



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Biocompatibilidad y bioactividad de materiales
para terapia vital pulpar.*

AUTOR/A Alejandro Mora Martínez

DIRECTOR/ES Sergio López García
Laura Murcia Flores
Francisco Javier Rodríguez Lozano

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Biocompatibilidad y bioactividad de materiales
para terapia vital pulpar.*

AUTOR/A Alejandro Mora Martínez

DIRECTOR/ES Sergio López García
 Laura Murcia Flores
 Francisco Javier Rodríguez Lozano

2025



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

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Alejandro Mora Martínez, habiendo cursado el Programa de Doctorado Integración y Modulación de Señales en Biomedicina de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Biocompatibilidad y bioactividad de materiales para terapia vital pulpar

y dirigida por:

D.: Sergio López García
D^a.: Laura Murcia Flores
D.: Francisco Javier Rodríguez Lozano

DECLARO QUE:

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

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

Murcia, a 04 de septiembre de 2025

(firma)

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

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis: Francisco Javier Rodríguez Lozano, Sergio López García y Laura Murcia Flores, ejemplos de personas que desprenden entusiasmo por la investigación, y que siempre me han tendido la mano cuando más lo he necesitado durante este bonito camino doctoral.

En especial, gracias a mi tutor y director de tesis Francisco Javier Rodríguez Lozano por ser una persona admirable, ejemplo de sabiduría, que desde el principio me ha sabido inculcar esa lucha incansable hasta lograr los objetivos propuestos; gracias por creer siempre en mí y por saber guiarme cuando ha sido necesario.

Gracias Sergio López García, por ser mi guía durante toda mi aventura experimental, por tu paciencia infinita explicándome todos los procedimientos, y por todos los cafés que me han hecho descubrir esa gran persona que hay en ti.

Gracias Isabel, por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todos mis objetivos y por ser un gran reflejo de autosuperación y perseverancia; pero sobre todo gracias por ayudarme a desconectar cuando más lo he necesitado.

Ante todo, quisiera dedicar este trabajo a mi familia, gracias a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional y su paciencia ante mis frustraciones; por ser reflejo de bondad y trabajo, pero sobre todo por ser los pilares fundamentales de mi vida. Gracias a mis abuelos/as, sois ejemplo de vida, gracias por vuestro cariño, y por inculcarme desde pequeño la importancia de la constante formación. Por último, un recuerdo al cielo para mi abuelo Antonio, que seguro que como siempre, sigue disfrutando de mis logros académicos.

Sin todos vosotros este camino no habría sido posible, os estaré eternamente agradecido.

FINANCIACIÓN

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

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. ANATOMÍA DENTARIA.....	16
1.2. HISTOFISIOLOGÍA PULPAR.....	17
1.2.1. ESTRUCTURA MORFOLÓGICA	17
1.2.2. COMPONENTES	19
1.2.3. MECANISMO DE RESPUESTA.....	22
1.3. CÉLULAS MADRE	26
1.3.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	26
1.3.2. CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE LA REGIÓN ORAL Y MAXILOFACIAL	28
1.4. TERAPIA VITAL PULPAR	30
1.4.1. DIAGNÓSTICO	31
1.4.2. PROCEDIMIENTOS	32
1.4.3. MATERIALES	33
1.5. CONCEPTOS DE BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.1. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS	41
3.2. TRIPSINIZACIÓN.....	42
3.3. RECUENTO CELULAR	43
3.4. ENSAYOS EXPERIMENTALES	44
3.4.1. PREPARACIÓN DE LOS ELUATOS DE CADA MATERIAL	44
3.4.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR	45
3.4.3. MIGRACIÓN CELULAR.....	46
3.4.4. INMUNOFLUORESCENCIA	47
3.4.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	49
3.4.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE	51
3.4.7. MEDICIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS	51
3.4.8. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE ÓXIGENO INTRACELULAR	52
3.4.9. EXPRESIÓN DE MARCADORES OSTEO-ODONTOGÉNICOS	53

3.4.10.	ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE DEPÓSITOS CÁLCICOS	56
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
4.	RESULTADOS	61
4.1.	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT).....	61
4.2.	ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR	63
4.3.	ENSAYO DE FLUORESCENCIA.....	65
4.4.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	66
4.4.1.	MORFOLOGÍA CELULAR Y ADHESIÓN A LOS MATERIALES	66
4.4.2.	ESPECTROMETRÍA DISPERSIVA DE RAYOS X.....	67
4.5.	ENSAYO DE ICP-MS.....	69
4.6.	ENSAYO DE APOPTOSIS/NECROSIS CELULAR	70
4.7.	ENSAYO DE LA LIBERACIÓN DE ROS	72
4.8.	ENSAYO RT-QPCR	73
4.9.	ENSAYO DE MINERALIZACIÓN.....	76
5.	DISCUSIÓN.....	79
5.1.	MANTENIMIENTO DE LA VITALIDAD PULPAR	79
5.2.	USO DE MATERIALES EN TERAPIA PULPAR VITAL	80
5.3.	SOBRE EL MÉTODO <i>IN VITRO</i>	80
5.4.	SOBRE EL USO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL	82
5.5.	SOBRE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR.....	83
5.6.	SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR	85
5.7.	SOBRE EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO POR INMUNOFUORESCENCIA.....	87
5.8.	SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS MATERIALES Y SU RELACIÓN EN LA ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR.....	89
5.9.	SOBRE EL ICP-MS.....	91
5.10.	SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR.....	93
5.11.	SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS.....	95
5.12.	SOBRE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	96
5.13.	SOBRE LA FORMACIÓN DE NÓDULOS CALCIFICADOS.....	98
5.14.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	100
5.15.	PERSPECTIVAS FUTURAS	101
6.	CONCLUSIONES	103
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
8.	ANEXOS	126

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: La caries dental es una de las afecciones más prevalentes a nivel mundial, así como la principal causa de pulpitis; tras la exposición de la dentina, los túbulos dentinarios actúan como canales de difusión favoreciendo el acceso de las bacterias desde la superficie del diente hasta la pulpa. Sin embargo, la pulpa presenta varios mecanismos de respuesta básicos donde las células madre de la pulpa dental (DPSCs), tienen un rol transcendental debido a su capacidad de proliferación y de diferenciación a odontoblastos, apareciendo así el concepto de terapia pulpar vital (VPT); que busca tanto la conservación de la vitalidad de la pulpa, como su estimulación para conseguir la regeneración del complejo dentino-pulpar. Por lo que parte del éxito de tales tratamientos, depende de las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad presentadas por los materiales empleados.

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue evaluar la biocompatibilidad y bioactividad de tres materiales basados en silicato de calcio, frente a células madre de pulpa dental.

