilenglicol como solventes; en la microdureza y estructura química de la dentina en los periodos de tiempo de un mes y dos meses.

Material y método: Se trata de un estudio *in vitro* en el que se utilizan 100 dientes unirradiculares extraídos por motivos ortodóncicos, periodontales u otras circunstancias que impidan su conservación. Los grupos de estudio son: control negativo (diente intacto), control positivo (diente instrumentado), hidróxido de calcio y agua destilada, hidróxido de calcio y propilenglicol, pasta tri-antibiótica y agua destilada, pasta tri-antibiótica y propilenglicol. Los grupos con medicamento serán instrumentados e irrigados con hipoclorito sódico (NaOCl) al 5,25% y posteriormente obturados con el medicamento y el solvente correspondiente al grupo del que se trate. En los periodos de tiempo de un mes y dos meses se realizarán las pruebas de microdureza para cada uno de los grupos mediante el microdurómetro a escala Vickers así como la evaluación de la estructura química mediante espectroscopía Raman.

Resultados: Tanto en las pruebas de microdureza como en la prueba de espectroscopia Raman, se observa que hay diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los grupos de tratamiento (hidróxido de calcio y pasta tri-antibiótica) y no hay diferencias

significativas ($p > 0,005$) entre los tiempos (1 mes y 2 meses). El grupo que en general menores valores de microdureza y espectroscopía presenta es la pasta tri-antibiótica combinada con propilenglicol.

Conclusión: La aplicación de pasta tri-antibiótica y el uso de propilenglicol como solvente afecta en mayor grado a la microdureza y estructura química de la dentina, comparado con el hidróxido de calcio.

PALABRAS CLAVE

Diente permanente joven, hidróxido de calcio, microdureza, pasta tri-antibiótica, raman, revascularización.

ABSTRACT

Introduction: Pulp necrosis in young permanent teeth with open apices is one of the greatest challenges that the dentist has to achieve treatment success. Typically, the treatment of choice is the apexification with the induction of an apical barrier with calcium hydroxide or alternatively with MTA. However, this treatment increase the long term risk of fracture. Against this background, revascularization or regenerative endodontic therapy is proposed like an alternative treatment. It is based on the introduction of an intracanal dressing that will be applied in different periods of time. Among the proposed medications is tri-antibiotic paste (3-ATB) and calcium hydroxide. Several studies have described that the application of these agents and their solvents can affect the chemical structure and microhardness of the tooth over time.

Objective: To investigate the effects of tri-antibiotic paste (ciprofloxacin, metronidazole, clindamycin) and calcium hydroxide, used with distilled water and propylene glycol as solvents, in the microhardness and chemical structure of the dentin in the time periods of one and two months.

Material and methods: It is an *in vitro* study with 100 singled-rooted teeth extracted from orthodontic, periodontal or another reasons that impede their conservation. There will be divided into different study groups: negative control (intact tooth), positive control (instrumented tooth) calcium hydroxide and distilled water, calcium hydroxide and propylene glycol, tri-antibiotic paste and distilled water, tri-antibiotic paste and propylene glycol. The medicament groups will be instrumented and irrigated with sodium hypochlorite (NaOCl) 5,25% and filled with medicament and the solvent corresponding to the group concerned. Microhardness test will be done in one month and two months in each group using a Vickers microhardness tester as well as the evaluation of the chemical structure by means of Raman spectroscopy.

Results: Both in the microhardness tests and in the Raman spectroscopy test, it is observed that there are significant differences ($p < 0.005$) between the treatment groups (calcium hydroxide and tri-antibiotic paste) and there are no significant differences ($p > 0.005$) between the times (1 month and 2 months). The group that generally has lower values in microhardness and spectroscopy tests is the tri-antibiotic paste combined with propylene glycol.

Conclusion: The application of tri-antibiotic paste and the use of propylene glycol as a solvent affect to a greater degree the microhardness and chemical structure of dentin, compared with calcium hydroxide and distilled water.

KEYWORDS

Immature permanent tooth, calcium hydroxide, microhardness, triple antibiotic paste, raman, revascularization.

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente la endodoncia regenerativa es una alternativa a los procedimientos de apicoformación, permitiendo la continuidad del desarrollo radicular en dientes necróticos inmaduros. Sin embargo, el tratamiento de los dientes permanentes jóvenes con necrosis pulpar sigue siendo un reto para el profesional. La ingeniería tisular en un futuro podrá permitir el desarrollo completo del diente a partir de las células pluripotenciales; no obstante, hasta entonces, son fundamentales los estudios experimentales y ensayos clínicos que permitan comprender los diferentes aspectos de este procedimiento y aportar resultados más fiables a los tratamientos de regeneración.

En el desarrollo de la técnica, la pasta 3-ATB (ciprofloxacino, metronidazol y minociclina) se ha descrito como medicación intraconducto. Entre los efectos secundarios de la pasta se han descrito sensibilidad, resistencias y cambios de color. Para solventar éste último, se han propuesto modificaciones como la pasta 2-ATB o sustituir la minociclina por otros antibióticos como la clindamicina o el cefaclor. El hidróxido de calcio es otra de las opciones que se ha propuesto como alternativa a la pasta 3-ATB y que solventa los efectos no deseables asociados a la misma; sin embargo, el uso en periodos prolongados del hidróxido de calcio puede suponer un mayor riesgo de fractura radicular. En este sentido es escasa la evidencia de los cambios que a nivel estructural puede implicar la utilización de la pasta 3-ATB. Además entre los solventes utilizados con ambas medicaciones intraconducto destacan el agua destilada y el propilenglicol, los cuales también pueden causar modificaciones en la dentina.

Por ello, el propósito de este estudio ha sido valorar el efecto de la pasta 3-ATB y el hidróxido de calcio con diferentes solventes y en distintos periodos de tiempo sobre la microdureza y la estructura química de la dentina.

1.1 BASES TEÓRICAS.

Complejo dentino-pulpar. Concepto básicos.

- **La pulpa dental:**

Es la materia orgánica del diente, responsable de toda la actividad metabólica del mismo. De origen mesenquimático, se localiza en el interior de la cámara pulpar y de los conductos radiculares. Es la forma madura de la papila dental y tiene la particularidad de ser el único tejido blando del diente. Junto con el tejido dentinario, constituye una unidad biológica estructural, embriológica y funcional, conocida como complejo dentinopulpar.

Estructuralmente, la pulpa es un tejido conectivo laxo ricamente vascularizado e innervado. Está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica. Ésta última posee un elevado contenido celular formado por odontoblastos, fibroblastos, células madre, macrófagos, linfocitos; y matriz extracelular (MEC) compuesta por fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental amorfa, líquido tisular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (1)

La capa celular más periférica la constituyen los odontoblastos, que son unas células específicas del tejido pulpar que secretan y mineralizan la dentina a lo largo de toda la vida del diente a modo de protección. Se encuentran a nivel coronario con una densidad de 45.000 células/mm² y disminuyen a nivel radicular.

El tamaño de los odontoblastos y el contenido de sus organelas citoplasmáticas varía a lo largo del ciclo de vida celular y está estrechamente relacionado con su actividad funcional. La relación entre el tamaño y la actividad secretora se puede observar en la diferencia de dimensiones entre los odontoblastos de la raíz y los de la corona, que expresan distintas tasas de actividad dentinogénica en dichas áreas (2).

Existen tres tipos de uniones intercelulares mediadas por la fibronectina; impermeables, adherentes y comunicantes, que permiten que los odontoblastos se comuniquen entre sí y con las otras células pulpares. De esta forma una agresión a los odontoblastos puede originar una reacción pulpar. Inmediatamente debajo de la capa odontoblástica se encuentra la zona oligocelular de Weil, que aporta abundante irrigación mediante el

plexo capilar sub-odontoblástico, e inervación con el plexo nervioso de Raschkow. A continuación hay una zona rica en células, en la cual encontramos (3):

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

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

Los vasos sanguíneos penetran en la pulpa acompañados de las fibras nerviosas sensitivas y autónomas y salen de ella a través del conducto o foramen apical. La microvascularización es la base de nutrición del complejo dentino-pulpar y está formada por (4):

- a) Arteriolas: penetran en la pulpa por el foramen apical formando al centro un amplio plexo del cual salen vasos de menor calibre que dan lugar al plexo capilar sub-dentinoblástico.
- b) Vénulas: acompañan a los capilares, presentan anastomosis directas con las arteriolas.
- c) Vasos linfáticos, los cuales se inician en el centro pulpar y salen por el foramen apical.

La inervación del tejido pulpar está localizada en el plexo de Raschkow, el cual se ubica en la zona sub-odontoblástica y se forma por dos tipos de fibras (4):

- a) Fibras mielínicas: son las tipo A delta. Reciben información de la unión dentinopulpar y de la dentina profunda, siendo responsable de la sensibilidad dentinaria. Tienen un umbral de estimulación bajo y se encargan de transmitir dolor de tipo agudo y punzante.
- b) Fibras amielínicas: son las tipo C. Son responsables del control del flujo vascular y su campo receptor se distribuye por toda la pulpa. Responden a mediadores inflamatorios por lesiones nocivas al tejido pulpar y por aplicación prolongada de calor. Presentan un elevado umbral de estimulación y transmiten un dolor intenso y quebrante.

Para poder comprender mejor el tejido pulpar, el cual es responsable del metabolismo dental, es fundamental conocer las funciones que este cumple (1,5):

- a) Inductora: el mecanismo inductor del complejo dentino-pulpar ocurre en la amelogenénesis, pues es necesario el depósito de dentina para que pueda ocurrir la síntesis y depósito de esmalte.
- b) Formativa: la función esencial de la pulpa es formar dentina. De la papila dental (origen mesodérmico) surge la capa celular especializada de odontoblastos, en íntimo contacto con la cara interna del órgano del esmalte (ectodérmico), que interactúan para comenzar la formación de dentina. Según el momento en el que se produce, surgen los distintos tipos de dentina: primaria, secundaria y terciaria o reparativa. Esta última se elabora en respuesta a estímulos tales como biológicos (caries), físicos (calor, presión) o químicos (sustancias provenientes de algunos materiales dentales). Es un proceso rápido hasta que se forma completamente la raíz y corona, y a partir de ahí, se ralentiza mucho, aunque no se detiene completamente.
- c) Nutritiva: la pulpa se encarga de nutrir a la dentina mediante las prolongaciones odontoblásticas y los metabolitos que provienen del sistema vascular pulpar. A través del fluido tisular, los nutrientes y el oxígeno se intercambian desde los capilares hacia el líquido intersticial y alcanzan la dentina por medio de los túbulos que contienen las prolongaciones odontoblásticas, siendo mayor la circulación en la periferia (plexo vascular sub-odontoblástico), que en el centro de la pulpa. Ésta circulación también es determinante para atraer el infiltrado

inflamatorio ante estímulos lesivos y cuando el diente se ha recuperado abren camino para disminuir la inflamación. Por otro lado encontramos vasos linfáticos que se unen a los del ligamento periodontal y drenan a los ganglios linfáticos regionales.

- d) Sensitiva o neurológica: la pulpa, mediante los nervios sensitivos responde ante los distintos estímulos o agresiones, con dolor dentinario o pulpar. El dolor dentinario es agudo y de corta duración, mientras que el dolor pulpar es sordo y pulsátil, persistiendo cierto tiempo.
- e) Defensiva o reparadora: las respuestas del odontoblasto a las agresiones externas son el dolor, la esclerosis dentinaria y la dentina reparativa, y están destinadas a disminuir la permeabilidad de la dentina y actuar de barrera ante las mismas. A su vez en la pulpa se origina un infiltrado crónico con vasodilatación mediado por linfocitos, plasmocitos y macrófagos, y si el estímulo lesivo es leve la inflamación será reversible y curará por sí sola.

Con la edad, el tejido pulpar experimenta variaciones estructurales y funcionales, al igual que otros tejidos del organismo. Estos cambios suponen una disminución en la capacidad de respuesta biológica, por lo que el tejido pulpar no responde a los estímulos externos como lo hace una pulpa joven. La capacidad de autodefensa de una pulpa joven, es mayor al contar con un número más alto de elementos celulares indiferenciados capaces de neoformar odontoblastos.

- **La dentina:**

Es el tejido mineralizado de mayor volumen del diente y constituye el eje estructural del mismo. La porción coronaria de la dentina está recubierta por esmalte, mientras que la región radicular está tapizada por cemento. Como se ha mencionado anteriormente, junto con la pulpa constituye el complejo dentino-pulpar.

El espesor de la dentina varía según el diente: en los incisivos inferiores es mínimo (1-1,5 mm) mientras que en los caninos y molares es de 3mm, aproximadamente. En cada diente en concreto, el espesor es mayor en los bordes incisales o cuspideos y menor en la raíz. Es importante tener en cuenta que, debido al tipo de crecimiento aposicional que presenta la dentina, el espesor es mayor en dientes ancianos que en los jóvenes.

En la estructura de la dentina podemos distinguir dos componentes básicos: la matriz mineralizada y los túbulos dentinarios que la atraviesan y que alojan a los procesos odontoblásticos en cuyo interior se encuentran los odontoblastos. Estas células se encargan de producir la matriz colágena de la dentina y también participar en los procesos de mineralización de la misma (1).

El patrón de fibras colágenas mineralizadas constituye un malla continua, que contribuye a las características mecánicas de la dentina (6).

La composición química de la dentina es aproximadamente la siguiente (1):

- Materia inorgánica (mineral; principalmente cristales de hidroxiapatita): 70%.
- Materia orgánica (proteica; principalmente, fibras colágenas): 18%.
- Agua: 12%.

Aunque se asume esta composición química general para la dentina, existen variaciones entre las distintas regiones de la misma así como entre la dentina de la corona y de la raíz.

En la matriz orgánica el colágeno representa el 90% de la misma. El colágeno tipo I y II constituye el 98% del colágeno y los colágenos III y V, el 1-2% y 1% respectivamente. Los colágenos tipo IV y VI se han descrito en muy pequeñas proporciones. El colágeno tipo III se segrega en casos de dentina opalescente y ocasionalmente está presente en la denominada dentina peritubular; el de tipo IV, en momentos iniciales de la dentinogénesis, cuando existe una membrana basal que separa la dentina no mineralizada de los ameloblastos secretores y, finalmente los de tipo V y VI se han descrito en distintas regiones de la predentina.

La matriz inorgánica está compuesta por cristales de hidroxiapatita similares químicamente a los del esmalte, cemento y hueso. Por su tamaño se diferencian de los grandes cristales del esmalte, ya que los cristales de dentina son pequeños y delgados, más parecidos a los que se encuentran en el tejido óseo. Los cristales se orientan de forma paralela a las fibras de colágeno de la matriz dentinaria, disponiéndose entre las fibras (70-75%) y, también, dentro de las mismas (25-30%), ocupando los espacios entre las moléculas de colágeno que la forman.

En la fracción mineral, además de los cristales de hidroxiapatita hay cierta cantidad de fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligoelementos; como flúor, cobre, zinc, hierro, magnesio, etc. Existe, asimismo, calcio ligado a componentes orgánicos que actuarían como reservorio para la formación de cristales de hidroxiapatita.

Respecto a la estructura histológica de la dentina es importante tener en cuenta que (1):

- Los túbulos dentinarios son mayores por unidad de superficie en las zonas de dentina próximas a las pulpa (45.000 a 65.000 por mm^2), mientras que en las regiones más externas de la dentina su número disminuye (15.000-20.000 por mm^2).
- El diámetro de los túbulos, en general, también varía, siendo más anchos en la proximidad de la pulpa, alcanzando 5 μm de diámetro (promedio 3,5 μm) y más estrechos en la periferia. Estas variaciones morfológicas van a influir en los cambios de presión en el interior de los túbulos.
- En una dentina joven, el espesor de la dentina peritubular es de 400 μm en la proximidad pulpar, mientras que en las zonas cercanas a la unión amelodentinaria (UAD) es de 750 μm .
- El área de dentina intertubular también varía según la profundidad de la dentina, siendo aproximadamente un 12% en la predentina y un 96% a nivel de la UAD.

Estas características histológicas determinan el índice de permeabilidad dentinaria, que es mayor cerca de la cámara pulpar y de los cuernos pulpares. Las diferencias regionales de permeabilidad de los túbulos puede deberse también a irregularidades en la luz de los mismos, producidos por depósitos minerales o de colágeno intratubular.

A nivel de la UAD (unión amelodentinaria), el tubo puede estar total o casi totalmente ocupado por dentina peritubular. En el tercio medio de la dentina la zona peritubular de los túbulos presenta espesores variables, mientras que en la zona cercana a la pulpa es mínima o puede estar ausente (en dientes jóvenes o dentina recién formada), por lo que el diámetro del tubo aumenta notablemente. Estas modificaciones influyen en el paso del estímulo dentinario, siendo este paso más rápido en una dentina joven que en la de un diente adulto.

La existencia de túbulos dentinarios determina que la dentina sea muy permeable. Suponen una vía de ingreso de microorganismos provenientes de caries. En la dentina de diente jóvenes que no han completado el ápice, los túbulos son más amplios y permeables, lo cual facilita aún más la filtración de bacterias o sus toxinas. Asimismo, pueden determinar la penetración de los distintos materiales odontológicos de uso reparativo.

La clasificación histopatológica de la dentina es la siguiente (1):

- a) La *dentina del manto o palial* es la primera que se forma y está ubicada periféricamente. Resulta menos calcificada que la circumpulpar (4%). Con la edad, sin embargo, la dentina del manto incrementa su dureza y su módulo de elasticidad debido a cambios en la mineralización.
- b) La *dentina circumpulpar* es el resto de la dentina producida y mineralizada. Presenta las características histológicas típicas descritas para la dentina, en general.
- c) La *predentina*, sin mineralizar, que está adyacente a los odontoblastos de la pulpa. Está constituida por una matriz orgánica dentinaria, muy rica en componentes azufrados.

La vitalidad pulpar decrece con la edad y los túbulos dentinarios disminuyen progresivamente su calibre debido al depósito continuo de la dentina peritubular y por la aposición de cristales de hidroxiapatita.

La permeabilidad de la dentina es un hecho determinante en la respuesta pulpar que dependerá entre otros factores de la edad del tejido pulpar, la composición de los tejidos duros del diente, el contenido en fluoruros, la higiene oral, la saliva y la dieta.

Factores etiológicos de la enfermedad pulpar y periapical.

La integridad del tejido pulpar es necesaria para mantener la vitalidad del diente. Sin embargo puede sufrir distintas alteraciones como consecuencia de agresiones tanto exógenas como endógenas.

Los estímulos que pueden dar lugar a inflamación y necrosis pulpar, así como a sus complicaciones periapicales son principalmente (1):

- a) Factores bacterianos. Los productos producidos por las bacterias representan la causa más frecuente de enfermedad endodóntica. Los diversos géneros y especies bacterianas llegan a la pulpa a través de varias vías como caries dental, periodonto, filtración marginal, anomalías de desarrollo y circulación sanguínea. La respuesta pulpar viene dada por la permeabilidad de los túbulos dentinarios y es principalmente inflamatoria.
- b) Factores traumáticos. La respuesta a traumatismos dentales puede ser variable, cursando aparentemente sin efectos adversos, mientras que otras sufren una necrosis. Aquellos accidentes que producen una exposición pulpar o dentinaria posibilitan la llegada de bacterias a la pulpa. Por otro lado, cuando el traumatismo no ocasiona comunicación con la cavidad bucal pero sí la necrosis pulpar debido a que se lesiona la vascularización, las bacterias pueden acceder por anacoresis.
- c) Factores iatrogénicos. Dentro de esta categoría se encuentran aquellos procedimientos restauradores que produzcan calor y desecación de los túbulos dentinarios, productos y sustancias químicas responsables de irritación pulpar, raspado periodontal que seccione una arteriola que transcurra por un conducto lateral, así como movimientos ortodóncicos demasiado bruscos.
- d) Factores idiopáticos. Engloban factores desconocidos que puedan causar enfermedad pulpar y/o periapical.

Fisiopatología pulpar.

Como se mencionó anteriormente, existen diversos agentes que pueden irritar y dañar al complejo dentino-pulpar, el cual reacciona ante los distintos estímulos. En base a esto, podemos diferenciar tres condiciones fisiopatológicas en el órgano dentino-pulpar (7):

- En casos de lesiones leves, como la caries dentinaria de progresión lenta, los odontoblastos no se verán dañados y son estimulados para formar una barrera de dentina terciaria reactiva por debajo de la lesión. Es una dentina que se

parece bastante a la primaria y secundaria, suponiendo una valiosa barrera para defenderse del estímulo.

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

Clasificación de las enfermedades pulpares.

En base al grado de afectación pulpar, podemos distinguir los siguientes tipos de patología pulpar (8):

Pulpitis reversible.

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

Pulpitis irreversible.

Es el resultado de los cambios vasculares y celulares producidos como respuesta a la agresión al tejido pulpar. Aumenta la presión intrapulpar por aumentar el caudal de sangre que trae consigo las proteínas del exudado inflamatorio y células del sistema de defensa. Los linfocitos emigran a la lesión por diapédesis y al realizar la fagocitosis liberan metabolitos y proteasas tóxicas que provocan daño tisular. Además aumenta el

CO₂ y disminuye el pH, lo cual genera zonas de necrosis que actúan como nuevos centros de inflamación. Alrededor de esta zona aparece una fase proliferativa que genera fibroblastos y tiene función reparativa. Todo esto se traduce en una sintomatología muy dolorosa.

Cambios regresivos pulpares.

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

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

- - Atrofia y fibrosis con un tejido pulpar poco sensible.
- - Degeneración cálcica o calcificaciones sin que el paciente note molestia.

Reabsorción dentinaria interna.

Es la destrucción de las paredes dentinarias por los odontoclastos, y se puede encontrar tanto en la cámara pulpar como en los conductos. Su etiología es controvertida, se relaciona con la inflamación pulpar crónica que puede estar causada entre otros por caries, por tratamientos pulpares o por movimientos ortodóncicos. Los odontoclastos reabsorben primero la predentina dejando unos huecos llamados lagunas de Howship, pudiendo alcanzar el cemento. Normalmente no son dolorosas y el hallazgo es casual, o porque el paciente acude a la consulta al observarse un cambio de color en el diente. El tratamiento es la pulpectomía, que deberá ser lo mas precoz posible para aumentar la viabilidad del diente.

Reabsorción dentinaria externa.

Al contrario que la interna, ésta es centrípeta. El tejido periodontal sustituye al cemento y la dentina provocando la muerte pulpar. La pulpectomía no garantizara la curación en todos los casos pero se utiliza como tratamiento.

Necrosis.

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

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

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

Microbiología de las infecciones pulpares y periapicales.

Los dientes comparten el microambiente de la cavidad bucal con aproximadamente 500 especies bacterianas distintas. La pulpa es una estructura que se rodea por dos tejidos: el esmalte y la dentina, que a modo de murallas la protegen de los microorganismos del

medio. De esta forma, la pulpa se encuentra aséptica y libre de gérmenes; por tanto la presencia de alguno de ellos implica el deterioro de las estructuras que la aíslan del medio externo.

En una infección endodóntica, la mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas, aunque también podemos encontrar un buen número de anaerobias facultativas y bacterias microaerófilas. Las bacterias anaerobias estrictas sólo proliferan en ausencia de oxígeno, pero tienen sensibilidad variable a este, funcionando a potenciales de oxidación y reducción bajos. Generalmente carecen de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. Las bacterias anaerobias facultativas se reproducen en presencia o ausencia de oxígeno y sí suelen tener enzimas superóxido de dismutasa y catalasa. Los aerobios obligados (estrictos) se encuentran en una mínima cantidad y requieren oxígeno para multiplicarse y poseen tanto superóxido de dismutasa como catalasa. Por otro lado, las bacterias microaerófilas pueden multiplicarse en un medio con oxígeno, pero obtienen predominantemente su energía de vías anaerobias.

Aunque hay varios caminos para que las bacterias lleguen a la pulpa, las bacterias pueden utilizar diversas puertas de entrada hacia la cavidad pulpar. El medio más frecuente es la caries, en la cual poco a poco las bacterias se aproximan hasta alcanzar la pulpa. En función de su magnitud y proximidad la patología se instaura rápidamente o de forma prolongada. Otros medios a través de los cuales se produce la infiltración bacteriana a la pulpa son (9):

- *Túbulos dentinarios*: miden aproximadamente entre 0,5-1u de diámetro en la periferia y hasta 3-5u cerca de la pulpa, siendo lo suficientemente amplios como para permitir el paso de bacterias. Una vez dentro de los túbulos, éstas avanzan por división hasta alcanzar el tejido pulpar.
- *Defectos en el sellado marginal*, facilitando el ingreso de bacterias a través de la interfase material-diente de determinados materiales de restauración.
- *Infección periodontal*, debido a la comunicación con el tejido pulpar. Una infección de la pulpa puede tener su origen en una patología periodontal. La vía más común de migración microbiana desde el periodonto hacia la cavidad pulpar se produce a través de los conductos laterales.

- *Traumatismo*, tienen su mayor incidencia entre la población infantil. Desde la perspectiva microbiológica, los de mayor importancia son aquellos que comprometen la corona del diente y dejan expuesto el tejido pulpar. Esta posibilidad cobra mayor importancia en niños y pacientes jóvenes puesto que presentan túbulos de mayor calibre que en los adultos.
- *Otras vías de infección*, como por ejemplo lesiones periapicales en dientes vecinos que producen la necrosis de la pulpa mediante anacoresis por la cual los microorganismos pueden ser transportados en la sangre o la linfa a una zona de inflamación como un diente con pulpitis, donde pueden establecer una infección.

Cuando la pulpa se expone a la microbiota bucal a través de una cavidad, el tejido pulpar se ve expuesto a concentraciones mayores de productos microbianos. En esta situación, el tejido pulpar no consigue impedir la infiltración y la diseminación de los microorganismos o de sus productos y comienzan a desintegrarse porciones de la pulpa. La necrosis es inevitable y se crean condiciones favorables para una infección pulpar masiva.

La mayor parte de las necrosis pulpares obedecen a infecciones polimicrobianas y mixtas que incluyen aerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerófilos como microorganismos concomitantes. Éstos últimos, y los aerobios estrictos, disminuyen la tensión de oxígeno y el potencial de oxidorreducción en los tejidos. De este modo, proporcionan las condiciones favorables para que se desarrollen las bacterias estrictamente anaerobias.

La microbiota del conducto radicular de dientes no cariados con pulpa necrótica y enfermedad periapical esta dominada (>90%) por anaerobios estrictos por lo común pertenecientes a los géneros: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus* (10)(11).

Estudios realizados en dientes temporales muestran que en los conductos radiculares de dientes primarios con lesiones pulpares y periapicales existe una infección polimicrobiana con predominancia de microorganismos anaerobios, similar a los de la microbiota de dientes permanentes (11).

Destaca la presencia de bacterias de pigmento negro (BPB), las cuales se han relacionado en varios estudios con los signos y síntomas clínicos siendo la *Prevotella nigrecens*, la más comúnmente aislada tanto en conductos radiculares como en abscesos perirradiculares de origen endodóntico. Éstas mismas bacterias han sido encontradas en dientes deciduos necróticas aproximadamente en un 30% de todos los casos estudiados, y en el 44 % de dientes temporales con retratamiento. No se ha observado la asociación entre la presencia de BPB con el desarrollo de abscesos en dientes temporales (10).

Estos resultados muestran que las infecciones endodónticas en dientes deciduos son de carácter polimicrobiano, muy similares a aquellas en dientes permanentes.

Tratamientos pulpares en dentición permanente joven.

Un diente permanente joven o inmaduro es aquel que presenta un desarrollo radicular incompleto. En aquellos casos en los que un diente permanente joven sea diagnosticado con pulpa normal, pulpitis reversible o la pulpa no esté vital, el tratamiento pulpar recomendado por la Guía de la Asociación Americana de Odontopediatría (12) y por otros autores de referencia al que puede someterse el diente abarca los siguientes procedimientos (13,14):

Tratamiento pulpar vital: pulpa normal o pulpitis reversible

Apicogénesis:

Este procedimiento se realiza en aquellos casos con pulpa normal o lesión reversible. El término describe la continuidad en el desarrollo fisiológico y en la formación del ápice radicular del diente. Este procedimiento se puede realizar llevando a cabo alguno de los tratamientos pulpares vitales que se describen a continuación:

- Tratamiento pulpar indirecto. Este tratamiento está indicado en dientes diagnosticados de pulpitis reversible sin exposición pulpar, que de otra manera necesitarían un tratamiento de conductos si la caries fuera eliminada por completo. El procedimiento habitual se basa en llevar a cabo la remoción de caries en dos citas, de forma que se elimina la caries hasta la zona de la pulpa más próxima posible, se coloca una base protectora (hidróxido de calcio, ionómero de vidrio o MTA), y se restaura el diente para volver a entrar y

eliminar cualquier dentina infectada remanente. El riesgo de este procedimiento reside en llevar a cabo una exposición pulpar accidental o una lesión pulpar irreversible. Se considera primordial realizar un adecuado sellado marginal que impida la microfiltración.

- Protección pulpar directa. Este tratamiento se realiza en aquellos casos en los que se lleva a cabo una exposición pulpar iatrogénica de pequeño tamaño durante la preparación de la cavidad. El objetivo de este tratamiento es mantener la vitalidad pulpar mediante la formación de una barrera calcificada (dentina reparativa) en la zona expuesta. En estos casos, se controla la hemorragia pulpar y se coloca un material como el hidróxido de calcio o el MTA previo a colocar una restauración que selle por completo el diente evitando la microfiltración.
- Pulpotomía parcial para exposiciones por caries. La indicación de este procedimiento son dientes vitales, con diagnóstico de pulpa normal o pulpitis reversible. Se realiza en exposiciones pulpares en las cuales el sangrado es controlado durante unos minutos. Se diferencia de la protección pulpar directa en que en la pulpotomía se elimina más tejido adicional a la exposición. Tradicionalmente, la pulpotomía implica la remoción del tejido pulpar coronal completo hasta la zona cervical. Actualmente la profundidad del tejido eliminado se basa en el juicio clínico: solo el tejido con sangrado profuso, inflamado o infectado, debe ser eliminado. Posteriormente se cubre la zona con hidróxido de calcio o MTA. A pesar de que el hidróxido de calcio aporta buenos resultados, se ha demostrado que el MTA proporciona buena salud pulpar y un puente dentinario más predecible. Este debe cubrir la exposición y la dentina de alrededor seguido de una capa fotopolimerizable de ionómero de vidrio modificado con resina. La restauración que se coloque debe evitar posibles microfiltraciones.
- Pulpotomía parcial para exposiciones por traumatismos (pulpotomía de Cvek). Es un proceso indicado en dientes vitales permanentes jóvenes, con pulpa expuesta por un traumatismo, especialmente en dientes con formación incompleta del ápice. Cvek et al (15) observaron que en dientes sin tratar que habían sufrido una exposición pulpar por traumatismo, la reacción pulpar inflamatoria era proliferativa (hiperplasia), y la inflamación no se extendía mas

de 2 mm en el tejido pulpar incluso después de 7 días. Por tanto recomiendan no eliminar más de 2 mm de tejido pulpar en estos casos. Se debe eliminar cuidadosamente el tejido coronal mediante la amputación del mismo para prevenir la continuación del sangrado, contaminación y descoloración del diente. Se recomienda utilizar una fresa de diamante abrasiva de alta velocidad e irrigación con agua, para dañar lo menor posible el tejido subyacente. El sangrado es controlado durante unos minutos para cubrir la zona posteriormente con hidróxido de calcio o MTA. Se debe evitar la microfiltración mediante la restauración colocada posteriormente. El objetivo de este tratamiento es que el tejido pulpar remanente continúe siendo vital.

- **Pulpotomía cervical.** Se realiza en dientes en los que el tejido pulpar sano, con potencial para producir un puente dentinario y completar la formación de la raíz, aún persiste en el conducto radicular. La técnica de la pulpotomía cervical es similar a la de la parcial excepto por el nivel de tejido pulpar amputado. En la pulpotomía cervical el tejido coronal pulpar es eliminado cuidadosamente usando un excavador o una fresa redonda de baja velocidad hasta el nivel de entrada de los conductos radiculares. Como material de recubrimiento se utiliza MTA o hidróxido de calcio para mantener la vitalidad y función pulpar. Es muy importante realizar una restauración definitiva tan pronto como sea posible para prevenir la filtración bacteriana y asegurar el éxito del tratamiento.

Tratamiento pulpar no vital:

Apicoformación:

Este tratamiento se realiza en dientes permanentes jóvenes no vitales con desarrollo incompleto de la raíz. Sólo debe realizarse cuando exista un diagnóstico seguro de necrosis pulpar. La finalidad es crear una barrera mediante la cual se induce el cierre apical, sin aumento de la anchura o la longitud de la raíz puesto que la vaina epitelial de Hertwig está ausente. Para ello se realiza la remoción de tejido no vital coronal y radicular para colocar un agente biocompatible como el hidróxido de calcio, de dos a cuatro semanas para desinfectar el conducto. El cierre apical de la raíz suele realizarse mediante MTA, dando lugar a una barrera apical. Una vez que esto sucede, el resto del conducto puede ser rellenado con gutapercha.

Aunque radiográficamente se observe que se ha producido el cierre apical, histológicamente este es poroso, existiendo riesgo de una fractura cervical. Varios estudios han demostrado que dejar el hidróxido de calcio en contacto con la dentina radicular durante más de un mes, puede provocar una fractura radicular.

Revascularización pulpar y regeneración:

El tratamiento habitual recomendado para dientes permanentes jóvenes con necrosis pulpar y ápices abiertos es la apicoformación, tal y como se ha descrito previamente. Sin embargo no es posible que se complete la maduración de la raíz quedando corta, delgada y con riesgo de fractura.

Varios estudios sugieren que el tejido pulpar desvitalizado puede actuar como almacén en el cual un nuevo tejido vascularizado puede crecer. Por tanto, crear las condiciones adecuadas en un diente necrótico inmaduro e incluso infectado podría permitir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y tejido en el espacio pulpar. Estas condiciones incluyen una desinfección adecuada, la creación de un almacén en el que el tejido pueda crecer y un sellado efectivo del acceso coronal.

A continuación se desarrollará el concepto de revascularización pulpar de forma más detallada.

1.2 REVASCULARIZACIÓN PULPAR.

Evolución histórica.

Desde su inicio, el objetivo principal de la odontología se ha basado en la sustitución de los tejidos perdidos o enfermos, incluyendo la obturación endodóntica de los conductos radiculares con materiales inertes. Sin embargo, el objetivo de la odontología regenerativa consiste en inducir la sustitución biológica de los tejidos dentales y las estructuras de soporte. El potencial de la odontología regenerativa surge de los avances logrados en el campo de la ingeniería tisular gracias a los nuevos conocimientos de biología molecular, que se centran en el ensamblaje en el espacio de células madre, factores de crecimiento y armazones para formar un tejido.

Nygaard-Ostby se considera un pionero en los procedimientos de endodoncia regenerativa, ya que hace más de 50 años mostró que se podía inducir un nuevo tejido

vascularizado en el tercio apical del canal radicular de un diente maduro con pulpa necrótica y lesión apical. Este proceso se acompañaba de la creación de un coágulo sanguíneo en el tercio apical una vez limpio y desinfectado el canal radicular para su posterior obturación. Propuso que a partir de la formación del coágulo la vascularización podía establecer y sustentar el crecimiento de nuevo tejido. Proporcionó evidencia histológica que soportaba este concepto (16).

A comienzos del siglo XXI ya se podía observar el potencial de estos tratamientos para la práctica odontológica, incluyendo la endodoncia. Actualmente, en estudios *in vitro* ya es posible regenerar pulpa, dentina y esmalte utilizando un material de armazón y células madre, así como regenerar las coronas dentales usando epitelio embrionario oral primordial y células madre adultas de la médula ósea entre otros procedimientos que abarcan la formación de corona, raíz y estructuras periodontales. De esta forma, los procedimientos de regeneración dental se presentan como un cambio en evolución con gran futuro en la odontología (17).

En su aplicación clínica, el tratamiento ideal para un diente con raíz incompleta e inmadura y necrosis pulpar es la regeneración del tejido pulpar o similar que sea capaz de promover la continuación del desarrollo normal de la raíz (18).

De este modo, la endodoncia regenerativa se define como aquellos **procedimientos de base biológica diseñados para reemplazar estructuras dañadas como la dentina, la raíz y las células del complejo pulpo-dentinario.**

Apicoformación vs endodoncia regenerativa.

Existe cierta controversia acerca de la terminología, requisitos e indicaciones a tener en cuenta en cada procedimiento clínico aplicado a dientes permanentes con desarrollo apical inmaduro y con diagnóstico de necrosis pulpar. Hay que tener en cuenta las ventajas y limitaciones relativas de la revascularización comparadas con otras opciones de tratamiento de los dientes inmaduros con pulpa necrótica. Son varias las consideraciones a tener en cuenta cuando se hace necesario un tratamiento de conductos en una raíz con ápice no formado (17).

Las características principales de este tipo de dientes son: ápice con desarrollo incompleto que a menudo adopta la forma de trabuco, dificultad para la limpieza y

modelado de la porción apical del sistema de conductos radiculares, paredes de dentina finas y frágiles que son propensas a la fractura del diente durante la instrumentación u obturación. Además el ápice abierto aumenta el riesgo de extrusión del material hacia los tejidos perirradiculares. Por otro lado a causa de la edad de los niños afectados, éstos pueden presentar un comportamiento complicado lo cual dificulta el tratamiento. Sobre todo en niños de 6-9 años, tanto por su edad como por el componente psicológico asociado, en los casos en los que el diente necrótico se deba a un trauma previo, lo cual puede aumentar su ansiedad. La endodoncia regenerativa supone pues una oportunidad para tratar a estos niños con dientes permanentes inmaduros facilitando su colaboración (19).

Se define **apicoformación** como un método para inducir una barrera calcificada en una raíz con ápice abierto en el diente con tejido necrótico de la pulpa (20).

Antes de 1966 el tratamiento habitual para los dientes necróticos con ápices inmaduros era la extracción (21)(22). Debido a esto surgió un gran interés sobre el tema con la intención de favorecer la conservación de estos dientes, siendo Granath (23) quien describió el hidróxido de calcio para estimular la formación de una barrera apical.

En 1961, Nygaard-Ostby sugirió la laceración de los tejidos apicales para promover el sangrado como medio para el desarrollo futuro apical (24) y Möller (25) mostró que el tejido pulpar necrótico infectado inducía fuertes reacciones inflamatorias en los tejidos apicales. Otros autores proponían que la instrumentación dificultaba el desarrollo radicular y por tanto debía hacerse cuidadosamente (26).

El punto de inflexión ocurre en 1964 cuando Kaiser (27) aprovecha las propiedades osteogénicas del hidróxido de calcio, describiendo una técnica de apicoformación mediante el hidróxido de calcio paraclorofenol alcanforado, la cual se hizo popular con Frank en 1966 (28). El procedimiento consistía en el reemplazo de hidróxido de calcio cada 3 meses hasta que se formase una barrera apical, en un periodo de un año o más. Además McCormick (29) sugirió que el desbridamiento del conducto radicular y la remoción de la necrosis pulpar y los microorganismos junto con una disminución del espacio pulpar, son factores críticos en este procedimiento.

Muchos materiales y procedimientos se han recomendado y utilizado para la inducción de una barrera apical, incluyendo: control de la infección (30), inducir un coágulo

sanguíneo en los tejidos periapicales (31), pastas antibióticas (32), fosfato tricálcico (33), colágeno de fosfato cálcico (34), factores de crecimiento de hueso (34), proteína osteogénica (35), cirugía y sellado retrógrado, obturación con gutapercha, hidróxido de calcio solo o mezclado con varios materiales y más recientemente, la colocación de un tapón apical con MTA (36).

El procedimiento de la apicoformación da lugar al establecimiento de una barrera apical frente a la que se pueda poner el material de obturación. En origen se traba de un tratamiento con aplicaciones múltiples de hidróxido de calcio, dando lugar a la formación de una barrera apical de tejido duro. La desventaja principal de este procedimiento radica en que el hidróxido de calcio reduce la resistencia de la raíz. Además esta técnica requiere múltiples visitas en torno a un periodo de 9 a 20 meses, dejando una raíz corta con paredes frágiles, incrementando el riesgo de fractura de la raíz.

En la actualidad, la apicoformación consiste en aplicar durante un periodo corto de tiempo hidróxido de calcio en el interior del conducto para favorecer la desinfección del mismo y formar una matriz que permita la creación de una barrera artificial con MTA.

La alternativa al hidróxido de calcio mediante el uso de MTA, llegó de la mano de Torabinejad y Chivian (18) en 1999. Este material consiste en un polvo de óxido tricálcico, óxido de silicato y silicato tricálcico. Posee elevado pH y cualidades antibacterianas similares a las de hidróxido de calcio, es biocompatible e induce la formación de tejido duro. Debido a su habilidad para producir un sellado apical inmediato, el MTA ha sustituido al hidróxido de calcio como material de elección en la apicoformación. Sin embargo, no se consigue el desarrollo en grosor y longitud de la raíz.

Si el diente permanente joven presenta una degeneración pulpar extensa o una necrosis total, con signos clínicos y radiográficos de reacción periapical se realizará la apicoformación cuyo objetivo es conseguir un cierre apical para posteriormente realizar el sellado radicular. El inconveniente, es que las raíces quedan cortas y las paredes delgadas, favoreciendo el riesgo de fractura sobre todo a nivel cervical, debido en parte a las paredes delgadas y a las fuerzas que absorbe esta zona.

Una de las ventajas de la revascularización es la mayor probabilidad de aumentar la longitud de la raíz y el espesor de la pared (16).

La **revascularización** se define como la restauración de la vascularización de un órgano o tejido. Hoy día se considera un término debatible. La terminología que podemos encontrar en las publicaciones para describir la maduración de la raíz facilitada por este proceso es variada e incluye “revitalización”, ”revascularización”, “regeneración” y “maturogénesis”(18).

El termino revascularización describe el restablecimiento del suministro vascular de la pulpa de lo dientes permanentes jóvenes. La revitalización describe el crecimiento interno de un tejido que no tiene que parecerse al tejido perdido original. Regeneración es el reemplazo de las estructuras dañadas, incluyendo la dentina y la raíz, así como las células del complejo dentino-pulpar (37). Sin embargo, en la actualidad no podemos confirmar qué tejido rellena el conducto por lo que el término “regeneración” no resultaría indicado (18).

Estudios histológicos han mostrado que los cambios radiográficos en la raíz pueden venir del depósito de tejidos similares al cemento y al hueso (38), sugiriendo crecimiento interno del tejido del ligamento periodontal versus el tejido pulpar. Wang (39) describe evidencia histológica en un estudio con perros de que el aumento de la longitud radicular y grosor se debía a tejidos similares al cemento. Una revisión de Andreasen y Bakland (40) basada en el análisis de mas de 1200 dientes traumatizados y 370 premolares autotransplantados proporciona información sobre resultados, describiendo 4 tipos de resultados de curación:

- Revascularización de la pulpa con la formación acelerada de dentina, dando lugar a la obliteración del conducto radicular.
- Crecimiento interno del cemento y del ligamento periodontal.
- Crecimiento interno del cemento, ligamento periodontal y hueso.
- Crecimiento interno de hueso y medula ósea.

Chen et al (41) describieron 5 tipos de respuestas en dientes que habían recibido tratamiento de endodoncia regenerativa:

- Aumenta la anchura de las paredes radicales y se continúa la maduración de la raíz.
- No hay una continuidad del desarrollo radicular significativa pero el ápice se ve mas cerrado.
- Calcificación severa (obliteración) del conducto.

La hipótesis se basa en que la maduración de la raíz es inducida probablemente por células epiteliales de la vaina de Hertwig remanente o por la diferenciación de células madre de la papila apical remanente o células madre circulantes que se diferencian y pueden madurar. Se ha teorizado acerca de que las células madre dentales residen en la papila apical, el ligamento periodontal, el tejido pulpar vital remanente o incluso en el hueso alveolar, por lo que juegan un papel importante en la maduración de la raíz.

Son diversos los casos clínicos que sugieren interés en los procedimientos de endodoncia regenerativa. Uno de ellos, de Iwaya et al (42) mostró que el NaOCl y el H₂O₂ desinfectaban el tejido necrótico de un premolar inmaduro seguido de medicación intraconducto basada en metronizadol y ciprofloxacino, produciendo la continuidad de la formación de la raíz y evidencia clínica de reinervación. El segundo, por Branchs y Trope (43) mostró un resultado similar en la continuidad del desarrollo radicular y reinervación después de la desinfección del canal con NaOCl y clorhexidina y la colocación de pasta 3-ATB (ciprofloxacino, metronidazol y minociclina). Bukhari et al (44) realizaron un estudio retrospectivo de una series de casos clínicos para investigar los resultados de los procesos de endodoncia regenerativa, en los cuales el protocolo consistió en una instrumentación mínima, irrigación con 3% de NaOCl y 17% de EDTA y colocación de pasta 3-ATB, sustituyendo la minociclina por clindamicina. Los resultados fueron un 75% de pacientes en los cuales se consiguió buena salud periapical y maduración de la raíz, considerando la endodoncia regenerativa como un tratamiento viable en comparación con la apicoformación. Otros autores como Nagata et al (45) realizaron dos protocolos de revascularización diferentes en dientes permanentes jóvenes que habían sufrido un traumatismo. Utilizaron pasta 3-ATB (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) para la mitad de las muestras e hidróxido de calcio con gel de clorhexidina al 2% para la otra mitad. Concluyeron similares resultados clínicos

y radiográficos, con la desventaja de que la pasta 3-ATB suponía un cambio de color en la corona dental.

En cualquier caso, los cambios críticos que tienen que ocurrir para una exitosa regeneración y maduración de la raíz son (19):

- Desinfección del canal.
- Establecer el coágulo en el canal para facilitar el crecimiento de tejido y la diferenciación.
- Sellado apical adecuado.

Es importante destacar que la investigación y los estudios experimentales han identificado muchos de los problemas más importantes de los procedimientos de endodoncia regenerativa, aunque los estudios de casos publicados hasta la fecha aún siguen siendo métodos de revascularización. Por tanto, es un periodo de cambios en el desarrollo de esta clase de procedimientos (14).

Células madre, factores de crecimiento y armazones.

Para aplicar los principios de la ingeniería tisular al desarrollo de los procedimientos de endodoncia regenerativa se requiere investigar el ensamblaje en el espacio de distintas células madre, factores de crecimiento y armazones; para dar lugar al complejo pulpo dentinario funcional.

Células madre.

Como se citó anteriormente, la pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo innervado y vascularizado rodeado por una capa de odontoblastos. Las células madre mesenquimatosas de la pulpa se localizan en la región perivascular y zona de Hohl, adyacente a dicha capa de odontoblastos. Se ha considerado que ambas estructuras sirven como fuentes de células para la sustitución de odontoblastos. Sin embargo, son escasos los conocimientos que se tienen sobre la regeneración del tejido conjuntivo laxo, por lo que las investigaciones principales se centran principalmente en la generación de la capa circundante de odontoblastos (46).

Se han descrito al menos cinco tipos de células madre mesenquimatosas posnatales capaces de diferenciarse en células similares a los odontoblastos. Éstas son las células madre de la pulpa dental (DPSC, dental pulp stem cells), las células madre de los dientes deciduos humanos exfoliados (SHED, stem cells of human exfoliated deciduous teeth), las células madre de la papila apical (SCAP, stem cells of the apical papilla), las células progenitoras de los folículos dentales (DFPC, dental follicle progenitor cells) y las células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea (BMMSC, bone marrow derived mesenchymal stem cells). La mayor parte de los estudios se han realizado en pacientes menos de 25 años de edad, pero cabe destacar que las células madre multipotenciales se han extraído también de pulpas de pacientes de mediana edad. A día de hoy no se han realizado estudios sobre la formación de células tipo odontoblasto en pacientes mayores de 50 años de edad (47).

Por otro lado, llevar a cabo la identificación de una célula diferenciada como odontoblasto no es un proceso sencillo, dado que se trata de una célula similar al osteoblasto en la formación de nódulos mineralizados y en la expresión de varias proteínas como sialoproteína de dentina (DSP). Es importante saber que los estudios moleculares han identificado muchos de los genes expresados selectivamente en los odontoblastos, lo cual ayudará en un futuro a identificar las condiciones necesarias para que células mesenquimatosas de orígenes distintos se diferencien en odontoblastos verdaderos (1)(17).

Factores de crecimiento.

Varios factores de crecimiento son capaces de desencadenar la diferenciación de poblaciones de células madre mesenquimatosas en células tipo odontoblastos.

Las implicaciones clínicas inmediatas que se han observado en relación a los factores de crecimiento son (48):

- Es improbable que un factor de crecimiento aislado provoque la diferenciación máxima, por lo que es posible que sea necesario usar combinaciones de factores de crecimiento para su evaluación en estudios clínicos.
- Se ha demostrado que medicación del tipo de las estatinas favorecen la diferenciación a un fenotipo similar a los odontoblastos.