Material y Métodos: Los materiales empleados para su análisis fueron MTA Angelus, TheraCal PT y Biodentine XP. Para el estudio de las propiedades tanto de biocompatibilidad como de bioactividad se llevaron a cabo un total de 10 ensayos: análisis de la viabilidad celular (MTT) (24, 48 y 72 horas), ensayo de migración celular (24, 48 y 72 horas), inmunofluorescencia (72 horas), estudio de la morfología y adhesión celular a los materiales, espectrometría dispersiva de rayos X (EDX), análisis de la liberación de iones de los materiales (ICP-MS), ensayo de apoptosis/necrosis celular, análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), evaluación de la expresión de marcadores osteo-odontogénicos de las DPSCs (3 y 7 días), así como el análisis de su potencial de mineralización (21 días). El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA unidireccional y la prueba post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados: Los resultados muestran como TheraCal PT sin diluir presenta una menor actividad metabólica celular respecto al control, así como una menor capacidad de migración celular, en cambio MTA Angelus y Biodentine XP reflejan resultados óptimos semejantes al control. Del mismo modo los mejores resultados en cuanto a adhesión y

morfología celular fueron los observados para MTA Angelus y Biodentine XP, siendo este último quien mayor cantidad de calcio mostró tras el análisis EDX, y el material con menor tasa tanto de apoptosis/necrosis celular como de liberación de especies reactivas de oxígeno. En cuanto a las propiedades bioactivas, Biodentine XP mostró una regulación significativa de los marcadores osteo-odontogénicos, ALP y DSPP, en comparación con los grupos control; así como una formación de nódulos calcificados claramente superior en comparación con el resto de materiales.

Conclusiones: Los hallazgos del estudio muestran como los materiales basados en silicato de calcio mejoran las propiedades biológicas y el potencial de mineralización de las DPSCs. Especialmente, el nuevo Biodentine XP presentó resultados especialmente favorables en comparación con el resto de materiales, aunque semejantes a los mostrados por MTA Angelus, siendo TheraCal PT el material con resultados ligeramente inferiores en cuanto a biocompatibilidad y bioactividad.

PALABRAS CLAVE

Bioactividad, citotoxicidad, cementos basados en silicato de calcio, células madre de la pulpa dental, terapia vital pulpar.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Dental caries is one of the most prevalent conditions worldwide, as well as the main cause of pulpitis; after exposure of the dentine, the dentinal tubule act as diffusion channels favouring the access of bacteria from the tooth surface to the pulp. However, the pulp presents several basic response mechanisms where dental pulp stem cell (DPSCs) play a transcendental role due to their ability to proliferate and differentiate into odontoblasts, thus giving rise to the concept of vital pulp therapy (VPT), which seeks both to preserve the vitality of the pulp and to stimulate it to achieve regeneration of the dentin-pulp complex. Therefore, part of the success of such treatments depends on the biocompatibility and bioactivity properties of the materials used.

Objective: The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and bioactivity of three calcium silicate-based materials against dental pulp stem cells.

Material and Methods: The materials used for analysis were MTA Angelus, TheraCal PT and Biodentine XP. For the study of both biocompatibility and bioactivity properties, a total of 10 assays were carried out: cell viability analysis (MTT) (24, 48 and 72 hours), cell migration assay (24, 48 and 72 hours), immunofluorescence (72 hours), study of cell morphology and adhesion to the materials, X-ray dispersive spectrometry (EDX), ion release analysis of the materials (ICP-MS), cell apoptosis/necrosis assay, analysis of the production of reactive oxygen species (ROS), evaluation of the expression of osteo-odontogenic markers of the DPSCs (3 and 7 days), as well as analysis of their mineralisation potential (21 days). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0,05$).

Results: The results show that, compared to the control, undiluted TheraCal PT exhibits lower cell metabolic activity and cell migration capacity, while MTA Angelus and Biodentine XP demonstrate results that are similar to the control. Similarly, MTA Angelus and Biodentine XP produced the best results in terms of cell adhesion and morphology. The latter showed the highest amount of calcium after EDX analysis and was the material with the lowest rate off cell apoptosis/necrosis and reactive oxygen species release. In terms of bioactivity, Biodentine XP significantly regulated the osteo-odontogenic

markers ALP and DSPP compared to the control groups and clearly promoted higher calcified nodule formation than the other materials.

Conclusions: The study's findings show calcium silicate-based materials can enhance the biological properties and mineralisation potential of DPSCs. The new Biodentine XP in particular showed favourable results, similar to those MTA Angelus, though slightly lower than TheraCal PT in terms of biocompatibility and bioactivity.

KEY WORDS

Bioactivity, cytotoxicity, calcium silicate-based cements, dental pulp stem cells, vital pulp therapy.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D.

AAE: Asociación Americana de Endodoncistas.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADSCs: Células madre del tejido adiposo.

ARN: Ácido ribonucleico.

CM-H₂DCFDA: 5-(γ-6)-clorometil-2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato.

CMMs: Células madre mesenquimales.

CMs: Células madre.

Col1A1: Colágeno tipo 1.

CSCs: Cementos basados en silicato de calcio.

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

DE: Desviación estándar.

DFSCs: Células madre del folículo dental.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPSCs: Células madre de la pulpa dental.

DSPP: Sialofosfoproteína dentinaria.

EDX: Espectrometría dispersiva de rayos X.

ESE: Sociedad Europea de Endodoncia.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FTIR-ATR: Espectroscopía de infrarrojo con transformadora de Fourier por reflectancia total atenuada.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GMSCs: Células madre derivadas del tejido gingival.

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

LTA: Ácido lipoteicoico.

MSC: Células mesenquimales estromales.

MTA: Agregado trióxido mineral.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo.

OBMSCs: Células madre derivadas de la médula ósea de los huesos orofaciales.

OESCs: Células madre del tejido oral epitelial.

ON: Osteonectina.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Tampón fosfato salino

PDLSCs: Células madre del ligamento periodontal.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones.

PSCs: Células madre derivadas del periostio.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa.

RUNX2: Factor de transcripción involucrado en la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética.

SaOS-2: Células de sarcoma osteogénico humano.

SCAP: Células madre de la papila apical.

SEM: Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy).

SGSCs: Células madre derivadas de las glándulas salivales.

SHED: Células madre de dientes deciduos exfoliados.

SMCs: Células madre de la membrana de Schneider.

TGPCs: Células madre del germen dental.

TLR: Receptores tipo Toll.

VPT: Terapia vital pulpar.

XRD: Análisis de difracción de rayos X.

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A. Esquema de los tejidos dentarios. B. Microfotografía del complejo dentinopulpar.

Figura 2: Estructura morfológica de las cuatro capas de la pulpa dental madura.

Figura 3: A. Imagen histológica de una caries moderada, con dentina desorganizada y pérdida de la estructura tubular en la zona cariada. B. Barrera pulpo-dentinaria formada por dentina terciaria.

Figura 4: Imagen esquemática de la formación de dentina terciaria.

Figura 5: Características de las células madre mesenquimales.

Figura 6: Localización de células madre procedentes de la región oral y maxilofacial.

Figura 7: Procedimientos de terapia vital pulpar.

Figura 8. Cabina de seguridad Telstar BIO II A.

Figura 9. Centrífuga.

Figura 10. Incubadora.

Figura 11. Contador celular automático.

Figura 12. Espectrofotómetro INFINITE 200 PRO.