- El hueso humano desmineralizado parece contener una combinación natural de factores de crecimiento y soportes adecuados que proporciona el entorno apropiado para la diferenciación o función de los osteoblastos. Se ha observado que la dentina humana desmineralizada proporciona un efecto beneficioso significativo para la diferenciación de células tipo odontoblasto. De las proteínas colágenas que posee, es notable que el factor $\beta 1$ transformante del crecimiento sea el único subtipo factor de crecimiento transformante (TGF) detectable en la dentina humana. Además la aplicación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) acelera en gran medida la exposición de TGF- $\beta 1$ en la dentina humana, siendo menor su liberación tras el tratamiento con hidróxido de calcio, hipoclorito sódico (NaOCl), agregado de trióxido mineral (MTA) o ácido cítrico (17).

En conjunto, estos datos indican que los estudios futuros sobre regeneración clínica deberán evaluar si la irrigación con EDTA de las paredes de dentina antes de un procedimiento regenerativo endodóntico da lugar a mejores resultados clínicos.

Almacén.

Un componente importante en la ingeniería de los tejidos es el soporte físico. Sabemos que las moléculas de la matriz extracelular controlan la diferenciación de las células madre. Del mismo modo, el almacén adecuado podría unirse y localizar selectivamente las células apropiadas, contener factores de crecimiento y someterse a biodegradación con el tiempo. En este punto, el almacén constituye mucho más que una simple rejilla que contiene las células.

Los almacenes se clasifican en naturales o sintéticos. Ejemplos de almacenes naturales son el colágeno, los glucosaminoglicanos, la matriz de dentina desmineralizada o nativa y la fibrina. Desde la perspectiva de las aplicaciones clínicas, el plasma rico en plaquetas (PRP) satisface varios de estos criterios. Se caracteriza por ser un material autólogo, bastante fácil de preparar en el entorno dental, rico en factores de crecimiento, se degrada con el tiempo y constituye una matriz de fibrina tridimensional. Sin embargo, se necesitan más estudios para validar estos procedimientos.

Otra alternativa a considerar la forman aquellos basados en materiales sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico-

coliglicólico (PLGA), la poliepsilon caprolactona, hidroxiapatita /fosfato tricálcico, las biocerámicas e hidrogeles como alginato o variantes del polietilenglicol (PEG) (7)(17)

Se ha observado que la combinación de armazones con determinados factores de crecimiento parece ser una combinación importante para la generación óptima de células tipo odontoblasto. Por ello es un terreno fundamental de la investigación para el desarrollo de la endodoncia regenerativa como un procedimiento de posible aplicación clínica.

Sistema de liberación.

A pesar de seleccionar la fuente celular más adecuada, y los mejores factores de crecimiento y armazón, la mezcla resultante deberá liberarse siguiendo un modelo espacial apropiado para el sistema de conductos radiculares. Si hubiera que inyectar células siguiendo la extensión corono-apical de los conductos radiculares, la inmensa mayoría de las células deberían sucumbir a la hipoxia tisular. Como alternativa, se sugiere una mezcla de células, armazón y factores de crecimiento a 1 mm apical del sistema de conductos radiculares para después “rellenar” con una combinación de armazón/factores de crecimiento. Como la pulpa dental se aproxima a un núcleo de tejido conjuntivo laxo rodeado por una capa de odontoblastos, la distribución espacial de las células y factores de crecimiento dentro del soporte pueden ser muy importantes para favorecer la odontogénesis sin que se produzca la calcificación completa del sistema de conductos radiculares (17). Aún así, esta línea de investigación tiene aun mucho camino por recorrer.

Protocolo de revascularización.

Actualmente no existe un protocolo estandarizado con suficiente evidencia clínica para llevar a cabo un tratamiento de revascularización, siendo necesario tener en cuenta diversas consideraciones. En primer lugar es importante seleccionar los casos. Las mejores evidencias de las que se dispone en este momento indican que este tratamiento debe usarse en el diente permanente con desarrollo incompleto que tiene un ápice abierto y muestra signos evidentes de necrosis pulpar. La etiología de la necrosis pulpar (trauma, anomalías dentales o caries) no parece ser un factor importante en la selección del caso. El objetivo último de este abordaje es desarrollar un método basado en la

ingeniería tisular para la regeneración de la pulpa en el diente permanente completamente desarrollado, pero actualmente no hay estudios que soporten esta línea.

Haciendo un seguimiento de los casos clínicos descritos en los últimos años, todos tienen en común (37):

- Pacientes jóvenes (6-18 años).
- Dientes permanentes con ápices inmaduros.
- Instrumentación mínima o inexistente del conducto radicular.
- Colocación de un medicamento intraconducto.
- Colocación de un material que permita el sellado hermético al finalizar el tratamiento.

Los puntos más variados entre estudios son habitualmente los siguientes:

- Tipo y concentración de los irrigantes (1,25-5,25% NaOCl con o sin el uso de 3% peróxido de hidrógeno).
- Tipo y concentración de medicación intraconducto (3ATB, 2ATB, hidróxido de calcio).
- Numero de visitas y periodo de tiempo entre cada una de ellas (hasta 3 meses).
- Creación de un coagulo sanguíneo frente al uso de otro artificial (p.e: plasma rico en plaquetas).
- Tipo de barrera pulpar.
- Restauración final.

Teniendo en cuenta todos los estudios preclínicos existentes, la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) creó un documento titulado “*Considerations for Regenerative Procedures*”(37), con el fin de recopilar todos los datos disponibles hasta ese momento y establecer las recomendaciones para poder tomar la mejor decisión clínica en este tipo de procedimientos. Teniendo en cuenta el avance rápido y continuo en este campo, es necesario revisar los nuevos hallazgos a medida que estén disponibles.

Previo al tratamiento es fundamental la elaboración de un *consentimiento informado*, el cual debe ser firmado por los tutores de legales del paciente. Hay que hacerles saber que este procedimiento es relativamente nuevo y aún no tiene una guía con suficiente evidencia clínica. Se incluirá el número de citas (mínimo dos), los posibles efectos indeseables (principalmente la tinción con minociclina de la corona), la posible ausencia de respuesta al tratamiento, así como tratamientos alternativos y posibles síntomas post-tratamiento.

Se han descrito alergias después de la administración de estos antibióticos (49)(50), por lo que debemos preguntar al paciente y a los padres por ello, para evitar el uso de uno u otro antibiótico si fuese necesario.

La decoloración se ha descrito en numerosos estudios después de los procedimientos de endodoncia regenerativa a causa de la minociclina (51) y del uso del MTA (51)(52), por lo que también habrá que informar la posibilidad de tinción con el uso de estos materiales.

Hay que informar también de la posibilidad de sentir dolor y/o hinchazón después del procedimiento, así como de las otras opciones de tratamiento posibles (apicoformación, no tratamiento y extracción).

La endodoncia regenerativa consiste en 3 fases clínicas principales (19):

- Desbridamiento del canal y colocación de la pasta tri-antibiótica.
- Estimulación del sangrado y colocación de una base.
- Restauración del diente al paso de los días.

A continuación se describe un ejemplo de protocolo de revascularización tras la revisión de casos clínicos sobre ello (16)(19)(53):

Selección del caso: dientes con pulpa necrótica y ápices inmaduros. La etiología de la necrosis pulpar es variada, siendo la mas frecuente por trauma, animalias dentales y caries. Se recomienda que el espacio pulpar no precise la colocación de poste ya que habrá que colocar un material que actúe de barrera durante el procedimiento, eliminando el uso de este espacio para la retención. Debido a que se precisan múltiples visitas es necesario una buena colaboración de los padres y del paciente.

En la **primera cita** se debe recopilar una correcta información clínica y establecer los diagnósticos pulpares y perirradiculares. Además se le deben describir al paciente o a su tutor los beneficios, alternativas y riesgos del tratamiento. Después de obtener el consentimiento informado, se anestesia el diente, se aísla y se realiza el acceso. Se debe instrumentar lo mínimo posible, siendo importante utilizar una lima “exploratoria” y determinar la longitud de trabajo.

Cuando se elige un agente de desinfección, hay que sopesar entre la necesidad de eliminar la infección y la importancia de mantener vitales las células madres perivasculares, localizadas en nichos en la papila apical (54,55).

La irrigación debe ser cuidadosa y abundante. Debido a la inmadurez del ápice, se debe llevar cuidado en que no se extruya el irrigante en el espacio apical, introduciendo la aguja de forma que quede a 3 mm del ápice. La desinfección del conducto se basa principalmente en los irrigantes químicos, por lo que es primordial llevar la aguja al tercio apical e irrigar con agujas con el extremo obturado y un orificio lateral, junto con una velocidad de infusión lenta para reducir la cantidad de irrigante que entre a través del vértice abierto.

El uso de agujas con extremos cerrados, así como EndoVac® se ha observado que disminuyen el riesgo de extrusión del irrigante comparado con las agujas convencionales (56).

Si durante el procedimiento existiera sensibilidad dentro del sistema de conductos, podría indicar que queda algún tejido vital residual dentro de la pulpa.

El sistema de conductos radiculares se irriga abundante y lentamente con 20ml de NaOCl durante 5 minutos, seguido de manera opcional de 20ml de clorhexidina (CHX) al 0,12%-2%.

Aunque NaOCl tiene una acción antimicrobiana favorable, es citotóxico para las células madre (57), en consecuencia la AAE recomienda concentraciones bajas del mismo (NaOCl al 1,5%). La clorhexidina es también citotóxica con células madre (58), por lo que su uso debe ser limitado o evitarse. Si se usan en combinación NaOCl y CHX, es conveniente irrigar con agua estéril o salina entre aplicaciones.

La AAE (37) recomienda no instrumentar en la primera cita ya que el tejido necrótico no infectado puede servir de matriz, junto con el coágulo para la migración y diferenciación celular.

Posteriormente al uso del NaOCl, se aconseja irrigar con suero salino o con EDTA (20ml/conducto durante 5 minutos), posicionando a 1mm la jeringa para minimizar el posible efecto citotóxico.

A continuación el sistema de conductos radiculares se seca con puntas de papel estéril y se introduce el medicamento antimicrobiano en el espacio del conducto de la raíz. Las mejores evidencias existentes se basan en el uso de la pasta tri-antibiótica o hidróxido de calcio, siendo ambos eficaces para este procedimiento.

Elevadas concentraciones de 3ATB tienen un efecto negativo en la supervivencia de células madre, por ello es prudente usar concentraciones diluidas de ATBs (0,1mg/ml). El uso de 3ATB o de hidróxido de calcio es óptimo, pero se necesitan más investigaciones para determinar formulaciones adecuadas de los mismos (37).

Una vez introducido el medicamento antimicrobiano, sellamos el diente con un algodón estéril y una obturación temporal y se cita al paciente en 3-4 semanas.

En la **segunda cita** se valora la resolución de signos o síntomas de infección aguda (tumefacción, dolor, tracto sinusal, etc.) que pudieran haber estado presentes en la primera cita. El tratamiento antimicrobiano se repite si no se ha resuelto el cuadro, cosa que es poco frecuente. En esta cita se lleva a cabo la inducción de la hemorragia que producirá la revascularización, por lo que el diente no deberá anestesiarse con un anestésico local con vasoconstrictor, pudiéndose usar mepivacaina al 3% que facilitará la capacidad de provocar la hemorragia en el sistema de conductos. A continuación, se aísla y facilita el acceso coronal, se irriga el diente de manera lenta y abundante con 20ml de NaOCl, junto a una agitación suave con una pequeña lima manual para eliminar el medicamento antimicrobiano.

Debido a que los irrigantes como NaOCl y CHX pueden ser tóxicos para las células madre y pueden también inhibir la habilidad de las mismas para adherirse a la dentina, hay estudios que prefieren evitar su uso en etapa, apostando por la irrigación con solución salina estéril (59).

Tras secar el sistema de conductos con puntas de papel estéril, se introduce una lima unos mm por debajo del foramen apical y se lacera el tejido apical con sangrado hasta 3mm desde la unión cemento-esmalte (UCE). Si el sangrado no se produce, puede ser necesario sumergir el explorador o la lima en EDTA (20ml/canal) al 17% para prevenir la coagulación de la sangre. El EDTA expone las fibras de colágeno en la superficie dentinaria, lo cual puede ayudar a la adhesión de nuevas células. Si el sangrado sigue sin suceder, puede ser necesario colocar más antimicrobiano en el canal en un intento de lograr una cura adicional y tejido de granulación.

El coágulo sanguíneo puede servir como matriz para el crecimiento de nuevo tejido así como una fuente de crecimiento de factores de diferenciación. Puede tardar en torno a 15 minutos en producirse un coágulo estable. Alternativas al coágulo sanguíneo son el plasma rico en plaquetas (PRP) y matriz autóloga de fibrina (APM). El principal inconveniente del uso de ambos es que se necesita una extracción de sangre. Hay autores que mencionan que se puede lograr la continuación del desarrollo radicular en casos en los que no fue posible lograr un coágulo sanguíneo en el conducto (60). Esto sugiere que aunque el coágulo aumenta la probabilidad de resultados favorables, puede no ser necesario.

Se puede introducir un fragmento que sirva como matriz reabsorbible que limitará la sobreextensión de la barrera en el espacio pulpar. Es en este punto, donde se introducen unos 3-4 mm de MTA seguido por una restauración. El MTA tiene numerosas ventajas sobre otros materiales debido a su biocompatibilidad y propiedades conductivas e inductivas.

Se volverá a citar al paciente a los 12-18 meses para realizar el examen clínico y evaluar radiográficamente el desarrollo radicular. El examen clínico debe revelar que no hay síntomas de dolor a la percusión y palpación y que no haya hinchazón de tejidos blandos o del tracto sinusal. En la radiografía debemos ver lo siguiente:

- Resolución de la radiolucidez apical si estaba presente antes del tratamiento.
- Aumento de la anchura de las paredes radiculares.
- Aumento de la longitud radicular.

El objetivo del tratamiento no quirúrgico del conducto radicular es mantener o restaurar la salud de los tejidos perirradiculares. Además se consigue la recuperación del tejido vital, que facilita el desarrollo continuado de la raíz en aquellos casos de dientes permanentes inmaduros necróticos. La medición del éxito de este procedimiento se basa en indicios radiográficos de la salud perirradicular y clínicos de tejido vital funcional en el interior del conducto. El resultado clínico ideal es un diente asintomático que no requiere retratamiento, pero para validar que las técnicas de endodoncia regenerativa son realmente eficaces es esencial usar métodos no subjetivos de valoración de la vitalidad.

Merece la pena hacer notar que en los casos de revascularización publicados se demuestra un aumento del espesor de la pared de la raíz limitado a las zonas media y apical de la misma. No se ha demostrado que aumente el espesor de la zona cervical, una zona que es propensa a la fractura del diente inmaduro con antecedentes de traumatismo y el consiguiente tratamiento endodóntico. Los estudios clínicos futuros deberán centrarse en la extensión de la revascularización hasta la zona cervical, para reforzarla y disminuir el riesgo de fractura de la raíz.

Jung et al (61) apoya que la técnica de endodoncia regenerativa ha sido introducida para permitir que aumente la longitud y anchura de las raíces de dientes inmaduros reduciendo el riesgo de fractura que iba asociado a los procedimientos de apicoformación tradicionales.

La probabilidad de éxito de dientes con ápices inmaduros esta relacionada con el tamaño de la apertura apical que permita el crecimiento interno de la vascularización y las células madre (37).

1.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS.

El éxito de un tratamiento endodóntico depende de numerosos factores, siendo el más importante la reducción o eliminación de la infección bacteriana (62). Sólo con la instrumentación no es posible eliminar por completo los microorganismos de las paredes del conducto radicular, siendo necesario el uso de irrigantes y medicamentos adicionales.

Existen diversos estudios realizados para identificar qué especies bacterianas están presentes en dentición permanente joven con necrosis pulpar y lesión periapical (63)(64). Se ha demostrado la presencia de una infección de carácter polimicrobiano con el predominio de especies de anaerobios estrictos y estreptococos.

Antibióticos: pasta tri-antibiótica.

La pasta tri-antibiótica fue descrita por Hoshino et al en 1996 (65). Ha sido desarrollada como una forma novedosa de tratar los dientes permanentes jóvenes necróticos, facilitando el procedimiento y mejorando los resultados clínicos. La pasta tri-antibiótica consta de dos partes fundamentales de consistencia polvo y líquido. El polvo está formado por una combinación de tres antibióticos, los cuales son: metronidazol, ciprofloxacina y minociclina. La parte líquida está compuesta por propilenglicol y/o macrogol, que actúan como vehículo transportadores de los antibióticos.

Algunas variaciones son la pasta 2-ATB que es una combinación de metronidazol y ciprofloxacino que pretende evitar el cambio de color que produce la minociclina (66)(67).

Otros autores proponen sustituir la minociclina por otro antibiótico para así evitar los efectos secundarios de la misma, entre los que destaca el cambio de color. Por ejemplo, Chen (68) realiza un estudio en dientes permanentes jóvenes de 35 niños aplicando una mezcla de 250mg de ciprofloxacino, 250 mg de metronidazol y 150 mg de clindamicina; siendo esta última una alternativa aceptable a la minociclina ya que posee el mismo efecto antibacteriano (69)(70).

Metronidazol

El metronidazol junto con los nitromidazoles relacionados constituyen un grupo de antibióticos con actividad *in vitro* frente a una amplia variedad de parásitos protozoarios anaerobios. Presenta actividad antibacteriana contra todos los cocos anaerobios y bacilos gramnegativos anaerobios, incluidas especies bacteroides y bacilos grampositivos esporógenos anaerobios. El metronidazol ejerce su efecto bactericida al inhibir la síntesis de ácidos nucleicos en los microorganismos obligadamente anaerobios, independientemente de la fase de crecimiento bacteriano. Se absorbe por vía oral (aproximadamente el 80%), atraviesa la placenta y la barrera hematoencefálica. Su

unión a proteínas plasmáticas es baja (10-20%). Su tiempo de vida media es de ocho horas. Se metaboliza principalmente en el hígado. Un 60-80% de la dosis se elimina por vía renal, la mitad como metronidazol y el resto como metabolitos. En cuanto a los efectos adversos los más comunes son cefaleas, náuseas, xerostomía y un gusto metálico e incluso a veces surgen vómitos o diarreas.

Se ha descrito que el metronidazol presenta un amplio espectro de acción bactericida frente a anaerobios facultativo o microaerófilos causantes de las infecciones de origen dentario (71).

Ciprofloxacino

Posee buena actividad contra enterobacterias como *E.coli*, *Kelibseilla*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus*. Entre los grampositivos destaca la acción contra *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermis* y *Staphylococcus saprophiticus*. Su eficacia contra cocos grampositivos es menor que la de los betalactámicos y macrólidos. Los anaerobios *Bacteroides fragilis*, *Clostridium*, *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* son todos resistentes.

Las quinolonas y especialmente el ciprofloxacino ha sido utilizada en infecciones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico. La alta incidencia de aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* en estas lesiones periapicales recidivantes y la resistencia mostrada frente a penicilinas, carbenicilina y metronidazol motivaron la utilización con éxito del ciprofloxacino, obteniendo semejantes resultados frente a *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Kleibsella* (17).

Minociclina

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro; actúan frente a una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas anaerobias y aerobias. Además son eficaces contra algunos microorganismos resistentes a antimicrobianos activos contra la pared bacteriana.

Las tetraciclinas son activas contra muchos microorganismos anaerobios y facultativos, su actividad tiene particular importancia contra *Actinomyces*. Los tratamientos

prolongados con este fármaco facilitan el desarrollo de cepas resistentes al mismo, en concreto bacterias grampositivas, después de cuatro semanas de tratamiento .

El uso prologando de tetraciclinas ocasiona efectos sobre huesos y tejido dentario, ya que se depositan en los huesos y dientes del feto, lactantes y niños hasta los ocho años de edad. Durante la infancia la acumulación de tetraciclinas imprime a los dientes un color amarillento que con el tiempo evoluciona a marrón. Consecutivamente puede existir hipomineralización, y por tanto mayor propensión a la caries dental.

Una de las principales desventajas descritas en el uso de la minociclina como medicamento de la pasta tri-antibiótica es la decoloración que produce en la corona (16)

La capacidad de tinción de las tetraciclinas varía según la afinidad por distintos tejidos, encontrando sus pigmentos sobre todo en aquellos que son ricos en colágeno como huesos, dientes o cicatrices.

No es del todo conocido el mecanismo de acción por el que se produce la tinción de las tetraciclinas, pero parece deberse a la formación de una estructura semejante a las quinonas en un proceso de oxidación. Estudios in vitro y en animales de experimentación han conseguido disminuir o eliminar esa tinción añadiendo un antioxidante, como por ejemplo el ácido ascórbico y la vitamina E (72).

Algunos autores aconsejan la sustitución de la minociclina por otro fármaco que no altere el color de la corona dentaria como es el caso de Thomson (73) el cual sustituyó la minociclina por amoxicilina o Cehreli et al (74) quienes utilizaron hidróxido de calcio en lugar de pasta triantibiótica en un estudio sobre seis molares.

Otros autores recomiendan agregar un adhesivo para sellar los túbulos dentinarios de la cámara pulpar antes de colocar la pasta triantibiótica y así disminuir su efecto colorante, pero se ha observado que aunque la tinción se reduce ligeramente no se evita y además se ve comprometida la esterilización de los conductos (75,76).

Clindamicina

La clindamicina se ha propuesto por la AAE como alternativa a la minociclina a consecuencia de la tinción que ésta última produce (77). Es un antibiótico de amplio espectro con actividad contra los aerobios grampositivos y una extensa gama de

bacterias anaerobias, entre ellas los patógenos productores de betalactamasa. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que este fármaco alcanza una concentración elevada en el punto de infección, reduce la virulencia de las bacterias y refuerza las actividades fagocíticas de los linfocitos inmunitarios del huésped (69)(17).

Preparación de la pasta tri-antibiótica:

Hoshino et al llaman pasta triantibiótica (3Mix-MP) a la combinación de: ciprofloxacino (200mg), metronidazol (500mg) y minocilina (100mg). El vehículo que usaron fue el propilenglico y el macrogol (MP) (57). Otros autores como Kim et al usan solución salina estéril (78), mientras que González et al lo hacen con agua destilada (79).

El protocolo de preparación propuesto por Hoshino et al es el siguiente (80):

- Triturar individualmente en morteros distintos, moliendo cada antibiótico en un polvo fino y luego se mezclan en cantidades iguales (1:1:1) en una loseta de mezcla.
- El vehículo se mezcla en cantidades iguales de macrogol y propilenglicol (1:1) y debe verse opaco, de lo contrario puede haberse contaminado de humedad.

Según la consistencia requerida se debe separar la 3Mix e incorporar el MP de la siguiente forma:

- Relación 1:5 (MP:3Mix), para obtener consistencia cremosa.
- Relación 1:7 (MP: 3 Mix), para una mezcla estándar.

Respecto a la proporción de antibiótico, determinaron que 25ug/mL de cada antibiótico son eficaces en la esterilización de la dentina de la raíz infectada *in vitro*. En general se ha observado que concentraciones entre 0,1mg/ml y 2mg/ml de cada antibiótico son eficaces para inhibir la infección bacteriana (37).

Hidróxido de calcio.

El hidróxido de calcio (CaOH_2) es una sustancia ampliamente usada en endodoncia desde su introducción en 1920. Sus propiedades para controlar la inflamación junto con su actividad antimicrobiana, lo convierten en un medicamento aconsejable para su uso

tópico entre sesiones o como componente de materiales de obturación. Posee numerosas propiedades beneficiosas entre las que destacan la eliminación de los microorganismos que pueda persistir en los conductos radiculares tras su desinfección o la reducción de la inflamación de los tejidos periapicales, entre muchas otras.

El hidróxido de calcio ha sido utilizado también de manera exitosa para la desinfección de los conductos radiculares en tratamiento de revascularización pulpar. Aunque los estudios realizados con este material no son excesivos, en algunos se demostró que la colocación durante tres semanas de hidróxido de calcio en el tercio coronal del conducto radicular, dio lugar a una adecuada desinfección sin afectar negativamente al futuro desarrollo de la raíz (81).

Tras utilizarse como agente de desinfección, ha demostrado ausencia de síntomas clínicos, evidencia radiográfica de salud periapical, un progresivo engrosamiento de las paredes dentinarias y un desarrollo apical continuado. Hay que tener en cuenta que el hidróxido de calcio posee un elevado pH (aproximadamente 12,5) lo que le otorga un potencial tóxico para las bacterias pero también para las células humanas. Sin embargo posee numerosas propiedades biológicas favorables, tal y como se citó anteriormente. Es capaz de disolver el tejido necrótico del conducto radicular y puede inducir el cierre apical mediante la formación de tejido duro. Además actúa como una barrera físico-química que evita la proliferación de posibles microorganismos residuales y previene la re-infección de los conductos radiculares (16).

El hidróxido de calcio utilizado en endodoncia está compuesto por una parte polvo, un vehículo y un radiopacificador opcional.

El hidróxido de calcio tiene un pH de 11,8 aprx, siendo una molécula altamente alcalina y de pequeño tamaño. Por ello penetra en la malla de fibras de colágeno mineralizadas y puede causar cambios en la conformación tridimensional del tropocolágeno, disminuyendo el módulo elástico y la microdureza de la dentina.

Irrigantes y solventes.

Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es el irrigante más habitual debido a su amplio espectro antimicrobiano y su capacidad para disolver los remanentes del tejido necrótico pulpar. Además, tiene una actividad oxidativa y proteolítica inespecífica, y oxida y desnaturaliza el contenido del colágeno de la *smear layer* de los conductos radiculares.

Es una fuerte base. Su valor de pH disminuye liberando iones hidroxilo, formando agua y sal cuando se expone a aminoácidos. También el ácido hipocloroso actúa como solvente cuando se encuentra con el contenido orgánico. Los iones hidroxilos y el ácido hipocloroso conducen a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos (82)

La mayor controversia que se genera con el NaOCl es acerca de qué concentración y tiempo de exposición se debe aplicar. Sauro (83) descubrió que NaOCl al 12% no podía hacer una completa desproteinización de la dentina grabada en un periodo de 120 segundos; mientras que Marshall (84) encontró que NaOCl al 6,5% removía la mayor parte del colágeno dentinario a los 120 segundos. Zhang et al (82) sugieren que la remoción de la fase orgánica de la dentina mineralizada es concentración y tiempo dependiente. Sin embargo Hu et al (85) indica que los distintos tiempos de exposición de NaOCl con la misma concentración no influyen en su efecto de desproteinización de la dentina.

Estas diferencias se atribuyen a distintos métodos y diseños de estudios.

EDTA

El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) es un agente quelante inorgánico usado durante la instrumentación de conductos radiculares y como complemento para remover la capa de *smear layer*. En el tratamiento del sistema de conductos radiculares la sal disódica de EDTA es generalmente aceptada como el más efectivo lubricante y agente quelante (86).

Bystrom et al (87) demuestran una mejor acción antibacteriana cuando utilizan una mezcla de hipoclorito de sodio y EDTA, comprobando que si éstas dos sustancias se utilizan alternadamente entre cada instrumento, el conducto estará libre de restos desbridados. La combinación de ambas soluciones demostró un efecto muy importante en la remoción de materia orgánica e inorgánica del lumen del conducto.

En estudios realizados por Abbott (88) se demostró que la combinación de hipoclorito de sodio y EDTA produce un aumento de la permeabilidad de la dentina optimizando la entrada de la medicación intraconducto.

Otro de los aspectos importantes en todo material utilizado en la práctica endodóntica es la citotoxicidad. En un estudio in vitro, se evaluó la citotoxicidad de varios agentes de irrigación entre ellos el EDTA en diferentes concentraciones y el hipoclorito de sodio, concluyendo que ambos presentan una citotoxicidad moderada, si pasan al periápice (89).

Propilenglicol

Es un alcohol dihídrico, que presenta gran potencial para actuar como vehículo en el tratamiento de conductos radiculares. Consiste en un líquido incoloro, viscoso e higroscópico. Las propiedades físicas del propilenglicol ($\text{CH}_3\text{CH-OH-CH}_2\text{OH}$) son similares a las de etilenglicol, pero mucho menos tóxico. Es por ello que ésta sustancia se utiliza como solvente en farmacología, cosméticos, lociones y ungüentos; en productos alimenticios; en el intercambio calórico y en líquidos hidráulicos (90).

Se ha considerado por el Consejo de Farmacia y Química de la Asociación Médica Americana como un constituyente inofensivo para productos farmacéuticos, particularmente cuando se administra por un periodo de tiempo limitado. Además su actividad antimicrobiana ha sido demostrada, siendo utilizado en procedimientos de endodoncia; siendo también un constituyente del detector de caries (91). Sin embargo aun hay escasos estudios que determinen la extensión de la penetración del propilenglicol en la difusión a través del sistema de conductos radiculares.

Existen efectos adversos asociados al propilenglicol tales como irritación de las vías aéreas, pero es interesante remarcar que todos ocurrían a consecuencia de una ingesta excesiva de un producto que contuviera dicho líquido. Basándonos en datos de citotoxicidad, el uso de propilenglicol cuando se administra en pequeñas cantidades, no produce ningún efecto deletéreo .

Olitzky demostró que soluciones concentradas de propilenglicol tienen una eficacia germicida muy marcada y por ello su uso como vehículo supone un gran potencial en la prevención o tratamiento de infecciones microbianas. Debido a sus propiedades

higroscópicas que permiten la absorción de agua, resulta ser una sustancia útil para la liberación de medicamentos intraconducto por periodos prolongados (92).

Agua destilada

Es uno de los vehículos más comunes para el transporte de medicamentos en el interior de los conductos radiculares y puede utilizarse como alternativa al propilenglicol. Es una sustancia acuosa de elevada viscosidad y tensión superficial, que da lugar a un elevado grado de solubilidad cuando la pasta entra en contacto directo con el tejido, dando lugar a una rápida solubilización resorción por los macrófagos.

Se ha descrito que cuando se utiliza como vehículo para el hidróxido de calcio, hay posibilidad de que ocurra una rápida carbonatación del mismo al combinarse con el dióxido de carbono atmosférico o por el que se genera a causa de la descomposición del tejido dando lugar a la formación de carbonatos que no poseen ningún valor terapéutico. Este hecho no es favorable clínicamente, porque puede retrasar la resolución de la infección (93).

1.4 TÉCNICAS PARA VALORAR LA ESTRUCTURA DEL DIENTE.

Mecánicas.

Microdureza

Es un método que mide la resistencia de un material a la deformación plástica o a la penetración de un indentador. La huella producida por este método es tan pequeña que se observa con la ayuda de un microscopio óptico para ser medida y cuantificada.

La valoración de la microdureza supone una técnica no destructiva que relaciona los valores obtenidos con características estructurales. Entre los diversos ensayos que se utilizan destacan el de Vickers y Knoop, en los cuales se utiliza un diamante en forma piramidal y la dureza viene dada en función del tamaño de la huella (94).

La técnica consiste en la penetración de un diamante piramidal tetraédrico con ángulo entre aristas de 136° en la superficie que se ensaya (Figura 1). Se expresa por el valor numérico de la dureza, que se obtiene dividiendo la carga (kgf) entre la superficie lateral de la huella (mm^2) calculada por las diagonales. En el caso de la escala Vickers, el valor numérico de la dureza se calcula por la fórmula de la Figura 2.

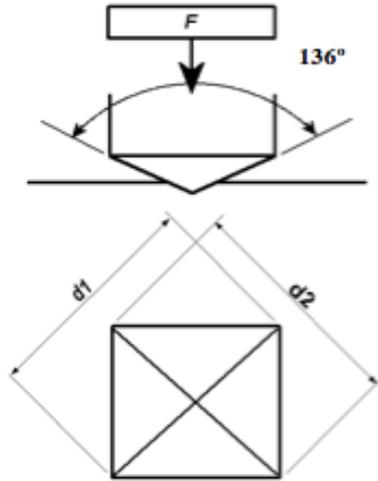


Figura 1. Esquema del indentador y hexágono producido tras la huella.

$$H_v = \frac{2P \operatorname{sen} \alpha / 2}{d^2} = \frac{1,8544P}{d^2}$$

Figura 2. Fórmula para determinar la dureza Vickers.

- H_v = dureza vickers.
- P = carga sobre el diamante piramidal, en kgf.
- α = ángulo entre las aristas de diamante piramidal opuestas, en grados.
- d = medida aritmética que resulta de ambas diagonales de la huella después de eliminada la carga, en mm.

Químicas.

Las técnicas espectroscópicas son utilizadas habitualmente para caracterizar moléculas y reacciones químicas. Se basan en la “huella” espectral que producen los compuestos, siendo técnicas muy selectivas para identificar materiales.

Los métodos de espectroscopia vibracional usan infrarrojos para crear vibraciones en los materiales químicos. La radiación que causa la vibración es absorbida y se crean unos picos correspondientes o bien a un espectro Infrarrojo o a uno Raman.

Microscopio electrónica de barrido SEM-EDX.

Técnica en la cual el barrido de una muestra con un haz de electrones permite obtener imágenes, en blanco y negro, de alta resolución, que posibilitar estudiar detalles de su

morfología. A través de rayos X (EDS o EDX, del inglés *Energy Disperser Spectrometrer*) se obtiene el análisis elemental de la superficie.

Técnica de infrarrojos por transformador de Fourier (FTIR).

La técnica por infrarrojos mide la absorción de luz por moléculas específicas usando una fuente de luz de banda ancha

Cuando la radiación de infrarrojos alcanza una muestra, parte de la radiación es absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa (se transmite). La señal resultante en el detector es un espectro característico de la muestra.

En esta técnica se mide la absorción de luz por parte del material a través de un rango de longitudes de onda ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) que corresponden a modos fundamentales de vibraciones moleculares.

Posee una excelente selectividad molecular, así como una fuerte absorción. Sus principales desventajas, por otro lado, están relacionadas con esa sensibilidad extremadamente alta que obliga a utilizar cantidades ínfimas de muestra, y a que en general se requiere mucha preparación de muestra. Para mediciones por transmisión se suelen usar el método de la pastilla de bromuro de potasio, el método del nujol y celdas selladas en el caso de líquidos. Para mediciones por reflexión se usan los métodos de reflectancia difusa (DRS) y de reflectancia total atenuada (ATR). Con pocas excepciones, la muestra debe estar en contacto directo con el instrumento, y con los métodos de reflectancia sólo se investigan unos pocos micrones del material desde la superficie, por lo cual es imposible la medición a través del contenedor de la muestra (95).

Espectroscopia Raman.

A diferencia de FTIR, que implica la absorción de radiación infrarroja, en la espectroscopía Raman se mide la dispersión de luz. En ella se mide la intensidad y frecuencia de fotones que se dispersan en el material al ser irradiado con luz láser monocromática de alta intensidad (típicamente 785 nm). Es efectiva en el rango de $250\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$, al medir el desplazamiento de la longitud de onda de la luz dispersada respecto a la incidente (desplazamiento Raman).

Al igual que FTIR, la técnica Raman investiga modos de vibración fundamentales, resultando en una excelente selectividad molecular; sin embargo, Raman es una técnica mucho más atractiva en términos de conveniencia del muestreo, ya que puede utilizarse fácilmente sin necesidad de entrar en contacto con el material, a través de diversos materiales contenedores tales como vidrios y plásticos (96).

La técnica Raman posee algunas ventajas frente a la técnica de infrarrojos. Raman está libre de la interferencia debida a bandas de agua, que en cambio dominan los espectros FTIR. Las señales se emiten en forma de luz dispersada y se pueden observar en todas las direcciones, a diferencia de la disposición óptica co-lineal del infrarrojo. Los ejes de excitación de luz y de detección pueden elegirse independientemente, resultando en una flexibilidad instrumental considerable en la técnica Raman. Además se puede incorporar un microscopio óptico fácilmente que permite la obtención de imágenes de la muestra. Otras ventajas son que no implica la destrucción ni la alteración de la muestra al no necesitar preparación, que hay una respuesta lineal en las concentraciones químicas, y que facilita el análisis espectro/banda comparado con la técnica de infrarrojos (97) .

Al inicio del uso de esta técnica se atribuía como principal desventaja que algunas muestras podían presentar fluorescencia, comportamiento que sufren los materiales biológicos habitualmente al ser irradiados por una luz láser, lo que enmascararía la señal Raman, dificultando las mediciones. Por eso los primeros estudios se centraban solo en el esmalte, ya que contiene un porcentaje muy pequeño de material orgánico (96). Actualmente, esto se puede corregir durante el preproceso de los datos, lo cual se explicará con más detalle en siguientes apartas.

La diferencia de frecuencias entre la luz del láser y las señales de emisión Raman corresponden a las frecuencias de vibración de las moléculas. Este espectro está compuesto por la intensidad de luz reflejada (eje Y) para cada número de onda (eje X, en unidades de frecuencia de vibración, cm^{-1}) y se puede representar gráficamente.

Para el caso de moléculas biológicas, que suelen ser de considerable tamaño y no presentan simetría, el espectro Raman dependerá de la presencia en su estructura de grupos funcionales con una energía de vibración característica (95,98). Por lo tanto, un primer paso para el estudio de este tipo de moléculas es consultar fuentes bibliográficas

en las que aparezcan tabulados los desplazamientos Raman de estos grupos funcionales y, en combinación con los conocimientos previos que se tenga de la molécula, intentar asignar cada una de las bandas a uno de ellos.

En la literatura científica se ha recogido información sobre algunas de las bandas correspondientes al espectro Raman de la dentina. Cada banda del espectro está asociada a un grupo químico concreto, siendo los principales:

Posición de la banda (cm⁻¹)	Asignación
450	Fosfato ν_2
590	Fosfato ν_4
960	Fosfato ν_1
1072	Carbonato ν_1
1240	Amida III
1460	Carbonato ν_3
1540	Amida II, carbonato ν_3
1640	Amida I, agua
3573	Enlace OH

Tabla 1. Principales bandas del espectro Raman de la dentina humana y longitud de onda en la que se encuentran (96,99,100).

Sin embargo, dada la complejidad y el tamaño de muchas moléculas biológicas, las vibraciones de estos grupos funcionales suelen interaccionar entre sí y con el resto del entramado molecular, formando un intrincado patrón que genera un espectro Raman en el que resulta muy difícil encontrar correspondencia entre bandas y grupos funcionales concretos, especialmente en la región por debajo de 1500 cm⁻¹. En estos casos es habitual tomar el espectro a modo de *huella dactilar*, buscando coincidencias en alguna

de las diversas bases de datos de espectros Raman que hay disponibles (101). En el caso de mezclas complejas de componentes fundamentales es posible, a partir de estas bases de datos, determinar cuáles son estos componentes y su proporción, empleando las denominadas *técnicas supervisadas*, como la regresión lineal múltiple y el algoritmo de mínimos cuadrados (102,103). Esta aproximación no ha sido usada en este trabajo, aunque sería una opción a tener en cuenta si se consigue disponer de alguna de estas bases de datos operativa.

Alternativamente, existen diversas técnicas quimiométricas de índole estadística para estudiar los espectros Raman que operan de manera *no supervisada*, no requiriendo de ningún tipo de conocimiento espectroscópico previo (102). El análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) reduce la dimensionalidad de un problema, permitiendo en este caso representar cada uno de los espectros como un punto en un diagrama bidimensional, maximizando la cantidad de información contenida en la *proyección*, de forma que dos espectros muy similares entre sí permanecerán muy cerca, aumentando la distancia que los separa en función de la diferencia objetiva entre ellos (104).

Algunas de las bandas que se observan en el espectro de infrarrojos también aparecen en el espectro Raman. Otras bandas, sin embargo son únicas de cada una de los dos técnicas debido a la diferencia de métodos (absorción de luz o emisión Raman) de cada procedimiento. Puede resultar útil combinar ambas técnicas, identificando más bandas y siendo así complementarias (96).

2 OBJETIVOS

Objetivos generales:

1. Desarrollar una metodología basada en técnicas fiables en el campo de estudio de la odontología.
2. Proponer fármacos antimicrobianos con menores efectos secundarios sobre la estructura dental.

Objetivos específicos:

3. Analizar los datos de microdureza de la pasta tri-antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y clindamicina) e hidróxido de calcio.
4. Analizar los datos de la estructura química de la dentina con el uso de la pasta tri-antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y clindamicina) e hidróxido de calcio.
5. Contrastar el efecto de la pasta tri-antibiótica y el hidróxido de calcio en la microdureza y estructura química de la dentina en dos intervalos tiempo (1 mes y 2 meses).
6. Evaluar el efecto de diferentes solventes (propilenglicol y agua destilada) con hidróxido de calcio y pasta tri-antibiótica sobre la microdureza y estructura química de la dentina.

3 MATERIAL Y MÉTODO

Descripción de la muestra.

Se han utilizado 100 dientes unirradiculares humanos extraídos por motivos ortodóncicos, periodontales u otras circunstancias que impedían su conservación en boca. Los criterios de inclusión han sido los siguientes: ausencia de caries, cracks radiculares, restauraciones previas o tratamiento endodóntico previo; los detritus y tejidos blandos remanentes que puedan quedar en la raíz serán eliminados con una cureta; se incluirán dientes que tengan similares dimensiones de raíz tanto en diámetro mesio-distal como buco-lingual.

Hay una serie de condiciones que no ha sido posible controlar y por tanto se asumen como variables del estudio. Debido a las implicaciones éticas que conlleva realizar un protocolo de endodoncia regenerativa aún no estandarizado, este estudio se ha realizado *in vitro*. Por el tamaño de la muestra y las diversas indicaciones de extracción, los dientes no pertenecen al mismo individuo por lo que suponemos que presentan unas características (flúor, cepillado, tipo de saliva, placa dental, hábitos etc.) diferentes entre sí. Por otro lado, aunque los dientes son jóvenes, la edad no ha podido ser estrictamente la misma en toda la muestra por lo que se asume que pueden existir algunas variaciones en la estructura y composición de los mismos.

Para la utilización de dientes unirradiculares humanos, se ha obtenido el consentimiento firmado previo del paciente para que puedan utilizarse en este estudio (Anexo 1) y se les ha facilitado una hoja de información relativa al mismo (Anexo 2). Además se ha solicitado un permiso por parte de la Comisión de Ética de la Universidad de Murcia, la cual ha emitido un informe favorable para realizar este estudio (Anexo 3).

Las pruebas se han realizado con los siguientes grupos de estudio:

Control negativo: Diente intacto.

Control positivo: Diente instrumentado manualmente.

Grupo 1: Pasta tri-antibiótica y propilenglicol.

Grupo 2: Pasta tri-antibiótica y agua destilada.

Grupo 3: Hidróxido de Calcio y propilenglicol.

Grupo 4: Hidróxido de Calcio y agua destilada.

Los antibióticos de los grupos de pasta tri-antibiótica han sido metronidazol, clindamicina y ciprofloxacino. Se ha optado por sustituir la minocilina por clindamicina para proponer una alternativa con adecuada eficacia antibacteriana pero que pueda evitar la tinción coronaria como efecto secundario (43).

Cada grupo se compone de 10 dientes, los cuales a su vez se subdividieron en dos grupos según el tiempo en el que se realizaron las medidas; usando 5 dientes para el periodo de 1 mes y los otros 5 dientes del grupo para la medición a los 2 meses.

Prueba de microdureza del hidróxido de calcio y la pasta tri-antibiótica.

Procedimiento.

Los dientes se conservaron en timol al 0,1% a 4°C durante un periodo de 6 meses tras su extracción, evitando así su deshidratación y alteración de la estructura. Al comenzar con el estudio, los dientes del grupo control negativo permanecieron intactos y conservados en las condiciones adecuadas dentro de una cámara de humedad. Los dientes del grupo control positivo fueron instrumentados mediante instrumentación mecánica manual leve con limas de 21mm desde el diámetro #10 hasta el #40, siguiendo las recomendaciones establecidas en los protocolos de procedimientos de endodoncia regenerativa. Tras ello, se selló el acceso coronal con un material temporal (IRM) y se conservaron también en la cámara de humedad.

Los dientes de los grupos 1,2,3 y 4 se instrumentaron con instrumentación manual con la misma secuencia de limas anteriormente descrita y se irrigaron con NaOCl 5,25%. Según el grupo, el conducto se obturó con el material y solvente que correspondía. En el caso de la pasta 3-ATB se utilizaron 25,9 mg de polvo de ciprofloxacino, 74,54 mg de clindamicina y 74,54 mg de metronidazol; obteniendo un total de 174,98 mg que se colocaron en un vial color ámbar para evitar la exposición a la luz (43). Esta cantidad se mezcló con 1ml de agua destilada o 1ml de propilenglicol según correspondiese en cada grupo.

El acceso coronal se selló con un material temporal (IRM) y los dientes se conservaron

en la cámara de humedad.

Previo a la valoración de la microdureza y de la estructura química, los respectivos medicamentos se eliminaron del conducto radicular mediante limas e irrigación con EDTA al 17% y después con suero fisiológico, secando los conductos finalmente con puntas de papel. Hasta que se produjo la valoración de la microdureza se conservaron en las condiciones de humedad anteriormente descritas.

Las muestras se cortaron a nivel de la corona utilizando una cortadora de disco de baja velocidad modelo Isomet de la casa Buehler con un disco de corte de diamante 15LC. Cada muestra se montó en resina epoxi en pastillas cilíndricas de 30 mm de diámetro y 20 mm de altura. Tras ser embebidas en resina, se realizó un corte de 2 mm de profundidad de forma paralela a la cara circular del cilindro (Figura 2 y 3) para exponer la parte de la muestra de interés correspondiente a la zona de la unión amelodentinaria. Esta sección se pulió utilizando un procedimiento de pulido estándar, que se detalla en la Tabla 2.

Paño	Abrasivo	Lubricante	ω (rpm)	t (min)
Lija 400P	SiC	agua	200	hasta alcanzar planeidad
Lija 800P	SiC	agua	200	30
Texmeth	Diamond 15 μ m paste	aceite	100	30
Texmeth	Diamond 6 μ m paste	aceite	100	30
Texmeth	Diamond 1 μ m paste	aceite	100	30

Tabla 2. Procedimiento de acondicionamiento de la superficie de las muestras para el ensayo de microdureza.

La microdureza de la superficie se midió utilizando un microdurómetro de la casa Buehler (Figura 4) con una con una carga de 50 g y un tiempo de aplicación de la misma de 10 s. Se realizaron 5 indentaciones en cada diente, cada una de ellas a 1 mm de la pulpa. Las indentaciones se observaron cuidadosamente en un microscopio óptico acoplado al microdurómetro, permitiendo la medida precisa de las diagonales producidas por el indentador. Se utilizó la escala Vickers de dureza por ser la más

apropiada para este tipo de materiales, siguiendo el proceso de cálculo con la fórmula correspondiente.

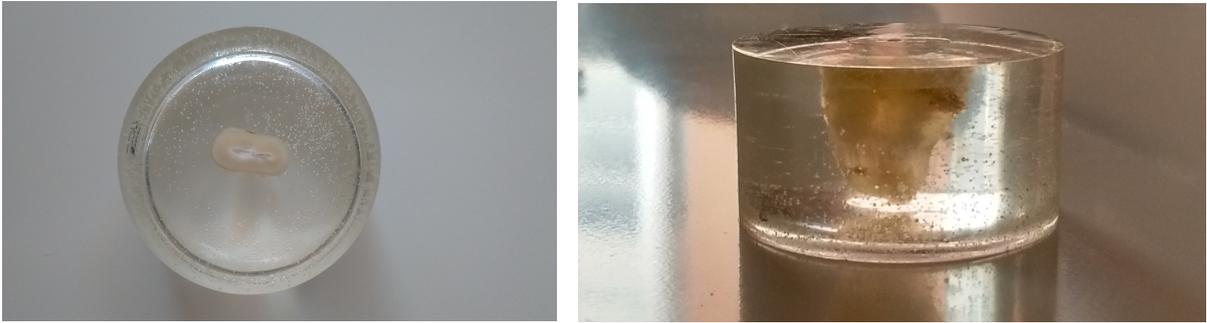


Figura 2. Muestra embebida en resina desde una visión oclusal (izquierda) y axial (derecha).

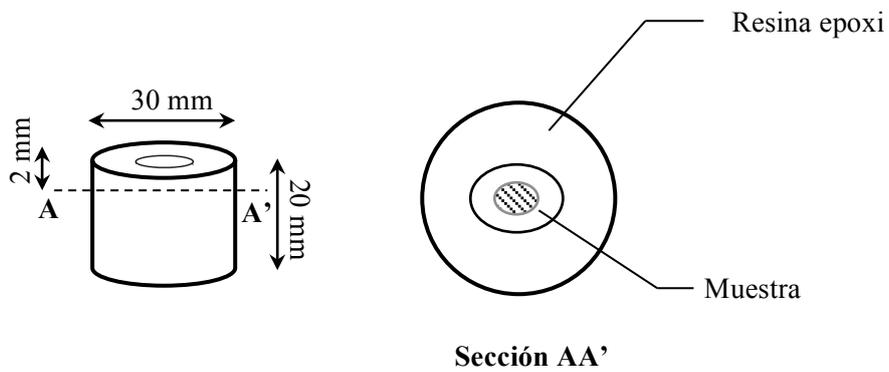


Figura 3. Esquema de montaje de la muestra en resina indicando los cortes a realizar (corte AA').