Figura 13. Microscopio de contraste de fases invertido.

Figura 14. Preparación de la cabina para la realización del experimento.

Figura 15. Agitador orbicular.

Figura 16. Microscopio de contraste de fases con fluorescencia.

Figura 17. Espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Figura 18. My iQ, sistema de detección de PCR en tiempo real.

Figura 19. Preparación de los pocillos con Alizarin Rojo S.

Figura 20. Placa preparada para la lectura de absorbancia.

Figura 21. Proliferación celular tras la aplicación de los materiales sin diluir.

Figura 22. Proliferación celular tras la aplicación de los materiales diluidos 1:2.

Figura 23. Proliferación celular tras la aplicación de los materiales diluidos 1:4.

Figura 24. Evolución de la migración celular tras la exposición de las DPSCs a los diferentes eluatos de los materiales de estudio (1:1, 1:2 y 1:4). El porcentaje de herida abierta se capturó en intervalos de 24 horas durante 3 días, en relación el porcentaje total de herida abierta a las 0 horas. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Adicionalmente, las imágenes muestran el área de herida abierta (escala 100 μm).

Figura 25. Observación de la estructura y organización del citoesqueleto y el núcleo celular de las DPSCs mediante microscopia de fluorescencia confocal, tras el cultivo con los tres materiales de estudio durante 72 horas.

Figura 26. Micrografías tomadas a 100x, 300x y 1500x de la morfología y adhesión celular de las DPSCs cultivadas sobre los materiales de estudio.

Figura 27. Espectrometría de los discos de MTA Angelus (A), TheraCal PT (B), y Biodentine XP (C). En la primera columna se muestran micrografías de la superficie de los materiales, en la segunda columna aparece el espectro de los elementos detectados y en la tercera se cuantifican los elementos de cada material por peso y peso atómico.

Figura 28. Análisis de la citometría de flujo de la apoptosis y necrosis celular inducida por los tres materiales de terapia vital pulpar en DPSCs mediante la tinción con Anexina-V-FITC y 7-AAD.

Figura 29. Análisis de la liberación de ROS en presencia de los materiales sobre DPSCs empleando CM-H₂DCFDA. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 30. Expresión de marcadores osteo-odontogénicos por parte de las DPSCs tras su cultivo junto a los materiales de estudio, y posteriormente analizadas mediante RT-qPCR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 31. Resultados de la tinción con Alizarin Rojo S para el estudio de la formación de nódulos mineralizados por parte de las DPSCs cultivadas junto a los materiales y a los grupos control, analizadas en el día 21. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los materiales empleados.

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados para el estudio.

Tabla 3: Resultados del análisis de ICP-MS de los materiales.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA DENTARIA

La estructura dental está compuesta de tres tejidos calcificados: esmalte, dentina y cemento, que se encuentran rodeando a un cuarto tejido, la pulpa; un tejido conectivo laxo, carente de mineralización, situado en la zona central del diente (Figura 1a) (1).

A nivel embriológico, el esmalte es el único de los cuatro tejidos que procede del ectodermo; puesto que tanto el cemento, como la dentina y la pulpa, presentan origen mesodérmico, es por ello que a nivel histofisiológico y clínico, la dentina y la pulpa son consideradas como un único conjunto, denominado complejo dentinopulpar (Figura 1b), responsable de la función formativa, sensorial, nutritiva y defensiva del diente (2, 3). Para facilitar la comprensión se analizará cada tejido por separado.

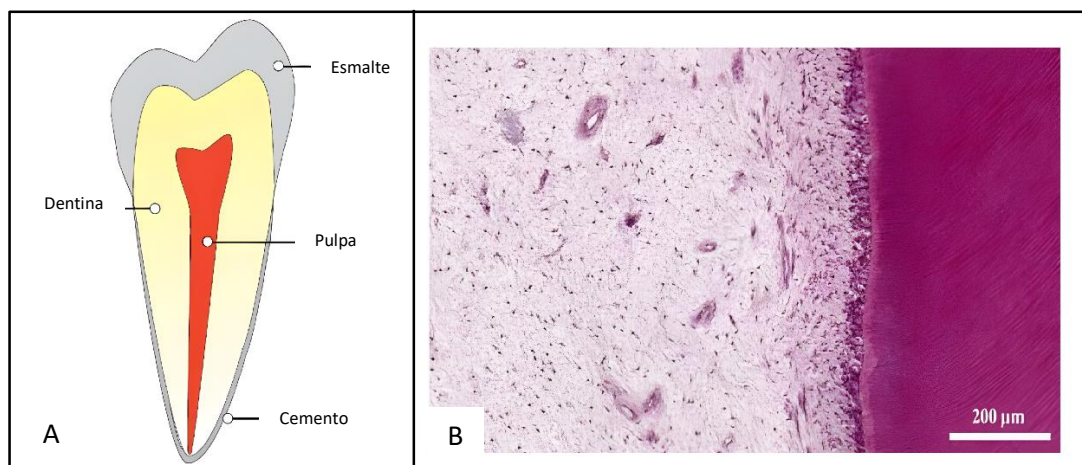


Figura 1: A, Esquema de los tejidos dentarios. Tomado de *Patología y terapéutica dental*, de García Barbero (2). B, Microfotografía del complejo dentinopulpar. Tomado de *Galler y cols* (4).

El esmalte es la parte más externa del diente. Se trata de una capa acelular situada alrededor de la corona anatómica, con un color blanco azulado semitransparente. Contiene alrededor de un 95% de componente mineralizado de cristales de apatita, hecho que le hace ser considerado como la sustancia más dura del cuerpo. Sus dos principales funciones son: ayudar a la masticación y proteger a los tejidos subyacentes (1, 2, 5).

La dentina es un tejido duro, de color amarillento que posee cierta viscoelasticidad, y que constituye la mayor parte del diente. Posee una cantidad de material inorgánico cercana al 70%, por lo que es el tejido encargado de darle al diente la rigidez y la forma necesaria. En cuanto a su disposición dental, la dentina se encuentra rodeada por el esmalte a nivel coronal y por el cemento a nivel radicular. Además, a nivel interno la dentina rodea a la cavidad pulpar (1, 2, 6).

El cemento es un tejido carente de vascularización e inervación, de color amarillo opaco, que se encuentra recubriendo la parte externa de las raíces de los dientes. Su principal función es proporcionar fijación a las fibras colágenas del ligamento periodontal. Su contenido mineral es notablemente inferior al del esmalte y la dentina, situándose en un 65% (1, 2).

La pulpa dental es un tejido blando carente de mineralización. Se localiza tanto en la corona formando parte de la cámara pulpar, como en la zona radicular en el interior de los conductos radiculares. Gracias a la pulpa, a través de los forámenes apicales, el diente recibe la correspondiente vascularización e inervación para que las piezas dentales presenten una correcta vitalidad (1, 4).

1.2. HISTOFISIOLOGÍA PULPAR

La pulpa dental está formada por una combinación de células, fibras y sustancia fundamental, así como por una red de vasos sanguíneos y tejido nervioso; la configuración de estos elementos varía en función de la región específica de la pulpa. En individuos jóvenes, la pulpa contiene aproximadamente un 75% de agua y un 25% de materia orgánica; proporciones que se ven modificadas con el paso de los años, debido tanto a la reducción del contenido acuoso como al incremento de células (7).

1.2.1. ESTRUCTURA MORFOLÓGICA

La pulpa dental madura se divide en cuatro zonas que van desde la dentina hasta la zona central pulpar, por lo que según su morfología se pueden observar las siguientes capas (Figura 2) (7):

- Capa odontoblástica: es la zona más externa de la pulpa, se ubica inmediatamente debajo de la predentina, y posee una línea epitelial que actúa como mecanismo de revestimiento. Entre los componentes de dicha capa se encuentran los cuerpos celulares de los odontoblastos, los capilares, las fibras nerviosas y las células dendríticas. Además, la capa odontoblástica presenta una alta especialización ya que participa en la síntesis y liberación de los componentes orgánicos de la dentina (8).
- Capa oligocelular: también llamada zona “acelular” de Weil o capa basal de Weil, es una zona relativamente libre de células, atravesada por prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos, fibras nerviosas amielínicas y capilares (2, 8). Esta región puede no ser visible en aquellos casos en los que la pulpa se haya formado rápidamente, como por ejemplo en pulpas jóvenes; o en casos de pulpas viejas que poseen altas cantidades de dentina (9).
- Zona rica en células: se encuentra justamente bajo la zona oligocelular, está compuesta por una mayor cantidad de fibroblastos que la zona pulpar central, y además posee diferentes componentes celulares como los macrófagos y linfocitos. En esta zona, se pueden encontrar células mesenquimatosas indiferenciadas, que en casos de daños irreversibles en los tejidos, se desplazarán para sustituir a los odontoblastos (8, 9).
- Zona central: está formada por tejido conectivo laxo que contiene fibras colágenas y sustancia fundamental, así como numerosos vasos sanguíneos y nervios, que constituyen la pulpa dental propiamente dicha (7, 8).

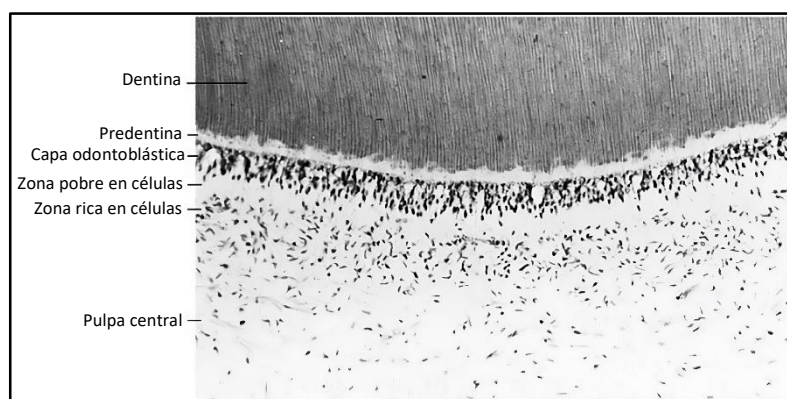


Figura 2: Estructura morfológica de las cuatro capas de la pulpa dental madura.

Tomado de *Vías de la Pulpa de Cohen y cols* (9).

1.2.2. COMPONENTES

La pulpa dental está compuesta por múltiples elementos que influyen en el mecanismo de respuesta del complejo dentino-pulpar, por lo que a continuación se pasan a desarrollar los componentes de los que consta una pulpa dental sana.

1.2.2.1. CÉLULAS PULPARES

La pulpa dental postnatal está formada por poblaciones celulares heterogéneas, responsables de la defensa, mantenimiento y reparación celular (10). Dentro de dicha heterogeneidad, los fibroblastos son la estirpe celular predominante, aunque también destacan otras células como los odontoblastos, macrófagos, células mesenquimales indiferenciadas, células dendríticas, linfocitos y mastocitos (11).

A. ODONTOBLASTOS

Los odontoblastos son células altamente especializadas que recubren la parte más periférica de la pulpa, desde donde emiten prolongaciones citoplasmáticas que se extienden desde la predentina hasta la dentina. Dichas células presentan una morfología y altura variable por lo que sus núcleos se observan de forma escalonada a distintos niveles, formando una capa “en empalizada” (2, 4, 9). Estas células, tienen como principal función, participar en el proceso de dentinogénesis, tanto en la etapa de desarrollo dental como en el diente adulto (8). No obstante, los odontoblastos también tienen otras funciones, como actuar de barrera protegiendo a los tejidos subyacentes de las bacterias invasoras (11); así como la producción de colágeno tipo I, sialoproteína dentinaria, proteoglicanos y fosfatasa alcalina (8).

B. FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son las células más abundantes del tejido pulpar. Se encuentran distribuidos por toda la pulpa, aunque se concentran a nivel coronal, en la zona rica en células (2, 9). Los fibroblastos participan tanto en la síntesis y conservación de las proteínas de la matriz extracelular, como en la secreción de proteoglicanos, glucosaminoglicanos y fibras colágenas tipo I y III; por lo que se encargan de asegurar el recambio de colágeno en la pulpa (9, 12, 13).

C. MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células que derivan de los monocitos que circulan por el torrente sanguíneo y al llegar a los tejidos se diferencian en macrófagos. En la pulpa dental dichas células se sitúan en la zona central cerca de los vasos sanguíneos (2, 9). Los macrófagos actúan como células inmunitarias indispensables en el proceso inflamatorio, ya que participan en la modulación de la respuesta inmune, en la presentación de antígenos, y en procesos de transporte celular como la endocitosis y fagocitosis (14, 15).

D. CÉLULAS MESENQUIMALES INDIFERENCIADAS

Las células mesenquimales indiferenciadas proceden del ectomesénquima. Son fundamentales para la función a largo plazo del diente, ya que tienen la capacidad de diferenciarse en otras células como odontoblastos, fibroblastos o macrófagos. Las células mesenquimales indiferenciadas se localizan tanto en la zona rica en células como en la propia pulpa central; sin embargo, con los años, la cantidad de dichas células disminuye, lo que a su vez reduce el potencial regenerativo de la pulpa (2, 16, 17).

E. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son elementos accesorios del sistema inmune. Actúan como células presentadoras de antígeno, siendo determinantes en el inicio de la respuesta inmunitaria. También son fundamentales como nexo entre la respuesta innata y adaptativa (18, 19). En condiciones normales se localizan en áreas próximas a la predentina, como la capa odontoblástica, pero al recibir estímulos antigénicos, las células dendríticas migran al centro pulpar para participar en la respuesta inmune (9, 16).

F. LINFOCITOS

Los linfocitos son células de defensa imprescindibles junto con los macrófagos y las células dendríticas, para el inicio la respuesta celular inmunitaria. En casos de pulpa sana, predominan los linfocitos T, principalmente los del subgrupo T8; siendo la cantidad de linfocitos B muy escasa ante la ausencia de inflamación pulpar, en cambio, ante procesos inflamatorios el número de linfocitos B se presenta notablemente elevado (2, 9).