Figura 4 .Cortadora de disco Isomet™ (izquierda) y microdurómetro Buehler™ (derecha).

Estudio de la estructura química del diente tras la aplicación de la pasta tri-antibiótica y el hidróxido de calcio.

Descripción de la muestra.

Los grupos de estudio necesarios para valorar la estructura química del diente corresponden a los mismos que se utilizaron en el test de microdureza. La valoración de la microdureza no altera la composición de la muestra, por lo que se utilizaron las mismas muestras para estudiar la estructura química.

Procedimiento.

La integridad química será evaluada en cada uno de los grupos de estudio mediante un espectrometría Raman. En primer lugar se tendrá la referencia de la estructura química de un diente sano para poder compararla con los dientes tratados.

Caracterización mediante microdifracción de rayos X (mDRX) y espectroscopía Raman (ER):

La evolución de las fases inorgánicas y orgánicas que componen el diente se realizará mediante microdifracción de rayos X y espectroscopía Raman. La microdifracción permitirá evaluar el cambio en las fases cristalinas del material, mientras que la espectroscopía Raman aportará información estructural de la misma pudiendo detectar a su vez cambios de composición e incluso si alguna de las fases presenta baja cristalinidad. Los análisis de mDRX se realizarán con un equipo Bruker D8-Advance con espejo (Göebel) con un generador de rayos-x Keistalloflex SK 760-80F (Potencia: 3000W, Tensión: 20-60KV y Corriente: 5-80mA) provisto de un tubo de RX con ánodo de cobre.

Los espectros Raman fueron obtenidos a temperatura ambiente utilizando un equipo Raman dispersivo Jasco NRS-5100 de 300mm de distancia focal. El láser utilizado fue el láser de diodo (785 nm) con una potencia de irradiación de 12 mW en la muestra. El equipo Raman está acoplado a un microscopio con un objetivo de 20 aumentos (20x). La red de difracción utilizada fue de 600 surcos/mm lo que da lugar a una resolución de unos 3 cm^{-1} . Previamente a los análisis se calibró el valor del desplazamiento Raman utilizando la línea a 520 cm^{-1} de una muestra de silicio puro. Los espectros obtenidos se corrigieron con línea base para eliminar la fluorescencia de fondo.

En cada diente se han analizado entre 10 y 25 áreas según la muestra, desde la zona más cercana a la pulpa hacia el exterior para valorar los cambios estructurales en la dentina del diente (Figura 5). De cada uno de los grupos, se seleccionaron 2 dientes de cada periodo de tiempo (1 mes y 2 meses). En el caso de los controles se utilizaron dos dientes de cada control, obteniendo un total de 20 muestras para el análisis.

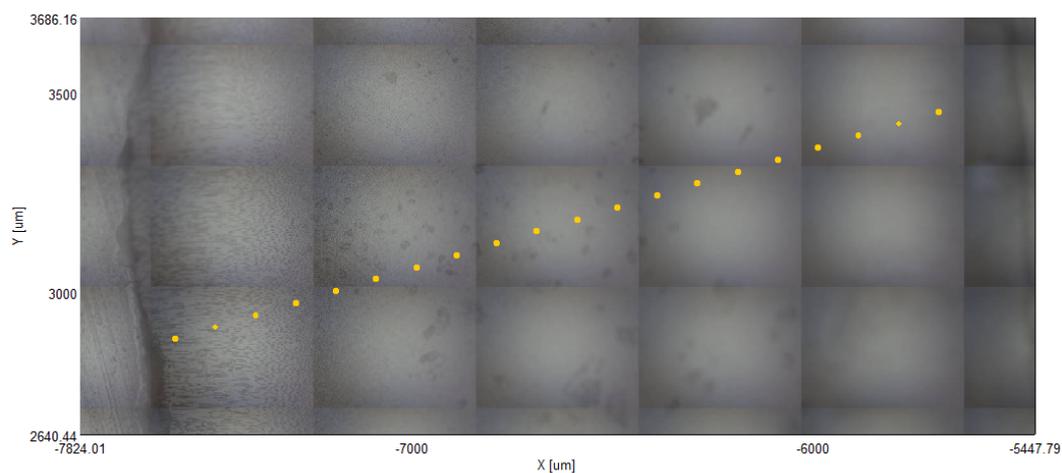


Figura 5. Secuencia lineal de análisis Raman aplicado a una de las muestras desde la pulpa al extremo del diente.

4 RESULTADOS.

4.1 Análisis de los resultados

MICRODUREZA

Se realizó un análisis GLM (General Linear Model) usando como variable dependiente la dureza medida a 1 mm de profundidad del diente, y como factores el diente, el tratamiento, y el tiempo, con un análisis post-hoc apareado LSD (Least Significant Difference).

Los programas utilizados han sido: R Statistics v3.5.1, R Studio v1.1.453 y SPSS v15

Se observa que hay diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los grupos de tratamiento y no hay diferencias significativas ($p > 0,005$) entre los tiempos (1 mes y 2 meses) (Tabla 3).

Concretamente en cada uno de los grupos:

El *Hidróxido de calcio con propilenglicol* presenta diferencias significativas con: control positivo, control negativo, hidróxido de calcio con agua destilada y pasta tri-antibiótica con agua destilada.

El *Hidróxido de calcio con agua* presenta diferencias significativas con: hidróxido de calcio con propilenglicol y pasta tri-antibiótica con propilenglicol.

La *pasta tri-antibiótica con propilenglicol* presenta diferencias significativas con: control positivo, control negativo, hidróxido de calcio con agua, pasta tri-antibiótica con agua.

La *pasta tri-antibiótica con agua* presenta diferencias significativas con: hidróxido con propilenglicol y pasta tri-antibiótica con propilenglicol.

El *Control negativo* presenta diferencias significativas con: hidróxido de calcio con propilenglicol y pasta tri-antibiótica con propilenglicol.

El *Control positivo* presenta diferencias significativas con: hidróxido de calcio con propilenglicol y pasta tri-antibiótica con propilenglicol.

Pruebas de los efectos inter-sujetos			
Origen	Variable dependiente	F	Sig
Modelos corregido	Dureza 1 mm	2,977	0,000
Intersección	Dureza 1 mm	16126,589	0,000
DIENTE	Dureza 1 mm	3,357	0,011
TRATAMIENTO	Dureza 1 mm	14,41	0,000
TIEMPO	Dureza 1 mm	0,446	0,505
DIENTE*TRATAMIENTO	Dureza 1 mm	2,431	0,002
DIENTE*TIEMPO	Dureza 1 mm	1,381	0,242
TRATAMIENTO*TIEMPO	Dureza 1 mm	2,05	0,108
DIENTE*TRATAMIENTO*TIEMPO	Dureza 1 mm	1,481	0,134

Tabla 3. Pruebas de los efectos inter-sujetos y sus diferencias significativas remarcadas en color gris.

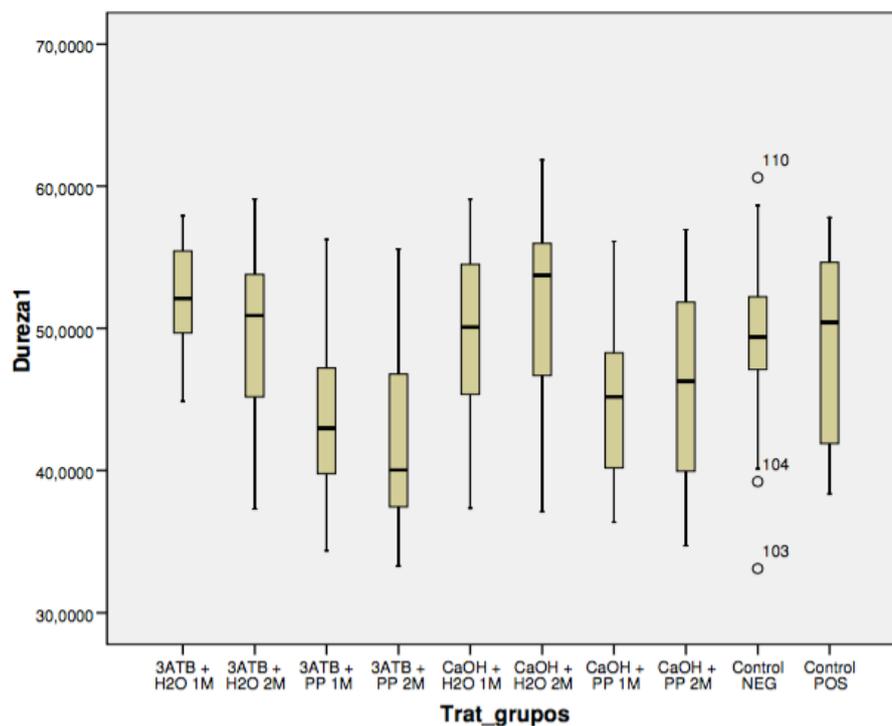


Figura 6. Diagrama de caja con los valores medios de microdureza medida a 1 mm de todos los grupos y tiempos de estudio

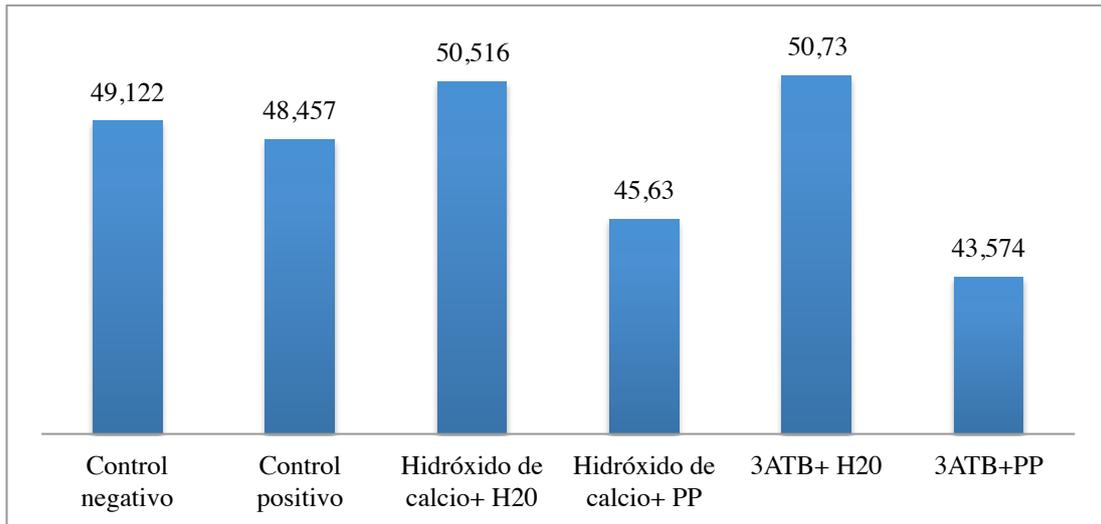


Gráfico 1. Valores medios de la microdureza (escala Vickers) a 1 mm de la pulpa en cada uno de los grupos de estudio independientemente del tiempo.

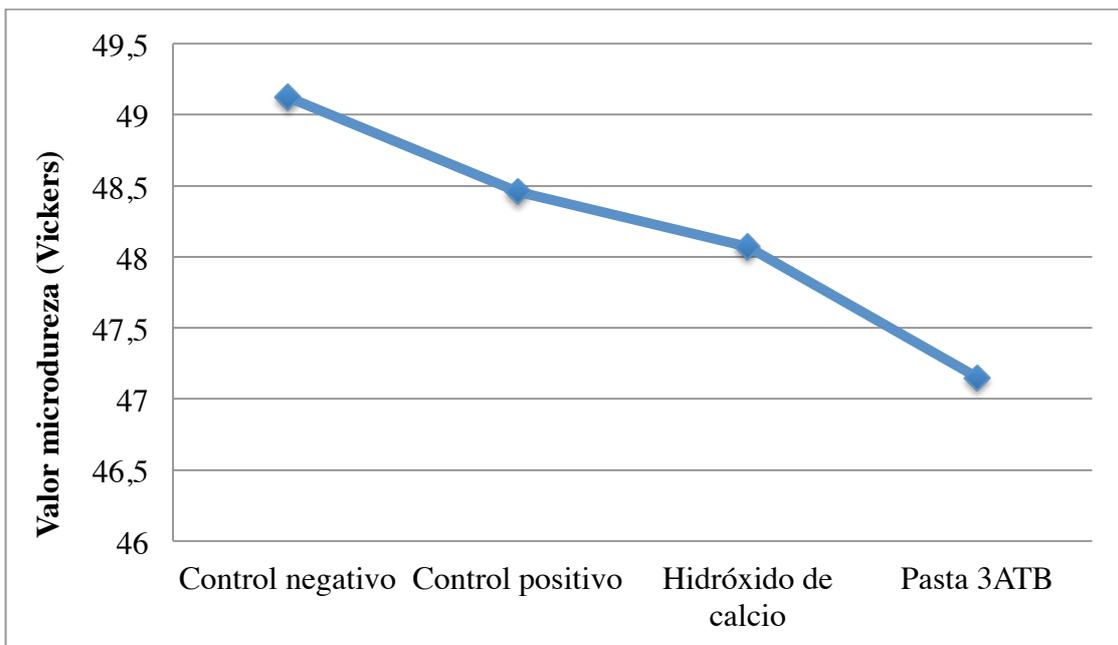


Gráfico 2. Gráfica lineal de los valores medios de microdureza de cada uno de los grupos independientemente del solvente.

Se observa que los grupos control negativo y control positivo no presentan diferencias significativas entre sí, pero si las tienen con todos los demás grupos de tratamiento. Teniendo en cuenta que el control negativo es el diente de referencia (sin tratamiento) y el control positivo recibió una instrumentación manual leve, sería de esperar que no presenten diferencias significativas. En cuanto al tiempo, no se observan diferencias significativas entre las mediciones realizadas a un mes y a dos meses (Tabla 3).

Por otro lado, se observa que todos los grupos cuyo solvente es el agua presentan diferencias significativas con los grupos en los que hay propilenglicol, independientemente de que el medicamento sea hidróxido de calcio o pasta 3ATB. Esto sugiere que respecto a la microdureza es el solvente el que juega un papel importante.

Los grupos de hidróxido de calcio con agua presentan resultados más similares a los controles positivo y negativo que el resto de grupos (Figura 6).

Respecto a los valores de la microdureza, se observa que los grupos con propilenglicol son los que más afectan a la misma, siendo los valores más bajos. Concretamente la pasta 3ATB con propilenglicol es el grupo que menor valor de microdureza presenta (43,574) de todos los grupos del estudio (Gráficos 1 y 2).

RAMAN y EDX:

Se ha utilizado la versión 3.5.1 de R Statistics de 64 bits, junto con la versión 1.1 de R Studio. El análisis de componentes principales (PCA) se ha realizado con la función `PRCOMP` del paquete `STATS`, mientras que para realizar los gráficos se ha utilizado la versión 3 del paquete `GGPLOT2` y la versión 0.6 del paquete `GGBILOT`.

El PCA es la técnica que se ha empleado tanto para analizar los espectros Raman como el análisis elemental por EDX. En el primer caso se ha operado con la intensidad de luz a cada frecuencia del espectro, y en el segundo con el porcentaje de cada elemento en el diente. El PCA permite también determinar cuánto contribuye cada una de las variables originales a la separación entre los puntos mediante las cargas, que se representan como flechas en los diagramas bidimensionales. Cuanto mayor es la longitud de la flecha mayor es la contribución a la separación entre los puntos en esa dirección. Las cargas se han representado únicamente para el análisis EDX, ya que el número de cargas en el caso del Raman (igual al de frecuencias del espectro) hace impracticable su representación.

Previamente al análisis por PCA es necesario someter los espectros Raman a una o varias etapas de pre-procesado para reducir la cantidad de *varianza no informativa* que contienen (102):

- Eliminación de luz de fondo: suprime la señal debida a luz parásita que no procede del proceso de dispersión Raman.

- Normalización: permite corregir efectos de escala, debidas por ejemplo a variaciones en la intensidad del láser, o en la cantidad de sustancia espectroscópicamente activa.
- Regularización de la relación señal-ruido: en espectroscopía Raman el ruido es tanto mayor cuanto más intensa es la señal a una frecuencia dada, por lo que la varianza no informativa de los picos más altos de un espectro pueden enmascarar señales altamente informativas de picos menos intensos. Este fenómeno puede compensarse aplicando una transformación logarítmica al espectro.

La colección de espectros de este estudio presentaba un bajo nivel de luz de fondo parásita, aunque en algunos dientes en particular era muy evidente y hubo de ser corregida. La normalización se aplicó a todos los dientes, de forma que el área bajo la curva entre 160 y 1000 cm^{-1} , dejando fuera la amplísima banda que presentan los controles sin tratamiento alrededor de 1250 cm^{-1} . La transformación logarítmica se aplicó sistemáticamente a todos los espectros para regularizar la relación señal ruido. Adicionalmente se observaron varios espectros con una forma anómala, presentando picos que no se observan en ningún otro espectro, o con claras deformaciones en algunos picos. Se optó por no eliminarlos hasta haber realizado el análisis por PCA, para observar en qué dirección se desviaban del resto.

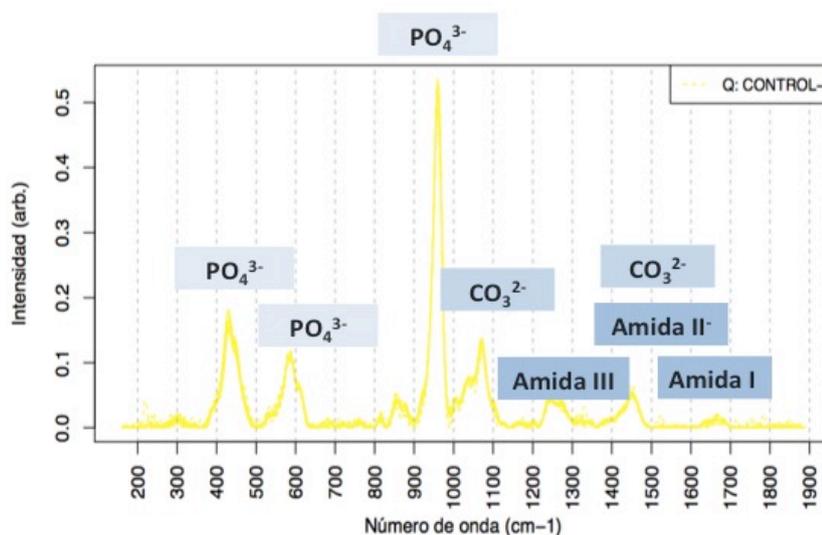


Figura 7. Espectro Raman de referencia correspondiente a uno de los dientes del control negativo (sin tratamiento). Se indica el nombre de los grupos químicos principales en el número de onda correspondiente.

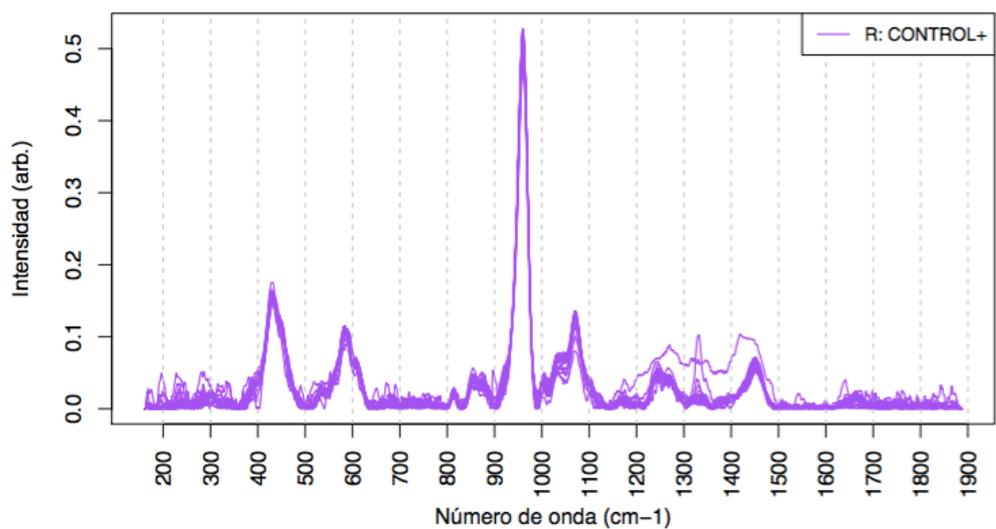


Figura 8. Espectro Raman correspondiente a un control positivo.

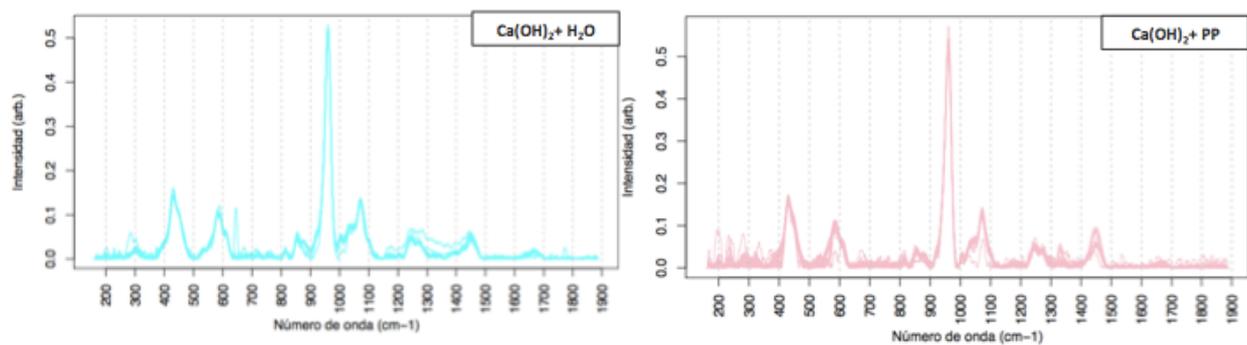


Figura 9. Espectro Raman del hidróxido de calcio con agua destilada (izquierda) y con propilenglicol (derecha).

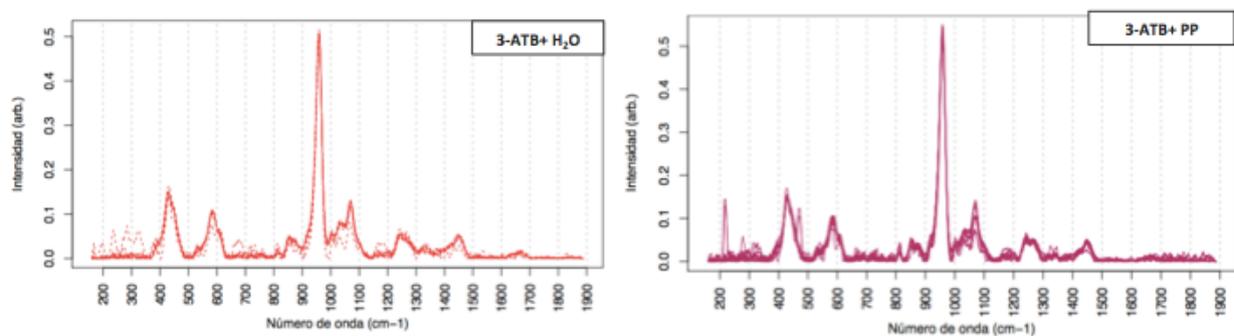


Figura 10. Espectro Raman de la pasta 3-ATB con agua destilada (izquierda) y con propilenglicol (derecha).