G. MASTOCITOS

Los mastocitos son células que rara vez se observan en la pulpa en situaciones de normalidad, pero que se pueden activar ante reacciones inflamatorias, liberando de sus gránulos, principalmente histamina, que actúa como mediador de la respuesta inflamatoria (9, 20).

1.2.2.2. FIBRAS DE LA PULPA DENTAL

En la pulpa dental se encuentran tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares; siendo predominantes las fibras colágenas de tipo I, seguidas, aunque en menor medida, por las de tipo III; ambas localizadas en la zona apical pulpar. En cambio, las fibras elásticas, se concentran principalmente alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos aferentes; y por último, las fibras reticulares se observan especialmente en pulpas jóvenes (2).

1.2.2.3. SUSTANCIA FUNDAMENTAL

La sustancia fundamental de la pulpa dental está compuesta principalmente por proteoglicanos, y en menor medida por glucosaminoglicanos, colágeno, elastina, interleucina-1 y fibronectina (21). Sus funciones son proporcionar soporte a los componentes celulares y facilitar el transporte de nutrientes (2).

1.2.2.4. VASCULARIZACIÓN SANGUÍNEA Y LINFÁTICA

La pulpa es un tejido con una alta vascularización sanguínea procedente principalmente de la arteria maxilar (16). En condiciones fisiológicas normales, las arteriolas acceden a la pulpa a través de los forámenes apicales y una vez alcanzan la zona central se ramifican hacia los cuernos pulpares, dando lugar a un extenso plexo capilar subodontoblástico; donde algunos capilares pueden llegar a extenderse entre los odontoblastos y llegar a la zona de la predentina. Finalmente, el flujo sanguíneo pasa de los capilares a las vénulas produciéndose el intercambio de sustancias (2, 7, 21, 22). No obstante, en la pulpa dental no solo existe vascularización sanguínea, sino que también se produce irrigación linfática. De este modo, pequeños vasos se unen en uno o dos más grandes que salen de la pulpa por los forámenes apicales (2).

1.2.2.5. INERVACIÓN

Las fibras nerviosas acceden a la pulpa dental a través de los forámenes apicales o de los canales accesorios. Estas fibras proceden de las fibras aferentes del trigémino y de las ramas simpáticas del ganglio cervical superior, por lo que aportan tanto la inervación sensitiva como autónoma al diente. Intervienen fibras C, amielínicas, y en menor medida las fibras A, mielínicas (2, 16, 23, 24). La distribución de las fibras A y C varía en función de la zona del diente. Así, las fibras A se suelen localizar en los cuernos pulpaes mientras que las C, se ubican mayoritariamente en la pulpa central (2, 16).

1.2.3. MECANISMO DE RESPUESTA

Como se ha desarrollado anteriormente a lo largo de los componentes de la pulpa, dicho tejido presenta una alta vascularización e inervación. Sin embargo, al estar encapsulada por el esmalte y la dentina, posee una baja distensibilidad (25). Se trata de un tejido vulnerable ante infecciones e inflamaciones bacterianas. No obstante, dispone de mecanismos de defensa, como el aumento de la presión tisular interna en la cámara pulpar, que produce la salida de fluido a través de los túbulos dentinarios que hayan resultado expuestos, protegiendo a la pulpa de la entrada de sustancias nocivas (26-28).

Aunque la inflamación pulpar puede activarse como respuesta a agentes bacterianos, físicos o químicos; los estudios han demostrado que las bacterias son fundamentales para que se desencadene el proceso inflamatorio (21). Su vía de acceso principal es por medio de caries y filtraciones marginales; no obstante, existen otras vías como son los traumatismos, las anomalías dentales, y la iatrogenia dental (16, 29).

Actualmente, la caries dental es una de las afecciones más prevalentes a nivel mundial, así como la principal causa de pulpitis (30). Una vez se rompe la integridad del esmalte, se produce una exposición de dentina, donde los túbulos actúan como canales de difusión, favoreciendo el acceso de las bacterias, desde la superficie del diente hasta la pulpa (31). Si no se controla la proliferación bacteriana se pueden desencadenar cuadros de pulpitis, necrosis y periodontitis apical (30, 32).

No obstante, como mecanismo de respuesta para proteger a la pulpa frente a la invasión bacteriana, tienen lugar tres reacciones básicas: esclerosis tubular, dentinogénesis terciaria y reacciones inmuno-inflamatorias (9).

1.2.3.1. ESCLEROSIS TUBULAR

La esclerosis tubular es la reacción defensiva más común del complejo dentino-pulpar. Consiste en la disminución progresiva de la permeabilidad tubular, debido al depósito centrípeto de una combinación de cristales de apatita y fibras colágenas dentinarias a lo largo de los túbulos dentinarios. De este modo se consigue aislar la pulpa de la invasión bacteriana (2, 4, 33, 34).

1.2.3.2. DENTINOGENÉNESIS TERCIARIA

La dentinogénesis terciaria es un proceso a partir del cual se forma dentina terciaria, a través de una serie de eventos moleculares, entre los que se encuentran las vías de señalización celular de la familia MAPK, TFG- β /Smad, NF- κ B, Wnt-Catenina y PI3K/AKT/mTor. Dichas vías participan tanto en el mecanismo de diferenciación de las células madre pulpares, como en la dentinogénesis terciaria (35). Así, tienen un destacado papel en la inducción de la actividad secretora de los odontoblastos, formando un tejido mineralizado que actúa de barrera en la interfase pulpo-dentinaria, cuyo espesor es directamente proporcional a la intensidad y duración del estímulo (Figura 3) (2, 4, 21, 36, 37).

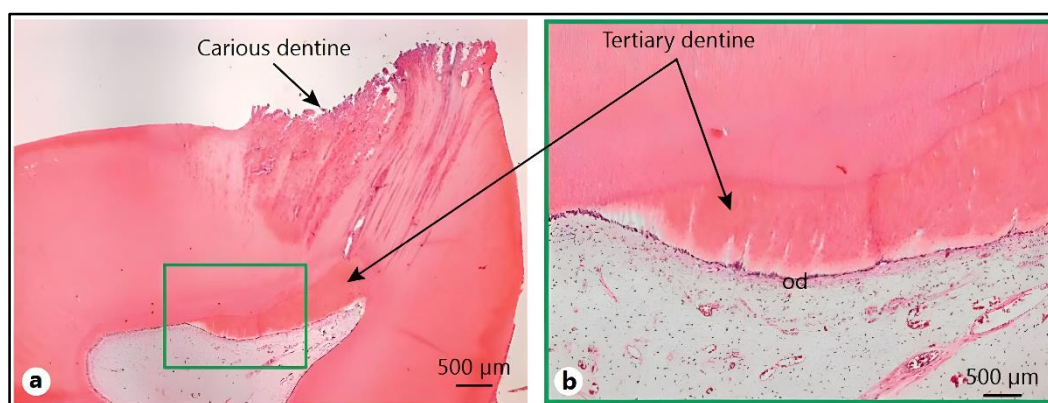


Figura 3: A, Imagen histológica de una caries moderada, con dentina desorganizada y pérdida de la estructura tubular en la zona cariada. B, Barrera pulpo-dentinaria formada por dentina terciaria. Tomado de *Conrads y About* (38).