Transformación + normalización
Promediando las 10 medidas de cada diente

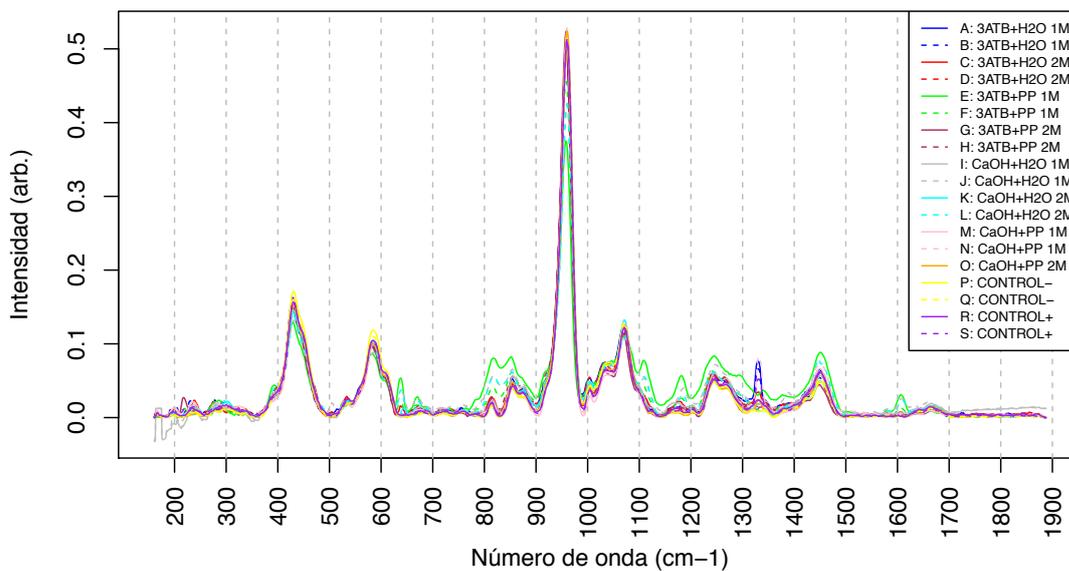


Figura 11. Espectro Raman de los promedios de todos los grupos transformados y normalizados.

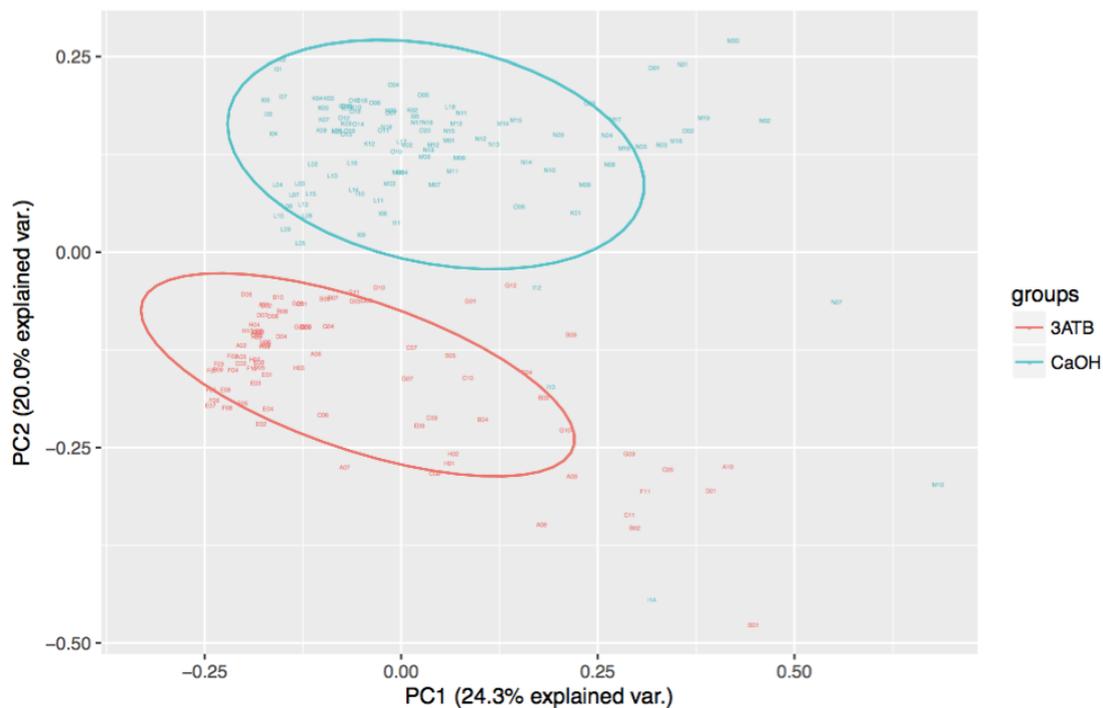


Gráfico 3. Clusters correspondientes a los dos grupos de tratamiento principales (hidróxido de calcio y pasta 3-ATB).

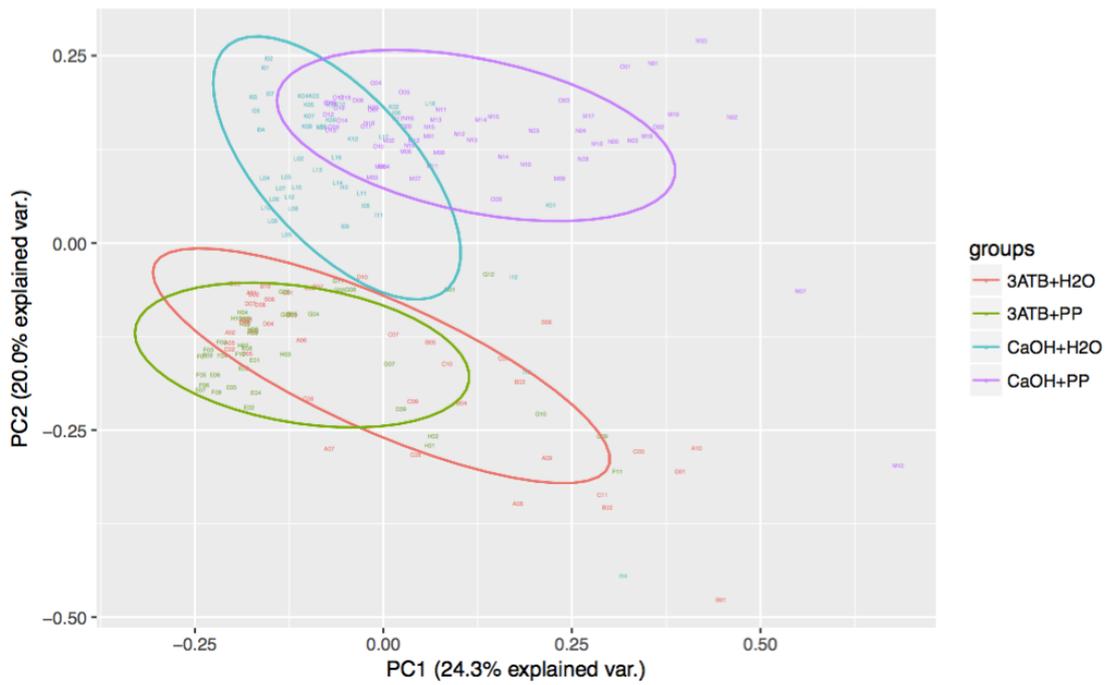


Gráfico 4. Clusters correspondientes a los cuatro grupos de tratamiento con sus respectivos solventes.

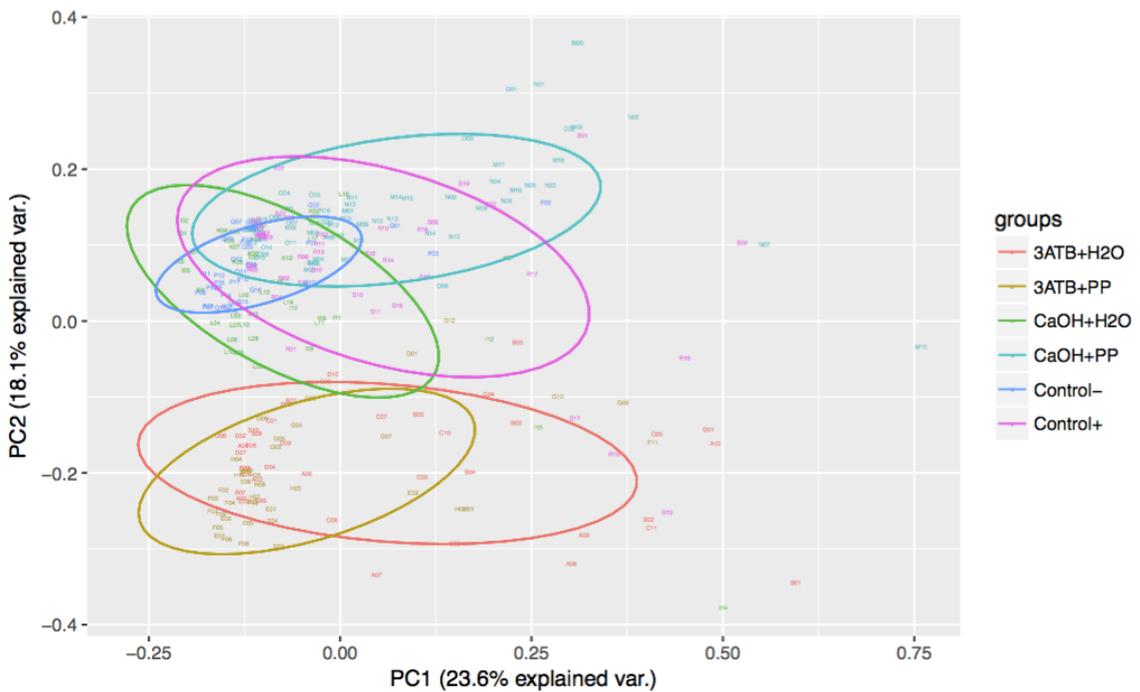


Gráfico 5. Clusters de todos los grupos utilizados en el estudio.

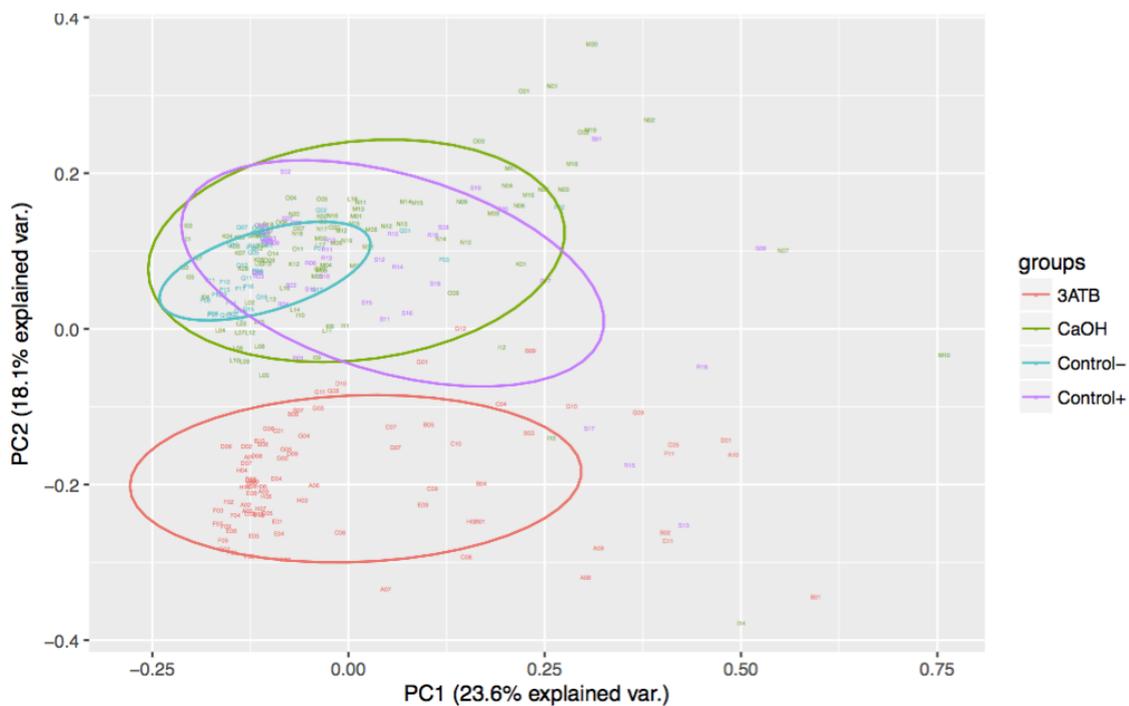


Gráfico 6. Clusters de los grupos tratados con medicamento independientemente del solvente y de los controles.

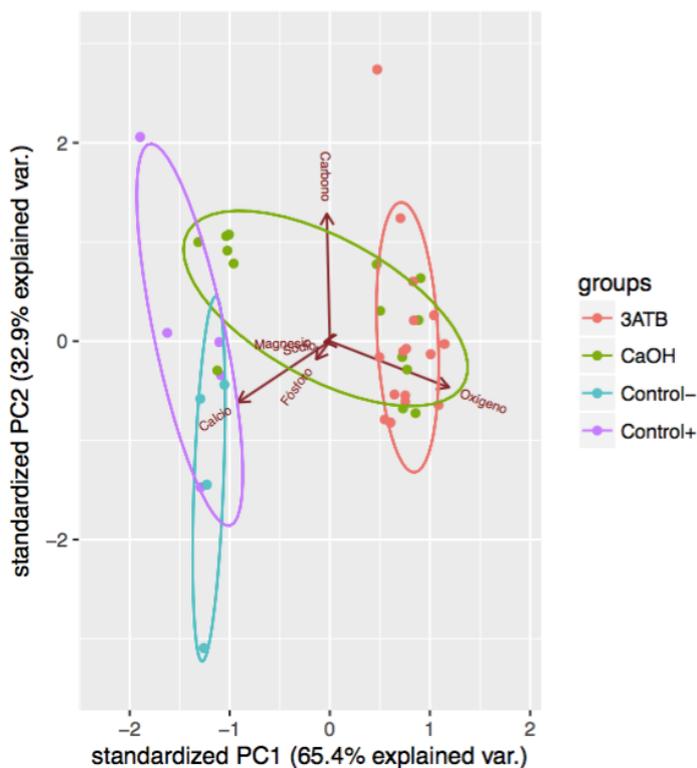


Gráfico 7. Clusters correspondientes a los grupos de tratamiento en general y a los controles de la prueba de valoración con EDX.

Se puede observar que existen grandes diferencias entre los grupos correspondientes a los medicamentos (hidróxido de calcio y pasta 3-ATB), quedando muy lejos uno del otro (Gráfico 3).

Respecto a los solventes, no suponen una gran diferencia entre sí. Sin embargo sí aparecen diferencias entre los grupos de medicamento, independientemente del solvente. (Gráfico 4)

Si observamos todos los grupos de medicamentos con sus solventes e incluimos los grupos controles, vemos que la pasta 3-ATB tanto con agua como propilenglicol queda lejos de todos los demás grupos (Gráfico 5).

Aislando los solventes y dejando los grupos de medicamento y los controles, es la pasta 3-ATB la que tiene un efecto distinto a los demás, quedando alejada del resto de grupos (Gráfico 6)

En cuanto a los resultados del EDX se observa que tanto el control positivo, el negativo y el hidróxido de calcio tienen valores altos de calcio y menores en oxígeno. Sin embargo la pasta 3-ATB presenta un alto contenido en oxígeno y menor proporción de calcio (Gráfico 7).

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM):

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Hitachi modelo S3000N. Este microscopio cuenta con un detector de rayos X marca Bruker modelo XFlash 3001 para microanálisis (EDX) y mapping. Dispone del modo de trabajo en presión variable para observación de muestras no conductoras sin necesidad de recubrirlas con material conductor.

Las imágenes de electrones retrodispersados fueron obtenidas en presión variable a 20 kV, a una distancia de 500x a 700x aumentos y una apertura de objetivo de 50 μ m a 100 μ m, según la imagen.

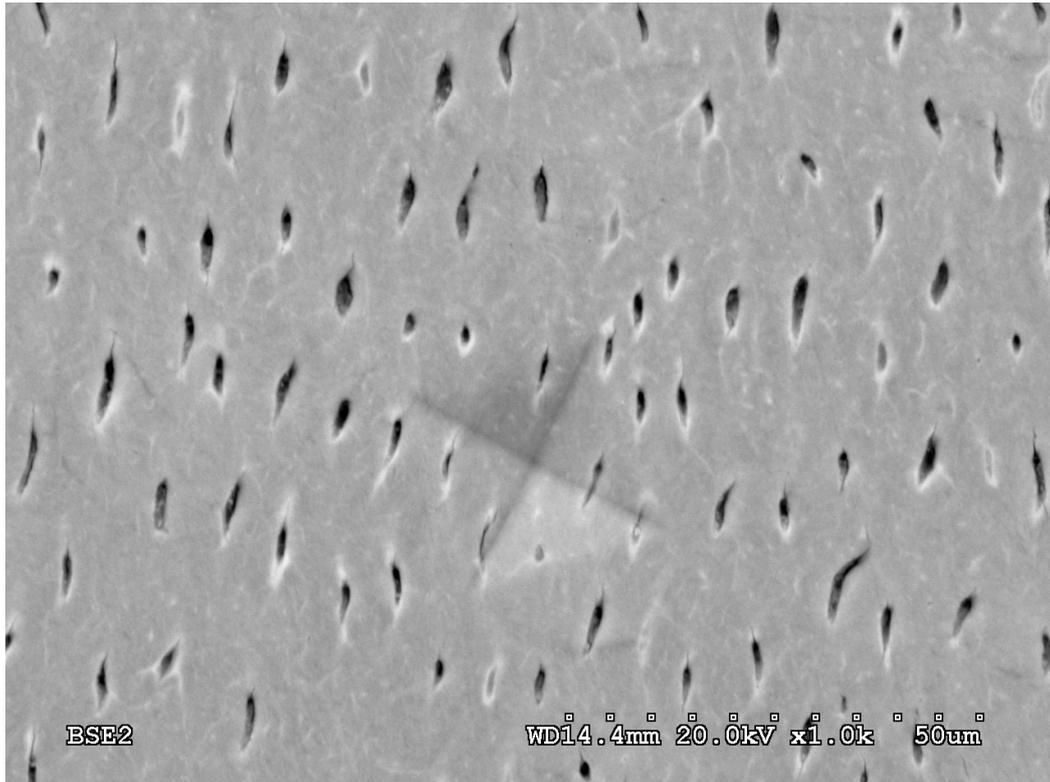


Imagen 1. Huella provocada por el indentador del microdurómetro en la dentina de una de las muestras del estudio.

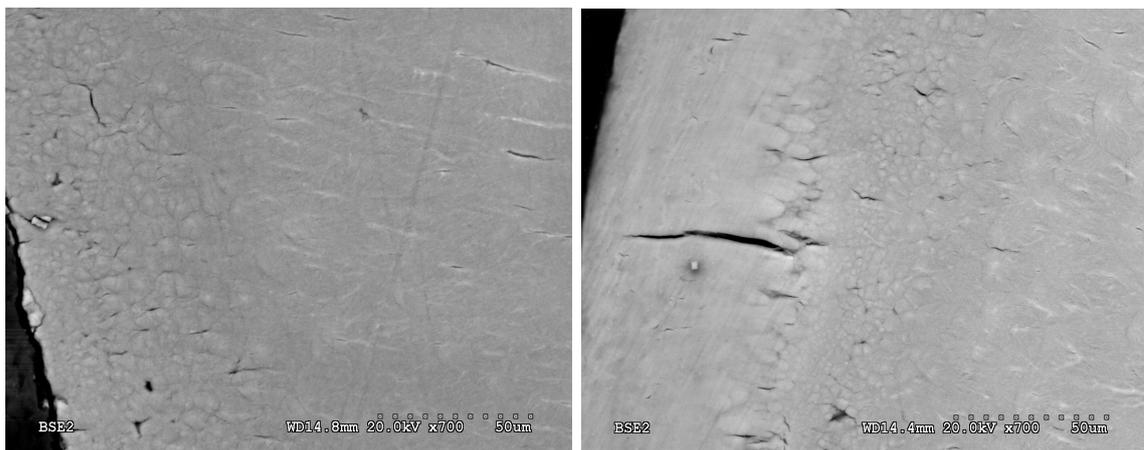


Imagen 2. A la izquierda se observa un control negativo y a la derecha un control positivo.

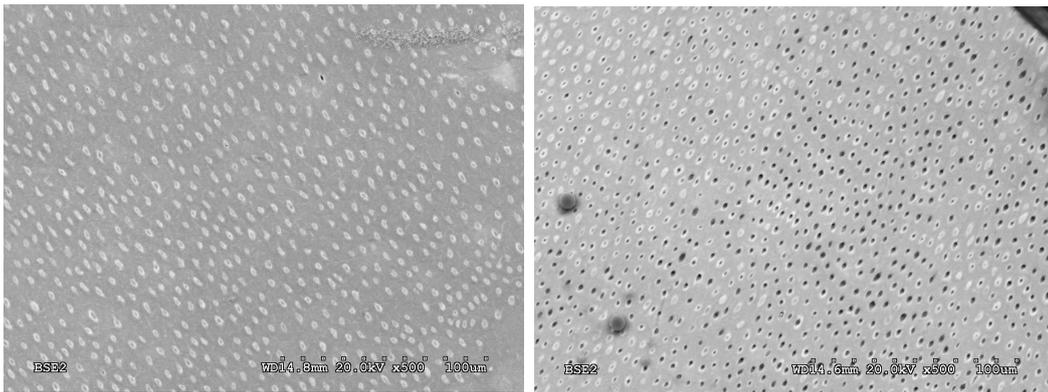


Imagen 3. Hidróxido de calcio con agua (izquierda) e hidróxido de calcio con propilenglicol (derecha).

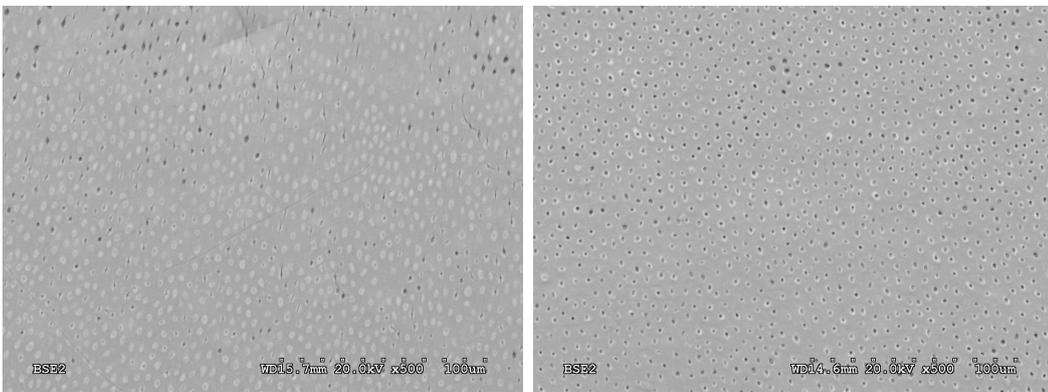


Imagen 4. Pasta 3ATB con agua (izquierda) y pasta 3ATB con propilenglicol (derecha).

Respecto a las imágenes obtenidas al SEM se observa que en el control negativo y control positivo la *smear layer* se mantiene en general intacta (Imagen 2).

Por otro lado se observa que los grupos con medicamento presentan una exposición de los túbulos dentinarios tanto a 1 mes como a 2 meses, sin evidencia de *smear layer*, lo cual soporta el efecto desmineralizante que presentan los mismos.

Concretamente los grupos cuyo solvente ha sido el agua destilada presentan los túbulos dentinarios menos abiertos que los grupos en los que su usó el propilenglicol (Imágenes 3 y 4).

5 DISCUSIÓN.

Revascularización pulpar

El tratamiento endodóntico de dientes permanentes jóvenes con pulpa necrótica supone todo un reto para el odontólogo. Hay riesgo de inducir una fractura en la pared de dentina o de extender la gutapercha en el tejido periapical durante la compactación del material en los conductos radiculares. Aunque el uso de hidróxido de calcio en procedimientos de apicoformación o la colocación de MTA como stop apical han minimizado la extrusión del material, suponen poca ventaja en cuanto a la adición de resistencia a la pared dentinaria. Llevar a cabo un tratamiento de conductos convencional puede ser algo difícil, pero incluso cuando se consigue provoca una raíz corta, débil y propensa a la fractura. Es decir hay riesgo de fractura y de movilidad dental con este tratamiento (16).

En un estudio realizado por Cvek (105) la frecuencia de fractura cervical de raíz fue marcadamente mayor en dientes permanentes jóvenes tratados endodónticamente que en dentición permanente con una incidencia del 28% al 78%. Este hallazgo enfatiza la importancia de preservar la vitalidad pulpar del diente inmaduro en presencia de traumatismos o caries.

Con un tratamiento de apicoformación, el canal es sellado temporalmente hasta una barrera de tejido duro formada en el ápice. Debido a que este espacio está ocupado, no hay espacio posible para que el tejido vital pueda proliferar en el canal radicular, siendo eliminada la posibilidad de revascularización (67).

La necrosis pulpar de un diente permanente joven con inflamación apical, no excluye la presencia de células progenitoras pulpares residuales en el tercio apical del conducto radicular (16). En este punto es importante volver a remarcar la diferencia entre *revascularización* y *regeneración pulpar*. Se ha observado que el tejido presente en el espacio pulpar es más similar al ligamento periodontal que al tejido pulpar, por lo que no es del todo adecuado hablar de procedimientos de regeneración pulpar (51). Trope y Lenzi (106) sugieren que el término *revascularización* o *revitalización* es más apropiado porque hace referencia a la formación de un tejido vital inespecífico que se forma en el conducto radicular.