En función de la intensidad del estímulo, se pueden distinguir dos tipos de dentina terciaria (Figura 4). En caso de estímulos leves se formará dentina terciaria reaccional o reactiva, caracterizada por presentar una estructura tubular altamente organizada, sintetizada por los odontoblastos supervivientes a la agresión; si por el contrario el estímulo es más intenso, y conlleva el daño o la destrucción de los odontoblastos, se formará una dentina reparativa atubular con una estructura más amorfa, producida a partir de neodontoblastos o células odontoblastoides (2, 4, 37).

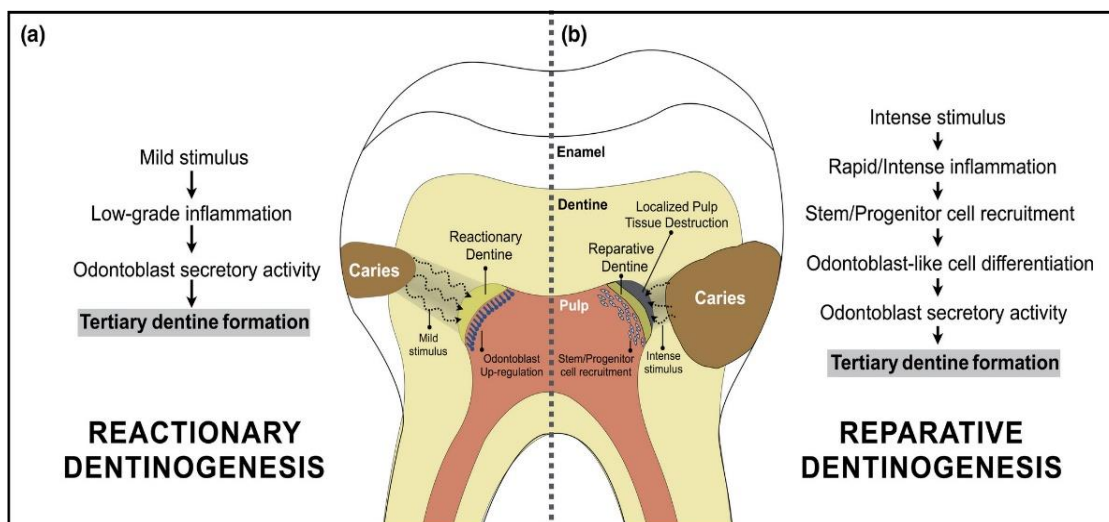


Figura 4: Imagen esquemática de la formación de dentina terciaria. (35).

Sin embargo, pueden haber casos en los que la síntesis de dentina terciaria no sea suficiente y las bacterias consigan destruirla, llegando a la pulpa y desencadenando una reacción inflamatoria más intensa (38).

1.2.3.3. REACCIONES INMUNO-INFLAMATORIAS

Tras la progresión de la caries hacia el tejido pulpar, se producen una serie de cambios en la microflora oral que hacen que la composición de la biopelícula bacteriana cariosa evolucione y se adapte a un ambiente más anaeróbico, por lo que disminuyen las bacterias Gram positivas y aumentan las Gram negativas. Además, se produce una liberación de algunas toxinas bacterianas como el lipopolisacárido o el ácido lipoteicoico (LTA) que impulsan la reacción inflamatoria (39-41). Sin embargo, la pulpa cuenta con un conjunto de células inmunes que la hacen estar preparada para su protección, desencadenando respuestas inmunes efectivas contra patógenos invasores; estas respuestas pueden ser innatas o adaptativas (32, 42). El momento exacto en el que

comienza una u otra respuesta no se conoce con exactitud, aunque hay autores que determinan que mientras exista una separación de al menos dos milímetros de dentina sana entre la caries y la pulpa, la inflamación será reversible y la respuesta inmunitaria innata será suficiente para la protección de la pulpa. Si la lesión se encontrase más avanzada el proceso sería irreversible y se activaría la respuesta adaptativa (21, 43). No obstante, hasta que la invasión bacteriana no se encuentra a aproximadamente 0,5 mm de la pulpa no se detecta un número destacado de células inflamatorias (44).

En aquellos casos en los que la pulpa se encuentra inflamada, las células inmunocompetentes que se observan son principalmente: linfocitos T y B, leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas, células dendríticas, células NK, monocitos-macrófagos y odontoblastos; son estos últimos los primeros en entrar en contacto con los antígenos bacterianos de la caries (21, 43). Los odontoblastos participan en la activación tanto de la respuesta innata como adaptativa de la pulpa; sin embargo, para su activación previamente se tiene que producir el reconocimiento del patógeno por parte de las células pulpares. Dicho reconocimiento se produce gracias a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en la interfaz pulpo-dentinaria. Destacan los receptores tipo Toll (TLR), fundamentales para que se desencadene la respuesta inmunitaria innata, ya que participan en la detección de bacterias Gram positivas (TLR-2) y Gram negativas (TLR-4); además dichos receptores también controlan el inicio de la respuesta adaptativa (39, 42, 45).

1.3. CÉLULAS MADRE

Las células madre (CMs) son células indiferenciadas, escasas en la mayoría de los tejidos, pero con gran potencial clonogénico. Dichas células se encuentran presentes en las etapas embrionaria, fetal y adulta. Las CMs se caracterizan por su capacidad tanto de autorrenovación, como de diferenciación en múltiples linajes celulares; por lo que se establece la siguiente clasificación en función de su potencial de diferenciación (46-50):

- Células madre totipotentes u omnipotentes: son el tipo de células más indiferenciadas que existe, tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en cualquier célula del organismo, pudiendo formar tejidos tanto embrionarios como extraembrionarios.
- Células madre pluripotentes: son células que tienen la capacidad para diferenciarse en las 3 capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) dando lugar a todos los órganos y tejidos del cuerpo.
- Células madre multipotentes: son aquellas que solo se pueden diferenciar en células de una misma capa germinativa; destacando dentro de este grupo las células mesenquimales.
- Células madre oligopotentes: son células cuya capacidad de autorrenovación y diferenciación es mucho más limitada, y solo pueden generar varios tipos celulares dentro de un tejido específico.
- Células madre unipotentes: su capacidad de diferenciación está muy limitada, por lo que solo pueden diferenciarse en un único tipo celular.

1.3.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (CMMs) o células mesenquimales estromales (MSC) son células con una morfología similar a la de los fibroblastos, que pertenecen a la categoría de células multipotenciales. Entre sus características (Figura 5) destacan tanto la capacidad de autorrenovación como el potencial de diferenciación a otras células de su mismo linaje celular (51, 52). No obstante, existen algunos autores que han informado sobre otra característica, como es la posibilidad de conversión de CMMs en

células de otros linajes no relacionados, mediante el proceso de transdiferenciación (51, 53, 54).