Con el progreso científico y tecnológico, se han mejorado las técnicas para el aislamiento de especies bacterianas, siendo en 1980 cuando se mostró que en los conductos radiculares de dientes permanentes con necrosis pulpar y lesión periapical existe una infección polimicrobiana en la que predominan especies anaerobias estrictas (64). Estos datos concuerdan con resultados de estudios más recientes tales como los de Toyoshima et al (107), Sato et al (108) y Faria (64), los cuales mostraron que en los canales de dentición permanente joven existe una infección polimicrobiana en la que predominan los microorganismos anaerobios, similar a los resultados obtenidos en la microbiota de dentición permanente adulta. La literatura muestra también la presencia de estreptococos en un 70%, un 82%, un 76% y un 85% en los conductos radiculares de dentición permanente joven con necrosis pulpar, siendo el más prevalente el *S.mutans* (109).

Para llevar a cabo la desinfección del conducto radicular es necesario realizar una buena irrigación seguida de la colocación de un medicamento intraconducto.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que no existe un protocolo estandarizado con de revascularización con un nivel alto de evidencia. Hasta la fecha, solo se dispone de informes de casos y series de casos sobre la revascularización endodóntica, pero no se han publicado estudios clínicos aleatorizados y controlados. Aunque las series de casos no proporcionan datos definitivos que apoyen la modalidad de tratamiento administrada, tienen la ventaja, respecto a estudios in vitro como el nuestro, de haber sido realizadas con casos reales, y por tanto, proporcionan un nivel de evidencia más alto que los estudios preclínicos. Aunque las técnicas de revascularización endodóntica varían entre los informes de casos y las series de casos, hay algunas características homogéneas que vale la pena comentar. Casi todos los casos descritos son en pacientes entre 8 y 18 años de edad, con dientes con ápices inmaduros. La edad debe considerarse un factor importante, ya que muchos estudios indican que los pacientes más jóvenes tienen una capacidad de cicatrización mayor o un mayor potencial regenerador de las células madre. Además, el mayor diámetro del ápice inmaduro (abierto) puede albergar el crecimiento invasivo del tejido en el espacio del conducto radicular e indicaría una fuente abundante de células mesenquimatosas de la papila apical. Estos tejidos se laceran por la hemorragia provocada y son la única fuente probable de células madre mesenquimatosas introducidas en el espacio del conducto radicular. Otro hallazgo

sistemático que se describe en prácticamente todos los casos es la ausencia de instrumentación de las paredes de dentina relacionada con las dudas sobre la posible fractura de esas raíces finas e incompletamente desarrolladas. La ausencia de instrumentación debería tener un efecto beneficioso evitando la producción de una capa de barrillo dentinario que podría ocluir las paredes de dentina o los conductos.

Así pues el protocolo de desinfección se basa principalmente en el método químico más el abordaje químico-mecánico que se usa en el tratamiento endodóntico convencional. Se forma un coágulo de sangre en el conducto que es imprescindible para la formación de un almacén de proteína, permitiendo el crecimiento tridimensional del tejido (17).

Irrigantes y solventes

Las bacterias remanentes en la superficie de los conductos radiculares pueden eliminarse fácilmente por los procedimientos habituales de endodoncia, por ejemplo mediante el uso de irrigantes. Sin embargo las bacterias que están en las zonas más profundas de los túbulos dentinarios pueden sobrevivir a la irrigación si los medicamentos introducidos en los conductos no penetran eficazmente.

El hipoclorito de sodio es uno de los irrigantes más comunes utilizados en procedimientos de endodoncia, siendo capaz de eliminar las bacterias en la *smear layer* y en reservorios artificiales preparados en los conductos de la dentina radicular (110). Con el objeto de simular las condiciones clínicas habituales en las que se llevan a cabo los procedimientos de endodoncia regenerativa, hemos usado hipoclorito de sodio en nuestro estudio como irrigante previo a la colocación de los medicamentos.

La irrigación debe llevarse a cabo de manera cuidadosa debido al posible riesgo de que se extruya fuera del ápice del diente inmaduro. Suele utilizarse una aguja que pasivamente deposita el irrigante en el interior del conducto. No existe un consenso en cuanto al porcentaje de hipoclorito sódico a usarse en los procedimientos de revascularización, oscilando los valores más utilizados entre 2,5% y 5,25%. Autores como Trevino et al (58) han observado que la supervivencia de células madre en la papila apical tiene lugar con un porcentaje de NaOCl que oscila entre el 1,25-6%.

En estudios similares al nuestro en los que se ha valorado la microdureza de la dentina en endodoncia regenerativa, hemos encontrado diversos porcentajes de uso de

hipoclorito. Por ejemplo en el estudio de Yilmaz (111) se usaron 2ml de NaOCl al 1% mientras que en otros (62,112) se utilizó 1ml al 5,25% tras cada lima.

El protocolo de la AAE sobre procedimientos de endodoncia regenerativa aconseja un porcentaje bajo de hipoclorito de sodio (en torno al 1,5%) pero irrigando al menos 5 minutos en cada conducto. En nuestro estudio hemos utilizado NaOCl al 5,25%, disminuyendo por otro lado el tiempo de irrigación en cada conducto evitando así posibles efectos adversos.

Otro de los irrigantes utilizados en los procedimientos de endodoncia regenerativa es el EDTA. Está indicado en la segunda cita del tratamiento, previo a la fase de sangrado y formación del coágulo intraconducto. Se ha observado que su uso puede ser una influencia más en la afectación de la dentina, pues reduce la microdureza de la dentina radicular (113) y la resistencia a la fractura (114).

Los agentes antimicrobianos como la pasta tri-antibiótica o el hidróxido de calcio son capaces de eliminar los microorganismos remanentes, particularmente los que residen en las zonas a las que no tienen acceso los irrigantes. Sin embargo un vehículo eficiente de los mismos puede ayudar a que esa penetración a las zonas menos accesibles sea eficaz. En un estudio realizado Cruz et al (90) se demostró que el propilenglicol permite que penetre mayor cantidad de soluto por los túbulos dentinarios. Esto ocurre de manera más rápida y efectiva que usando agua destilada. La elevada tensión superficial del agua destilada, posiblemente retrasa la penetración eficiente por los túbulos dentinarios. Aunque el propilenglicol es más viscoso que el agua destilada, tiene menor superficie de tensión. Esto le da la ventaja de penetrar más fácilmente por los túbulos. Además se observó que la *smear layer* retrasa la penetración del vehículo, tanto del agua destilada como del propilenglicol. Por tanto, es importante eliminar la *smear layer* antes de introducir ningún medicamento, para conseguir el mejor efecto posible.

Los datos anteriores concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que previo a la colocación de los medicamentos se realizó una instrumentación mínima del conducto junto con la irrigación del conducto, removiendo así la *smear layer*. Por otro lado se observa una disminución de microdureza mayor en los grupos con propilenglicol, posiblemente a causa de que éste produce una difusión más rápida debido a las características anteriormente citadas. Esto se aprecia también en las

imágenes obtenidas al SEM, donde los túbulos dentinarios aparecen más abiertos que en los grupos en los que se ha usado agua destilada.

Hay que destacar que aunque la instrumentación no se recomienda o debe ser ínfima en los protocolos de endodoncia regenerativa, en este estudio se realizó una instrumentación manual mínima con el objetivo de estandarizar las dimensiones internas de las raíces. De hecho no se observan diferencias significativas entre el control negativo y el control positivo, lo que indica que la instrumentación fue tan leve que no supuso una modificación destacable en la microdureza dentinaria ni tampoco diferencias en el análisis Raman.

Sin embargo, en la mayoría de los estudios en los que se valora la microdureza se preparan previamente los dientes mediante instrumentación rotatoria, no respetándose el principio de mínima instrumentación (62,115) .

Hay que tener en cuenta que algunos de los medicamentos que habitualmente se han utilizado, como el formocresol, son volátiles y desnaturalizan proteínas estando en forma líquida sin requerir el uso de vehículos para extender su efecto bactericida. Sin embargo, se necesitan concentraciones muy elevadas para eliminar las bacterias de los conductos infectados. El uso de estos agentes además de eliminar los microorganismos puede causar daño a los tejidos perirradiculares.

Por tanto, para una mejor difusión del efecto antibacteriano y esterilización de los conductos radiculares es adecuado acompañar la medicación intraconducto con irrigantes y solventes, siendo necesarios más estudios que valoren concentraciones y tiempo óptimo de los mismos para conseguir el mayor beneficio posible con los menores efectos secundarios.

Microdureza

El test de microdureza proporciona una información indirecta de la pérdida o ganancia de tejido duro dental (116). Aunque no existe una evidencia directa de que una disminución de microdureza suponga mayor probabilidad de fractura, sí puede relacionarse con otras variables como con la resistencia a la fractura (115).

Hemos decidido utilizar esa técnica porque además de representar una evaluación indirecta de los intercambios minerales y de ser el método menos variable y menos susceptible a los errores operacionales, es capaz de medir pequeñísimas regiones, así como permitir la reutilización de las muestras, debido a su característica de no invasividad.

Los cambios en el contenido mineral van a producir una disminución de la microdureza y un aumento de la permeabilidad y solubilidad de la dentina del conducto radicular. Una dentina desmineralizada no mantiene el soporte; por eso es necesario que se conserve la microdureza (115).

Debido a que en los procedimientos de endodoncia regenerativa los medicamentos intraconducto pasan mucho tiempo en el interior del mismo, es importante estudiar qué efectos puede producir su aplicación a largo plazo en la microdureza de la dentina.

En los estudios en los que se ha valorado la microdureza la carga del indentador y los segundos de aplicación es variable. En este estudio se utilizó 100 gramos de carga durante 15 segundos, al igual que en el de Yilmaz et al (111); mientras que otros autores como usaron 50 gramos durante 15 segundos (115).

En relación con la carga de los indentadores, se considera que la dureza depende de la carga utilizada. Sin embargo, con el incremento de la carga el coeficiente de variación disminuye. Cuando se utiliza una carga muy baja, 25 gramos o menos, la dependencia dureza-carga es más pronunciada por el indentador Vickers. Por esta razón, cargas de menos de 25 gramos son inadecuadas para el análisis de la mayoría de los materiales y estructuras dentales (117). En la literatura revisada se encontró que no existe un estándar en cuanto a las cargas utilizadas (116,118,119) dado que estas variantes pueden influir en los valores finales de la dureza.

Hay que tener en cuenta que los ácidos se añaden a los antibióticos comúnmente para mantener la estabilidad química, controlar la tonicidad o asegurar la compatibilidad fisiológica. Sin embargo un tiempo de exposición largo a los tejidos dentales, puede causar desmineralización y efecto negativo en las propiedades mecánicas (62). Esto soporta los resultados de nuestro estudio, pues observamos que tras un tiempo largo como han sido 1 mes o 2 meses, la pasta 3-ATB disminuye la microdureza dentinaria.

Otros estudios han observado también variaciones en la microdureza según el agente antimicrobiano aplicado y el tiempo. Por ejemplo, la minociclina, se ha visto que quela el calcio y desmineraliza los tejidos duros (120,121). Por otro lado la exposición a soluciones acuosas de tetraciclinas durante 1 y 25 horas causa una reducción en la microdureza continua (122). De forma similar, el alto poder alcalino del hidróxido de calcio ha demostrado disminuir la resistencia a la fractura en 1 mes (123).

En un estudio anterior, se utilizó la pasta 3-ATB (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina), la pasta 2-ATB (metronidazol y ciprofloxacino) y el hidróxido de calcio; todos ellos con agua destilada como solvente. Se valoró la microdureza a la semana, al mes y a los tres meses. A la semana no se encontraron diferencias significativas, sin embargo al mes y a los 3 meses sí. Aunque todos los grupos de medicamento afectaron a la microdureza, concretamente fueron los grupos de antibiótico los que con el paso del tiempo presentaron una afectación de la microdureza más rápida respecto al hidróxido de calcio (62). Al igual que en nuestro estudio, tanto el hidróxido de calcio como la pasta 3-ATB suponen una afectación de la microdureza, sin embargo en nuestro caso, no encontramos diferencias significativas en el tiempo.

Otros estudios han observado una desmineralización de la dentina radicular después de 1 semana de aplicación con la pasta 3-ATB y 2-ATB, con el hidróxido de calcio se ha observado al cabo de los 3 meses (124,125).

Autores como Yilmaz et al (111) comparan la pasta 3-ATB, 2-ATB e hidróxido de calcio, todos ellos con agua destilada y no encuentra diferencias significativas ni en la primera ni en la segunda semana, pero sí a partir de la cuarta. Son los grupos con antibiótico los que presentan menor valor de microdureza a la cuarta semana respecto al hidróxido de calcio y al grupo control. En cualquier caso, todos los grupos con tratamiento suponen una disminución de la microdureza, tal y como sucede en nuestro estudio.

Hay que tener en cuenta que el hidróxido de calcio (pH 11,8) es una molécula inorgánica altamente alcalina. Debido a su pequeño tamaño puede penetrar en la malla intrafibrilar de las fibras de colágeno mineralizadas y causar cambios en la conformación tridimensional del tropocolágeno, provocando una disminución del módulo elástico y de la microdureza de la dentina mineralizada (111). En este estudio

tanto a 1 mes como a 2 meses, el hidróxido de calcio provoca una disminución de la microdureza lo que apoya el efecto altamente alcalino del hidróxido de calcio sobre la matriz orgánica de la dentina.

La pasta 3ATB (pH 2,9) es altamente ácida. Gracias a esa propiedad tiene el beneficio de remover la *smear layer* y abrir los canales dentinarios para una rápida penetración del medicamento. Sin embargo esto puede provocar una rápida desmineralización (111).

Un estudio retrospectivo sobre casos de endodoncia regenerativa recoge que los casos tratados con pasta 3ATB tienen significativamente paredes radiculares más delgadas que aquellos tratados con hidróxido de calcio (126).

Otra consideración a tener en cuenta es que hay dientes que presentan el llamado “efecto mariposa”. Es un fenómeno óptico visto en algunas secciones de raíces de los dientes. Este fenómeno es dado por la esclerosis tubular dentinal que es mayor en los túbulos dentinarios bucolinguales que mesiodistales, sugiriendo que esto podría afectar a la dureza (127).

De manera global, se observa en la mayoría de los estudios una disminución de microdureza más rápida en los grupos con antibiótico que en los de hidróxido de calcio. Sin embargo, en este estudio el tiempo (1 mes y 2 meses) no ha supuesto diferencias significativas. Hay que tener en cuenta que las condiciones de los estudios no son siempre las mismas y que no hemos encontrado ninguno que utilice el propilenglicol como solvente con los grupos de antibiótico y de hidróxido de calcio.

Raman

Son varios los estudios que han optado por el uso de esta técnica para entender mejor la estructura química del esmalte y de la dentina tras la aplicación de agentes habituales en odontología.

Recordemos que la dentina se compone fundamentalmente por una parte inorgánica (mineral; hidroxiapatita), una parte orgánica (proteínas; fibras colágenas) y en menor proporción agua.

Los cambios en los patrones de mineralización de la dentina se acompañan de cambios en la matriz orgánica. El colágeno tipo I es el que más predomina en los tejidos

mineralizados, y se ha observado que influye en las propiedades mecánicas del hueso y de los dientes (99).

Que exista o no hidratación es un factor que va a influir en la desmineralización. Las fibras hidratadas tienen un alto grado de organización estructural mientras que la deshidratación causa desorden y estrés mecánico. En la deshidratación, la pérdida de agua absorbida y ligada químicamente a las moléculas, desestabiliza la estructura cuaternaria del colágeno y disminuye el grado de organización de las fibras (128).

Debido a lo anterior, es fundamental una conservación adecuada de los dientes que vayan a ser utilizados en estudios *in vitro*. Los métodos de almacenamiento de las muestras dentales, se utilizan para evitar la deshidratación, pero además deben incorporar sustancias antimicrobianas para prevenir el crecimiento de microorganismos. No existe ninguna sustancia que inhiba al cien por cien el crecimiento bacteriano y que conserve los dientes en condiciones idóneas para su posterior utilización. Sin embargo, entre los estudios que valoran las diversas opciones que hay para almacenar los dientes de forma óptima hemos encontrado que el timol al 0,1%, utilizado en este estudio, es una opción viable y se ha utilizado por otros autores para conservar muestras dentales que iban a someterse a pruebas de microdureza y raman (62,111). Por ejemplo, en un estudio en el que se comparó el agua destilada, el timol al 0,1 % y la azida sódica al 0,02% mediante pruebas de microdureza y de fluorescencia, se observó en el test de fluorescencia que el timol mantenía en mayor grado la conservación del diente respecto a los otros grupos (129).

Los cristales de hidroxiapatita (zona mineral, inorgánica) están constituidos por calcio, fosfato y grupos hidroxilo ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), pero pueden presentar sustituciones de iones como magnesio, sodio, cloro, potasio, carbonato, flúor y otros iones en porcentajes variables. Estas sustituciones modifican la red cristalina del apatito, alteran el tamaño cristalino, afectan a la dureza, disolución y otras propiedades (130). Es por ello que los cambios producidos en esta parte mineral, van a afectar a la parte orgánica (fibras de colágeno).

En los cristales de hidroxiapatita los iones de calcio (Ca^{+2}), fosfato (PO_4^{-3}) e hidroxilo (OH^-) permanecen unidos por enlaces iónicos, debido a sus fuertes cargas eléctricas

opuestas, estos iones pueden interactuar con las moléculas de agua, que también tienen carga eléctrica (131).

Durante la aplicación de sustancias ácidas se liberan H^+ y disminuye el pH. Los H^+ se difunden hacia el esmalte; reaccionando con los iones PO_4^{-3} y OH^- para formar fosfatos primarios (HPO_4^{-2}), fosfatos secundarios ($H_2PO_4^{-1}$), ácido fosfórico y agua. La disminución de la concentración de los iones PO_4^{-3} y OH^- define el estado de subsaturación que favorece que se sigan perdiendo más iones y se produzca la desmineralización. Por el contrario, si el pH aumenta (baja la concentración de H^+), los iones PO_4^{-3} , OH^- y Ca^{+2} quedan disponibles para reconstruir los prismas que han perdido iones (sobresaturación). Por lo tanto, se produce la remineralización (130).

De esta forma, un aumento en la concentración del carbonato supone una disminución de la dureza; mientras que valores altos de grupos fosfato nos van a indicar una dentina más mineralizada e intacta. Por tanto para la interpretación de los resultados de este estudio nos basaremos en los cambios producidos en las principales bandas espectrales correspondientes a los carbonatos (1460cm^{-1} y 1540cm^{-1}) y a los fosfatos (450cm^{-1} , 590cm^{-1} y 960cm^{-1}).

Además de lo anterior, el ratio fosfato/amida presente en cada grupo también supone un indicador de la dureza de la dentina, pues compara la proporción mineral, en la que se encuentra el fosfato; respecto a la orgánica (amida, proteína que forma parte del colágeno). Por ejemplo, los ácidos de los antibióticos tienen efecto positivo porque remueven la *smear layer* y suavizan los canales pero disminuyen el ratio fosfato/amida por lo que la microdureza disminuye (62).

En nuestro estudio se observa que la intensidad de los picos del fosfato del control positivo y negativo, es mayor respecto al resto de grupos que sitúan estas bandas por debajo de esa cifra (Figuras 7 y 8). Esto nos indica que al no haber recibido tratamiento y al haber sido instrumentados levemente, no se ha producido una pérdida de estructura destacable.

Respecto a los grupos de hidróxido de calcio y de pasta 3-ATB, observamos que la intensidad de los picos fosfato es parecida entre ellos, siendo los grupos carbonato los que aparecen levemente menores en los grupos de hidróxido de calcio y mayores en los de pasta 3-ATB.

La presencia de carbonato aumentado es un indicador de que se ha modificado la estructura de la hidroxiapatita, el cual reduce la cristalinidad de la apatita, limita el tamaño de los cristales distorsionando la estructura de la misma (132).

Sin embargo los gráficos que mejor nos permiten apreciar las diferencias son los número 4, 5 y 6. Se observa que la pasta 3-ATB independientemente del solvente está muy alejada del resto de grupos, siendo el hidróxido de calcio más parecido a los grupos controles. Esto nos indica que la pasta 3-ATB supone mayor afectación en la estructura dentinaria que el hidróxido de calcio.

Tsuda et al (100) observaron mediante espectroscopia infrarroja que la dentina tratada con NaOCl muestra una pérdida de la banda amida III y II, es decir de proteínas, respecto al grupo control sin tratamiento. Además había un aumento de la banda del carbonato ν_1 de un 60% en los grupos en los que se usó este irrigante. Sin embargo, al tratar con 1000pp de NaF durante 20 h se recuperan los niveles normales de las bandas anteriores. De esta forma, las bandas correspondientes a los fosfatos desaparecían después del tratamiento con NaOCl, demostrando así el efecto desmineralizante de este irrigante.

Por otro lado hay autores que no observan cambios en el ratio carbono/mineral con el hipoclorito, por lo que la cristalinidad y el tamaño de los cristales en dentina no se vería afectado por el hipoclorito (132). Sin embargo otros, como Sakae et al (133) sugieren que es capaz de remover magnesio e iones carbonato y Borges et al (134) encuentran que el 1% de NaOCl es suficiente para cambiar el comportamiento molecular del contenido inorgánico de la dentina. Esta discrepancia se atribuye a las condiciones de los especímenes para la detección, las pruebas realizadas y la sensibilidad a los parámetros.

En otro estudio se evaluó la estructura química mediante la espectroscopia infrarroja de Fourier de los siguientes grupos: control negativo (sin tratamiento), control positivo (irrigado con hipoclorito de sodio y EDTA), hidróxido de calcio, pasta 2-ATB y pasta 3-ATB, ambos con agua destilada como solvente. Se observó que la pasta 3-ATB disminuía en mayor grado el ratio fosfato/amida que el resto de grupos, lo cual concuerda con los resultados de nuestro estudio pues se aprecia mayor afectación de la estructura química en los grupos tratados con antibiótico (115).

Este y otros estudios sugieren que la pérdida de contenido mineral puede extrapolarse a un aumento de la porosidad, lo cual se relacione con mayor riesgo de fractura y de lesiones de caries futuras.

Es importante tener en cuenta que se precisan más estudios con menos variables y condiciones lo más similares posibles a la clínica. En general, tras haber realizado una revisión sobre este tema hemos visto que las principales variables entre estudios son: antibióticos que forman parte de la pasta 3-ATB y concentración de los mismos, porcentaje y tiempo de irrigación con NaOCl y EDTA, tipo de solvente utilizado. Respecto al tipo de solvente, no hemos encontrado ningún estudio que valore microdureza y Raman con propilenglicol en endodoncia regenerativa, por lo que consideramos que este estudio supone una aportación importante en este ámbito.

Hasta la fecha, ninguno de los estudios clínicos publicados permite enlazar completamente los conceptos de ingeniería tisular. Por otra parte, se trata de procedimientos de revascularización que intentan regenerar los tejidos biológicos en el interior del conducto radicular, sin reproducir necesariamente el complejo pulpo dentinario. Es probable que un método combinado de investigación *in vitro* e *in vivo* haga avanzar en gran medida nuestros conocimientos para regenerar un complejo pulpo-dentinario funcionante.

En base a los resultados de este trabajo, sería adecuado considerar la aplicación del hidróxido de calcio como medicación intraconducto en procedimientos de endodoncia regenerativa, evitando así los posibles efectos secundarios de la pasta 3-ATB (tinciones, sensibilidad, resistencias, etc.). Como hemos podido observar, la afectación sobre la microdureza y la estructura química de la dentina es más rápida con la pasta 3-ATB, sobre todo si se combina con propilenglicol. Serían útiles más estudios que evalúen los solventes con los que se combinan las medicaciones intraconductos y que a parte de los datos anteriores, aporten información sobre la eficacia antimicrobiana de las medicaciones; ya que es un elemento también decisivo en el éxito de la endodoncia regenerativa.

Son varios los factores que consideramos destacables y novedosos en este estudio. Uno de ellos es el uso del timol al 0,1% como medio para la conservación adecuada de los dientes al no alterar la estructura de los mismos. Por otro lado, la realización de pruebas

que no alteran el diente y son fiables como la microdureza y la espectroscopía Raman. Además no hemos encontrado trabajos que en estas condiciones utilizasen el propilenglicol como solvente, cuando su uso es habitual en los procedimientos de endodoncia regenerativa. Tampoco hay estudios previos que evalúen los efectos a este nivel utilizando clindamicina en vez de minociclina.