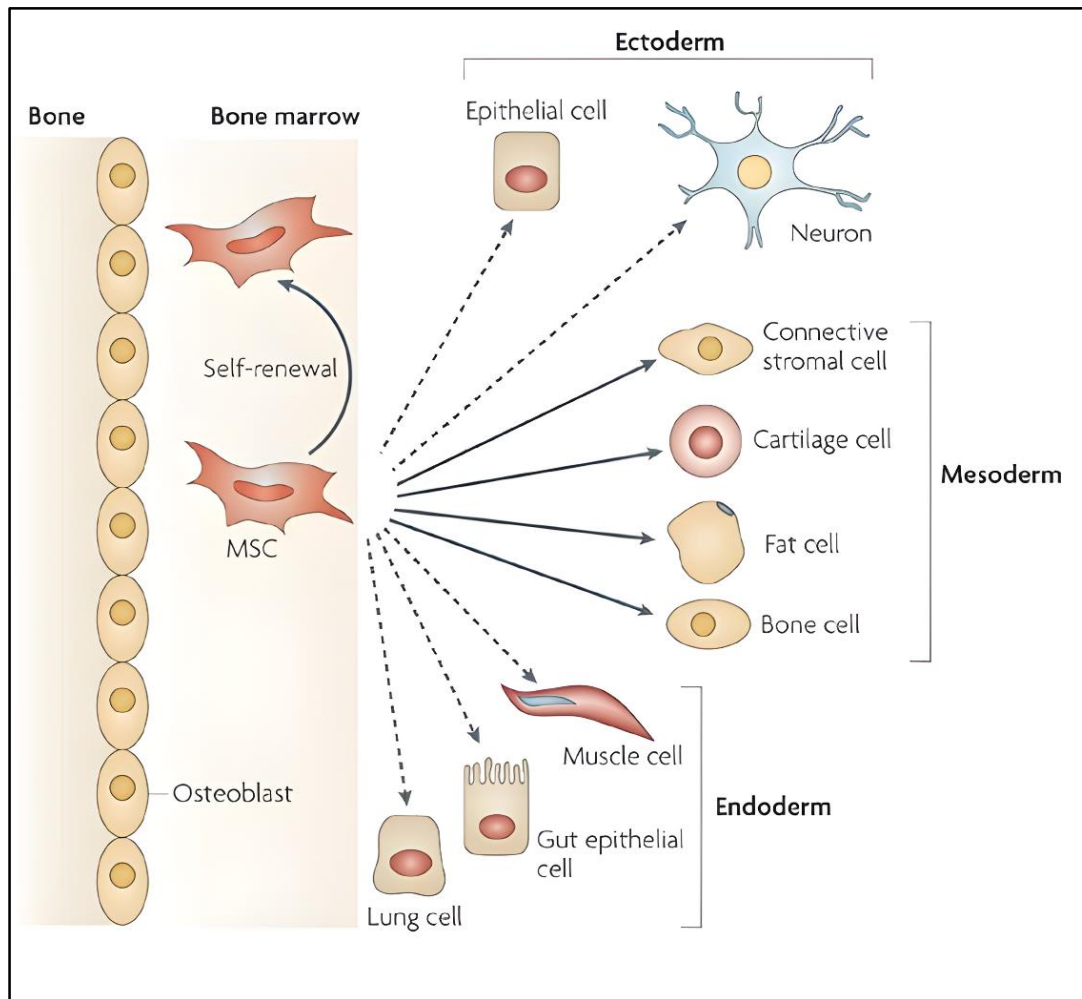


Figura 5: Características de las células madre mesenquimales. (51).

Las células madre mesenquimales fueron identificadas y aisladas por primera vez en la médula ósea (55). Actualmente se han logrado aislar diversas fuentes celulares en otros tejidos como, por ejemplo: el tejido adiposo (56), el cordón umbilical (57), el líquido amniótico (58) o los tejidos dentales (59). Debido a su fácil aislamiento y a su multipotencialidad, las células madre mesenquimales son consideradas células de un alto potencial terapéutico, siendo ampliamente utilizadas en ámbitos de medicina regenerativa y terapia celular (60-62).

Debido al creciente uso de dichas células por parte de los investigadores, el *Comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejidos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)*, estableció 3 criterios mínimos para identificar a las CMMs humanas (63):

- Adhesión al plástico en condiciones estándar de cultivo.
- Al menos el 95% de las CMMs deben expresar CD73, CD90 y CD105, pero no expresar CD11b o CD14, CD19 o CD79a, CD34, CD45, ni HLA-DR.
- Diferenciación en condiciones estándar *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

1.3.2. CÉLULAS MADRE PROCEDENTES DE LA REGIÓN ORAL Y MAXILOFACIAL

Las células madre de la región oral y maxilofacial, siguen los criterios establecidos por la ISCT para ser identificadas como células madre mesenquimales; así pues, también presentan propiedades de autorrenovación y multidiferenciación (64, 65).

Dentro del grupo de células madre orales y periorales (Figura 6), existen trece tipos de células madre, que pueden ser agrupadas en cuatro categorías (64, 66, 67):

- Tejidos dentales:
 - Células madre de la pulpa dental (DPSCs).
 - Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs).
 - Células madre de dientes deciduos exfoliados (SHED).
 - Células madre de la papila apical (SCAP).
 - Células madre del folículo dental (DFSCs).
 - Células madre del germen dental (TGPCs).
- Mucosa oral de revestimiento:
 - Células madre del tejido oral epitelial (OESCs).
 - Células madre derivadas del tejido gingival (GMSCs).
- Tejidos óseos orofaciales:
 - Células madre derivadas de la médula ósea de los huesos orofaciales (OBMSCs).
 - Células madre derivadas del periostio (PSCs).

- Otros tejidos:
 - Células madre derivadas de las glándulas salivales (SGSCs).
 - Células madre del tejido adiposo (ADSCs).
 - Células madre de la membrana de Schneider (SMCs).

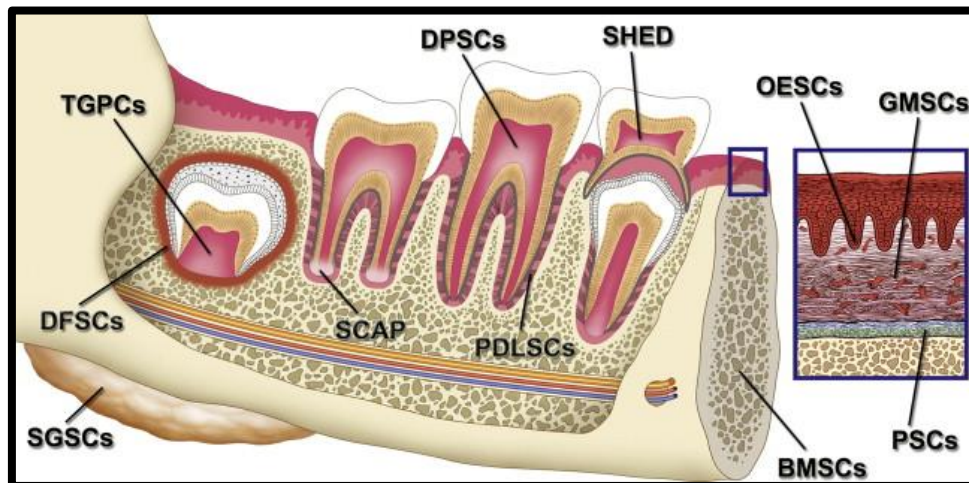


Figura 6: Localización de células madre procedentes de la región oral y maxilofacial.