Consideramos que este trabajo tiene aspectos sujetos a revisión. La edad y el estado previo de los dientes (hábitos, aplicación de fluoruros, etc.) no ha sido estrictamente igual en toda la muestra, pudiendo existir variables en este aspecto. También consideramos que el protocolo de irrigación en procedimientos de endodoncia regenerativa puede influir en la microdureza y estructura química y por tanto habría que valorar la concentración y el tiempo que permanecen los irrigantes en el interior del conducto.

En una futura línea de estudio, sería conveniente complementar estos resultados con la eficacia antimicrobiana de las medicaciones utilizadas para poder dar una información más global del efecto de éstas sobre el diente y aislar el efecto sobre la microdureza y estructura química de los solventes en el tiempo.

Por último, el objetivo final y a largo plazo de los procedimientos de endodoncia regenerativa es conseguir la regeneración completa del órgano dentinopulpar. Son necesarios mayores conocimientos de ingeniería tisular que puedan ayudar al desarrollo en este ámbito. En los dientes con ápices cerrados el tratamiento es más complejo que en el caso de un diente inmaduro con ápice abierto. Este último posee una fuente accesible de células madre y el potencial único de conservar la dentición natural a la vez que se restauran las propiedades del complejo dentinopulpar.

Queda abierta una ventana hacia investigaciones futuras, siempre bajo condiciones controladas y con la precaución necesaria que se debe tener en todo procedimiento aplicable al ámbito clínico.

6 CONCLUSIONES.

1. La microdureza Vickers y la espectroscopía Raman son técnicas adecuadas para el campo de estudio de la odontología por no alterar la muestra, ser específicas y proporcionar resultados fiables.
2. El uso de hidróxido de calcio combinado con agua destilada puede ser una opción viable, con menor riesgo de cambios estructurales y de microdureza, cuando se utiliza como medicación intraconducto.
3. La microdureza de la dentina disminuye en mayor grado cuando se utiliza pasta 3-ATB con propilenglicol como solvente.
4. La estructura química de la dentina se ve más alterada cuando se utiliza la pasta 3-ATB como medicación intraconducto.
5. No existen diferencias significativas en los intervalos de tiempo de 1 mes y 2 meses con el uso de pasta 3-ATB e hidróxido de calcio.
6. El propilenglicol disminuye en mayor grado la microdureza de la dentina que el agua destilada.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental / María Elsa Gómez de Ferraris, Antonio Campos Muñoz. 3rd ed. Médica E, editor. Madrid: Panamericana; 2010.
2. Caballin A, Perea B, De Agustin D, Sánchez J. Valoración de los cambios histológicos pulpaes para la determinación de la data de la muerte. *Científica dental*.2010;7(1):9–13.
3. Pinkham JR, Berg JH. *Pediatric Dentistry: Infancy Through Adolescence*. Pinkham JR, Casamassimo PS, Mc Tighe DJ, editors. 4ªed. Philadelphia: Saunders; 2008.
4. Ikeda H, Tokita Y, Suda H. Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp. *J Dent Res*. 1997;76(7):1341–9.
5. Trowbridge H, Kim S, Suda H. Estructura y funciones del complejo dentino pulpar. En: Cohen S, Burns R, editor. *Las vias de la pulpa*. 8th ed. Doyma: Elsevier; 2008. p. 405–47.
6. Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Correlating the mechanical properties to the mineral content of carious dentine: a comparative study using an ultra-micro indentation system (UMIS) and SEM-BSE signals. *Arch Oral Biol*. 2004;5:369–78.
7. Bergenholtz G. Factors in pulpal repair after oral exposure. *Adv Dent Res*. 2001;15:84.
8. Trope M, Chivian N, Blanco L. Traumatic injuries. In: *Pathways of the pulp*. 10th ed. 2006. p. 610–49.
9. Tjaderhane L. The Mechanism Of Pulpal Wound Healing. *Aust Endod J*. 2012;66:68–71.
10. Ingle, Jhon I, Bakland L. *Endodoncia*. Mexico: Interamericana Mac Graw Hill; 2004.
11. Soares Ilson J, Goldberg F. *Endodoncia. Técnica y Fundamentos*. 2ªed. Buenos Aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana; 2012.
12. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent*. 2014;37(6):212–9.
13. Fuks AB, Peretz B. *Pediatric endodontics : current concepts in pulp therapy for primary and young permanent teeth*. Springer International Publishing Switzerland; 2016.
14. Álvarez Álvarez IM, Ruíz del arbol López J, Cortés Lillo O. *Tratamientos pulpaes en dentición permanente joven*. R López Gómez , editor.

- Odontopediatría. La evolución del niño al adulto joven. Madrid: Ripano; 2012. p. 351–359.
15. Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Dent Traumatol.*1992;8(2):45–55.
 16. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod.* 2013;39(3):319–26.
 17. Cohen S HK. *Pathways of the pulp.* 9th ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2006.
 18. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.*1999;25(3):197–205.
 19. McTigue DJ, Subramanian K. Cases series: management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Pediatr Dent.* 2013;35(1):55–60.
 20. American Association of Endodontics (AAE): *Glossary of Endodontic Terms.* 2016;48.
 21. Rule DC, Winter GB. Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. *Br Dent.* 1966;120(12):586–90.
 22. Selden HS. Apexification: An interesting case. *J Endod.* 2002;28(1):44–5.
 23. Granath L. Some notes on the treatment of traumatized incisors in children. *Odontol Rev.* 1959;10:272.
 24. Nygaard Östby B. The Role of the Blood Clot in Endodontic Therapy an Experimental Histologic Study. *Acta Biomater Odontol Scand.* Vol. 19, 2009.
 25. Fabricius L, Dahlén G, E Holm S, Möller AJR. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res.*1982;90:200–206.
 26. Das S, Das AK MR. Experimental apexogenesis in baboons. *Endod Dent Traumatol.* 1998;13:31–5.
 27. Kaiser H. Management of the wide open apex with calcium hydroxide compounds. Twenty first Annu Meet Am Assoc Endod. 1964.
 28. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc.* 1966;72(1):87–93.
 29. McCormick JE, Weine FS, Maggio JD. Tissue pH of developing periapical lesions in dogs. *J Endod.* 1983;9(2):47–51.
 30. Das S. Apexification in a Nonvital Tooth by Control of Infection. *J Am Dent Assoc.*1980;100(6):880–1.
 31. Steiner JC, Dow PR CG. Inducing root end closure of non vital permanent teeth. *J Dent Child.* 1968;35:47–54.

32. JS B. Apical root -ormation in non-vital immature permanent incisor. Report of a case. *Br Dent J.* 1964;116:166–7.
33. Roberts Jr. SC, Brilliant JD. Tricalcium phosphate as an adjunct to apical closure in pulpless permanent teeth. *J Endod.* 1975;1(8):263–9.
34. Nevins A, Finkelstein F, Laporta R, Borden BG. Induction of hard tissue into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod.* 1978;4(3):76–81.
35. Apical closure induction using bone growth factors and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1996;22(4):198.
36. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod.* 1999;25(1):1–5.
37. Law AS. Considerations for regeneration procedures. *J Endod.* 2013;39:44–56.
38. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp Revascularization of Immature Dog Teeth With Apical Periodontitis. *J Endod.* 2007;33(6):680–9.
39. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT-J. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2010;36(1):56–63.
40. Andreasen JO, Bakland LK. Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. *Dent Traumatol.* 2012;28(1):13–8.
41. Chen M, Chen K-L, Chen C-A, Tayebaty F, Rosenberg P, Lin L. Response of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International endodontic journal.* 2011; 45:294–305.
42. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol.* 2011;27(1):55–8.
43. Banchs F, Trope M. Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? *J Endod.* 2004;30(4):196–200.
44. Bukhari S, Kohli MR, Setzer F, Karabucak B. Outcome of Revascularization Procedure: A Retrospective Case Series. *J Endod.* 2016;42(12):1752–9.
45. Nagata JY, Gomes BPF de A, Rocha Lima TF, Murakami LS, de Faria DE, Campos GR, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod.* 2014;40(5):606–12.
46. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696–704.
47. Huang AH-C, Chen Y-K, Chan AW-S, Shieh T-Y, Lin L-M. Isolation and

- Characterization of Human Dental Pulp Stem/Stromal Cells From Nonextracted Crown-fractured Teeth Requiring Root Canal Therapy. *J Endod.* 2009;35(5):673–81.
48. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998 Mar 1;16:247.
 49. Hausermann P, Scherer Hofmeier K, Weber M, Bircher A. Ciprofloxacin-Induced Acute Generalized Exanthematous Pustulosis Mimicking Bullous Drug Eruption Confirmed by a Positive Patch Test. *Dermatology (Basel, Switzerland).* 2005;211:277–280.
 50. Jappe U, Schnuch A, Uter W. Rosacea and contact allergy to cosmetics and topical medicaments - Retrospective analysis of multicentre surveillance data 1995-2002. *Contact Dermatitis.* 2005;52(2):96–101.
 51. Trope M. Treatment of the Immature Tooth with a Non-Vital Pulp and Apical Periodontitis. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):313–24.
 52. Belobrov I, Parashos P. Treatment of Tooth Discoloration after the Use of White Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2011; 37:1017–1020.
 53. Abu-Tahun I, Torabinejad M. Management of teeth with vital pulps and open apices. *Endodontology.* 2012;23:105–30.
 54. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645–51.
 55. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011;37(2):133–8.
 56. Mitchell RP, Yang SE, Baumgartner JC. Comparison of Apical Extrusion of NaOCl Using the EndoVac or Needle Irrigation of Root Canals. *J Endod.* 2010;36(2):338–41.
 57. D Essner M, Javed A, Eleazer P. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: An in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;12:662–666.
 58. Trevino EG, Henry M, Patwardhan A. The effect of different irrigation solutions on the survival of Stem Cells of the Apical Papilla (SCAP) in a PRP scaffold in human root tips. *Journal of Endodontics.* 2009; 35.
 59. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod.* 2011;37(11):1536–41.
 60. Johns DA, Vidyanath S. Revitalization of Tooth with Necrotic Pulp and Open Apex by Using Platelet-rich Plasma: A Case Report. *J Endod.* 2011;37(6):743.

61. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically Based Treatment of Immature Permanent Teeth with Pulpal Necrosis: A Case Series. *J Endod.* 2008;34(7):876–87.
62. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J.* 2013;46(7):688–95.
63. Luis MCJ. Tesis, Universidad Nacional de San Marcos. 2005;1–83.
64. Pazelli LC, Freitas AC de, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM de, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontológica Bras.* 2003;17(4):367–71.
65. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996;29(2):125–30.
66. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2013;39(3 SUPPL.):S30–43.
67. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatology.* 2001;17:185–187.
68. Chen Y. Clinical Article. 2000;(7):525–9.
69. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod.* 1999;25(11):722–7.
70. Lin S, Levin L, Peled M, Weiss EI, Fuss Z. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with clindamycin or tetracycline. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2003;96(6):751–6.
71. Bascones Martínez A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, Blanco Carrión A, Gay-Escoda C, González Moles MÁ, et al. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9(5):363–76.
72. Nishida M, G. Grossi S, G. Dunford R, W. Ho A, Trevisan M, Genco R. Dietary Vitamin C and the Risk for Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2000; 71:1215–1223.
73. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J.* 2010 Dec;55(4):446–52.
74. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative Endodontic Treatment (Revascularization) of Immature Necrotic Molars Medicated with Calcium Hydroxide: A Case Series. *J Endod.* 2011;37(9):1327–30.
75. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature

- permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: A case report. *J Endod.* 2010;36(6):1086–91.
76. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: A case report. *Int Endod J.* 2009;42(1):84–92.
 77. Consent I, Appointment F. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure Revised 4-12-15. *Aae.* 2015;1–6.
 78. Kim D-S, Park H-J, Yeom J-H, Seo J-S, Ryu G-J, Park K-H, et al. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci.* 2012 May 25;4:109.
 79. Verónica Méndez González, Keilla Cristell Madrid Aispuro, Edith Araceli Amador Lizardi, Daniel Silva-Herzog Flores, Ricardo Oliva Rodríguez. Revascularización en dientes permanentes con ápice inmaduro y necrosis pulpar: Revisión bibliográfica. *Rev ADM.* 2014;71(3):110–4.
 80. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Jun;8(3):172–6.
 81. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: A case series. *J Endod.* 2011;37(9):1327–30.
 82. Zhang K, Kim YK, Cadenaro M, Bryan TE, Sidow SJ, Loushine RJ, et al. Effects of Different Exposure Times and Concentrations of Sodium Hypochlorite/Ethylenediaminetetraacetic Acid on the Structural Integrity of Mineralized Dentin. *J Endod.* 2010;36(1):105–9.
 83. Sauro S, Mannocci F, Tay FR, Pashley DH, Cook R, Carpenter GH, et al. Deproteinization Effects of NaOCl on Acid-etched Dentin in Clinically-relevant vs Prolonged Periods of Application. A Confocal and Environmental Scanning Electron Microscopy Study. *Oper Dent.* 2009;34(2):166–73.
 84. Marshall GW, Yücel N, Balooch M, Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ. Sodium hypochlorite alterations of dentin and dentin collagen. *Surf Sci.* 2001;491(3):444–55.
 85. Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteinization: Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy study. *J Endod.* 2010;36(12):2008–11.
 86. Burns DR, Douglas HB, Moon PC. Comparison of the retention of endodontic posts after preparation with EDTA. *J Prosthet Dent.* 1993;69(3):262–6.
 87. Bystrom A, Sunqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 2007;18(1):35–40.
 88. Abbott P, S Heijkoop P, C Cardaci S, R Hume W, Heithersay G. An SEM Study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. *Int Endod J.* 1991;24:308–316.

89. Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod.*1999;25(1):21–3.
90. Cruz E V., Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J.* 2002;35(4):330–6.
91. Fusayama T. Clinical guide for removing caries using a caries-detecting solution. *Quintessence Int.* 1988;19:397–401.
92. Olitzky I. Antimicrobial Properties of a Propylene Glycol Based Topical Therapeutic *Agent.* *J Pharm Sci.* 1965;54(5):787–8.
93. Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(4):459–64.
94. Criterios de Normalización y Certificación AE. UNE-EN ISO 6507-1: materiales metálicos : ensayo de dureza Vickers. Parte 1, Método de ensayo : (ISO 6507-1:2005) [Internet]. AENOR; 2006.
95. Dana W. Mayo, Foil A. Miller RWH. Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra. 2003. 583p.
96. Tsuda H, Arends J. Raman Spectroscopy in Dental Research: A Short Review of Recent Studies. *Adv Dent Res.* 1997 Nov 1;11(4):539–47.
97. Long DA. Raman spectroscopy. McGraw-Hill International Book Company; 1977.
98. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction to spectroscopy. Cengage Learning; 2008.
99. Ager JW, Nalla RK, Balooch G, Kim G, Pugach M, Habelitz S, et al. On the increasing fragility of human teeth with age: A deep-UV resonance Raman study. *J Bone Miner Res.* 2006;21(12):1879–87.
100. Tsuda H, Ruben J, Arends J. Raman spectra of human dentin mineral. *Eur J Oral Sci.*1996;104:123–31.
101. De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, Moens L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J Raman Spectrosc.* 2007;38(9):1133–47.
102. Chalmers, J. M., Edwards, H. G. M. y Hargreaves MD. Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science. Sons JW&, editor. Chichester (UK); 2012.
103. Mark H, Workman J. 40 - Is Noise Brought by the Stork? Analysis of Noise: Part 1. In: Mark H, Workman J, editors. *Chemometrics in Spectroscopy.* Amsterdam: Academic Press; 2007.223–226.
104. Requena A ZJ. Espectroscopia. Pearson Education; 2004.
105. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontol*

- Rev. 1972;23(1):27–44.
106. Lenzi R, Trope M. Revitalization Procedures in Two Traumatized Incisors with Different Biological Outcomes. *J Endod.* 2012;38(3):411–4.
 107. Toyoshima Y, Fukushima H, Inoue JI, Sasaki Y, Yamamoto K, Katao H, et al. [A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth]. *Shoni Shikagaku Zasshi.* 1988;26(3):449–58.
 108. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis.* 1993;6(6):269–75.
 109. Stobberingh EE, Eggink CO. The value of the bacteriological culture in endodontics. II. The bacteriological flora of endodontic specimens. *Int Endod J.* 1982;15(2):87–93.
 110. Huque J, Kota K, Yamaga M, Iwaku M, Hoshino E. Bacterial eradication from root dentine by ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1998;31:242–50.
 111. Yilmaz S, Dumani A, Yoldas O. The effect of antibiotic pastes on microhardness of dentin. Vol. 32, *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology.* 2015.
 112. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative Endodontic Treatment (Revascularization) for Necrotic Immature Permanent Molars: A Review and Report of Two Cases with a New Biomaterial. *J Endod.* 2011;37(4):562–567.
 113. De-Deus G, Paciornik S, Maurício M. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentin. *Int Endod J.* 2006;39:401–407.
 114. Uzunoglu E, Aktemur S, Uyanik MO, Durmaz V, Nagas E. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid on Root Fracture with Respect to Concentration at Different Time Exposures. *J Endod.* 2012 Aug 1;38(8):1110–1113.
 115. Yassen GH, Eckert JE, Platt JA. Effect of intracanal medicaments used in endodontic regeneration procedures on microhardness and chemical structure of dentin. *Restor Dent Endod.* 2015;40(2):104–112.
 116. Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles. *Caries Res.* 1983;17(5):385–391.
 117. Chávez González B, Santos Almeida I, Queiroz RU. Evaluación De La Dureza Del Esmalte En Dientes Deciduos Assessment of the Enamel Hardness in Deciduous Teeth. *Kiru.* 2011;8(1):2–6.
 118. Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M. Correlation between Microhardness and Mineral Content in Sound Human Enamel (Short Communication). *Caries Res.* 1992;26(2):139–141.
 119. Craig RG, Peyton FA. The Microhardness of Enamel and Dentin. *J Dent Res.*

- 1958;37(4):661–668.
120. Minabe M, Takeuchi K, Kumada H, TZ U. The Effect of Root Conditioning With Minocycline HCl in Removing Endotoxin From the Roots of Periodontally Involved Teeth. *J Periodontol*. 1994;65:387–392.
 121. Maruyama H, Aoki A, Sasaki KM, Takasaki AA, Iwasaki K, Ichinose S, et al. The effect of chemical and/or mechanical conditioning on the Er:YAG laser-treated root cementum: Analysis of surface morphology and periodontal ligament fibroblast attachment. *Lasers Surg Med*. 2008;40(3):211–222.
 122. Bjorvatn K, Olsen HC. The effect of penicillin- and tetracycline-containing medicaments on the microhardness of human dental enamel. An in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 1982;40(5):299–305.
 123. Sahebi S, Moazami F, Abbott P. The effects of short-term calcium hydroxide application on the strength of dentine. *Dent Traumatol*. 2010;26(1):43–46.
 124. Andreasen JO, Munksgaard EC, Bakland LK. Comparison of fracture resistance in root canals of immature sheep teeth after filling with calcium hydroxide or MTA. *Dent Traumatol*. 2006;22(3):154–156.
 125. Rosenberg B, Murray P, Namerow K. The effect of calcium hydroxide root filling on dentin fracture strength. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2007; 23:26–29.
 126. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A Retrospective Evaluation of Radiographic Outcomes in Immature Teeth With Necrotic Root Canal Systems Treated With Regenerative Endodontic Procedures. *J Endod*. 2009;35(10):1343–1349.
 127. Russell AA, (Chris) He LH, Chandler NP. Investigation of Dentin Hardness in Roots Exhibiting the Butterfly Effect. *J Endod*. 2014 Jun 1;40(6):842–844.
 128. Bella J, Brodsky B, Berman HM. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure*. 1995;3(9):893–906.
 129. Freitas AR, Aznar FD, Silva AL, Sales-Peres A, Sales-Peres SH. Assessment of the effects of decontamination and storage methods on the structural integrity of human enamel. *Rev Odontol da UNESP*. 2016;45(1):59–64.
 130. Zimmerli B, Jeger F, Lussi A. Bleaching of nonvital teeth. A clinically relevant literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(4):306–320.
 131. García JG. Análisis químico del esmalte dental humano tratado con una sustancia remineralizante experimental 2015.
 132. Wang T, Feng X, Gao Y, Wang M. Effects of Different Concentrations and Exposure Time of Sodium Hypochlorite on the Structural , Compositional and Mechanical Properties of Human Dentin. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2017;37(4):568–576.
 133. Sakae T, Mishima H, Kozawa Y. Changes in Bovine Dentin Mineral with

Sodium Hypochlorite Treatment. *J Dent Res*. 1988;67(9):1229–34.

134. Borges AFS, Bittar RA, Pascon FM, Sobrinho LC, Martin AA, Puppim Rontani RM. NaOCl effects on primary and permanent pulp chamber dentin. *J Dent*. 2008;36(9):745–753.

8 ANEXOS.

Nº1: Consentimiento informado para los pacientes.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Investigación

CEI Comisión de
Ética de
Investigación

CMM
CAMPUS MARE NOSTRUM

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

D./Dña, de años de edad¹ y con DNI nº.....,

manifiesta que ha sido informado/a sobre la posible utilización del diente extraído por motivos ortodóncicos, periodontales y/u otras circunstancias de salud desfavorables, para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado

"EVALUACION DE LA MICRODUREZA DENTINARIA CON EL USO DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN PROCEDIMIENTOS DE ENDODONCIA REGENERATIVA", realizado por Dña.

Sonia Guzmán Pina, con el fin de investigar acerca de los efectos que los tratamientos intraconducto tienen en la microdureza del diente.

He sido informado/a de las características del proyecto de investigación al que sería sometido mi diente una vez extraído, sin conllevar por tanto ningún perjuicio sobre mi salud y bienestar.

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

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

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO para que mi diente sea utilizado para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Murcia, a dede 2016.

Fdo. D/Dña

¹ En caso de ser menor de edad, deberá acompañarse en todo caso del consentimiento informado expreso de ambos padres.

Nº2: Hoja de información facilitada a los pacientes.

HOJA DE INFORMACIÓN FACILITADA A LOS PARTICIPANTES

NOMBRE DEL ESTUDIO: “EVALUACION DE LA MICRODUREZA DENTINARIA CON EL USO DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN PROCEDIMIENTOS DE ENDODONCIA REGENERATIVA”

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SONIA GUZMÁN PINA (doctoranda/ investigadora)

CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO MORALES MESEGUER

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Murcia, de acuerdo a la legislación vigente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar en él y retirar el consentimiento en cualquier momento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El objetivo de este estudio es investigar el efecto que poseen varios medicamentos intraconducto utilizados en procedimientos clínicos de endodoncia regenerativa para valorar cómo afectan a la microdureza del diente en distintos periodos de tiempo.

Para ello se utilizarán dientes unirradiculares (una sola raíz) que precisen ser **extraídos por motivos ajenos a este estudio** (ortodóncicos, periodontales y/u otras condiciones desfavorables para la salud). Una vez extraídos serán almacenados en condiciones adecuadas para la valoración posterior de la microdureza, mediante una máquina de dureza Vickers.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El estudio se realiza *in vitro*, por lo que no supone un procedimiento invasivo del paciente. Participar en el estudio no conlleva ningún efecto beneficioso ni perjudicial sobre la salud del paciente.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, y en su reglamento de desarrollo. De

acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Debido a las características de este estudio, no se precisa recoger ni utilizar ningún dato personal, de tal manera que será imposible identificarle.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto ni ninguna compensación económica.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, si bien los responsables del estudio podrán seguir utilizando los dientes suyos recogidos hasta ese momento, a no ser que usted se oponga expresamente.

**Nº3: Informe favorable de la Comisión de ética e investigación de la
universidad de Murcia.**

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Investigación

CEI Comisión de
Ética de
Investigación

CAMPUS MARE NOSTRUM

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

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

CERTIFICA:

Que D^a. Sonia Guzmán Pina ha presentado la Tesis Doctoral titulada
*"Evaluación de la microdureza dentinaria con el uso de medicamentos
utilizados en procedimientos de endodoncia regenerativa"*, dirigida por
la Dr^a. D^a. Olga Cortés Lillo, la Dr^a. D^a. M^a. Antonia Alcaina Lorente y
el Dr. D. Juan Ramón Boj Quesada, a la Comisión de Ética de
Investigación.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de
conformidad con lo acordado el día 15 de abril de 2016¹, por
unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de
vista ético de la investigación.

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

Vº Bº

EL PRESIDENTE EN FUNCIONES
DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE
INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Emilio Martínez Navarro

ID: 1278/2016

1 A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de
noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C.
(B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de
aprobación