Tomado de *Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. J Prosthodont Res*, Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M y cols. (67).

1.3.2.1. CÉLULAS MADRE ORIGINARIAS DE LA PULPA DENTAL

Las primeras células madre procedentes del tejido dental que fueron aisladas e identificadas, fueron las células madre originarias de la pulpa dental de terceros molares humanos impactados (59). Estas células incluyen entre sus cualidades la autorrenovación, la eficiencia clonogénica y la capacidad de multidiferenciación a ciertas líneas celulares (68), como: osteoblastos, cementoblastos, odontoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, endotelios, pericitos, hepatocitos y células neuronales (69-72).

Las DPSCs, probablemente debido a su localización en el nicho perivascular y a que tienen su origen en la cresta neural, poseen propiedades neurovasculares únicas, por lo que presentan un gran potencial terapéutico para ser utilizadas en ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (73-78).

No obstante, una de las principales funciones de las células madre pulpares es la capacidad de generar tejido dental funcional, ante estímulos nocivos, de modo que las

células pulpares migran hacia el tejido dañado y comienzan su diferenciación en odontoblastos dando lugar a la regeneración del tejido dentino-pulpar (79, 80), como ha sido demostrado por Gronthos y cols. (59, 68).

Al igual que ocurre con las células madre mesenquimales, y aunque el ISCT propuso una serie de marcadores celulares que debían expresar todas las células madre mesenquimales, actualmente no existe ningún marcador de superficie que ayude a la identificación exclusiva de las DPSCs. Además, existe cierta controversia entre los investigadores, respecto a las variantes de marcadores celulares que presentan dichas células, por lo que a continuación se enumeran algunos de los que han sido reportados: CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD 106, CD146, CD 166, CD271 y STRO-1; no obstante, no es necesario que las células madre pulpares expresen todos estos marcadores, incluso pueden llegar a expresar algunos de ellos en distintas proporciones (80-83).

1.4. TERAPIA VITAL PULPAR

El concepto de terapia vital pulpar (VPT) intenta abordar uno de los temas más controvertidos en odontología, como es qué tratamiento realizar cuando a pesar de estar la pulpa vital, se producen caries profundas, exposiciones pulpares o traumatismos, que comprometen al complejo dentino-pulpar (44, 84).

La pulpa generalmente, está amenazada por microorganismos capaces de provocar procesos inflamatorios, como la pulpitis, que si no se tratan pueden progresar provocando la muerte de los odontoblastos, y acabar provocando cuadros irreversibles que desemboquen en necrosis pulpar (29, 85). Sin embargo, si se controla la inflamación y se elimina el estímulo nocivo, el complejo dentino-pulpar, tiene capacidad para estimular procesos tanto reparativos como regenerativos capaces de restablecer la homeostasis tisular (29, 42, 86).

Por ello, la conservación de la vitalidad pulpar es fundamental para la viabilidad de las piezas dentales, ya que el tejido pulpar además de actuar como fuente de vascularización, posee propiedades propioceptivas, defensivas y de desarrollo (87, 88).

A pesar de que actualmente un diente sin pulpa se puede conservar en la arcada durante un largo periodo de tiempo (87), se han producido notables avances acerca de la respuesta defensiva del complejo dentino-pulpar ante estímulos nocivos, como la caries, que llevan a desarrollar otras alternativas más conservadoras que el tratamiento endodóntico, siendo la terapia pulpar vital uno de los tratamientos mínimamente invasivos que mayor interés ha despertado (89).

La terapia vital pulpar tiene como objetivo la conservación y protección del tejido pulpar, ya que su presencia es transcendental para que las células madre pulpares se diferencien en células similares a odontoblastos, responsables de promover la reparación de los tejidos adyacentes; por lo que dicho tratamiento pretende inducir la capacidad regenerativa natural de la pulpa, para así lograr mantener la vitalidad pulpar e intentar frenar la progresión de la inflamación (29, 30, 87, 90, 91).

1.4.1. DIAGNÓSTICO

Una parte transcendental para el éxito del tratamiento conservador de la pulpa, depende del diagnóstico, y este en gran parte está relacionado con el proceso inflamatorio pulpar. Sin embargo, actualmente no existen pruebas diagnósticas disponibles comercialmente para la detección cuantitativa de los niveles de inflamación e infección, que ayuden a confirmar si la inflamación pulpar es o no reversible (90, 92). No obstante, autores como Zanini han publicado investigaciones acerca de la presencia de una serie de biomarcadores inflamatorios, que pueden ayudar al desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas más precisas, basadas en métodos moleculares (92, 93).

A pesar de ello, actualmente la Sociedad Europea de Endodoncia (ESE), recomienda para el adecuado diagnóstico de la pulpitis, una exhaustiva historia y examen clínico del dolor junto con radiografías periapicales y pruebas de sensibilidad. De este modo, se asocia la pulpitis irreversible con episodios de dolor espontáneos e irradiados que se mantienen tras eliminar el estímulo; y en cambio, considera la pulpitis como reversible, cuando es asintomática o presenta episodios de dolor de corta duración y menor intensidad (89).

Actualmente, existen estudios que demuestran una alta correlación entre el diagnóstico clínico y el estado histológico pulpar, sobre todo para los casos de pulpa sana y de pulpitis reversible, por lo que el pronóstico de la terapia vital pulpar en estos casos será

más favorable (94). Sin embargo, autores como Wolters, afirman que existe tejido inflamado reversiblemente en pulpas que han sido diagnosticadas con inflamación irreversible. Se propone un nuevo sistema de diagnóstico que clasifica la pulpitis en: inicial, leve, moderada o severa; y en función de ello establece que tratamientos realizar para ser lo menos invasivo posible, y así poder mantener la mayor cantidad de tejido pulpar vital con potencial de sanar (95). Aun así, la decisión final sobre que tratamiento realizar debe ser intraoperatoria, tras la observación de la parte más profunda de la dentina y el posible tejido pulpar expuesto (96).

1.4.2. PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos que abarcan la terapia vital pulpar tienen como fin, bajo una estrategia conservadora y mínimamente invasiva, crear un medio óptimo que ayude a la pulpa a conservar su vitalidad y a estimular la reparación del complejo dentino-pulpar; tras la eliminación del tejido infectado (92, 97).

Clínicamente, los tratamientos que engloba la VPT se pueden dividir en dos grupos: técnicas indirectas (recubrimiento pulpar indirecto), y técnicas directas (recubrimiento pulpar directo, y pulpotomía total o parcial) (Figura 7).

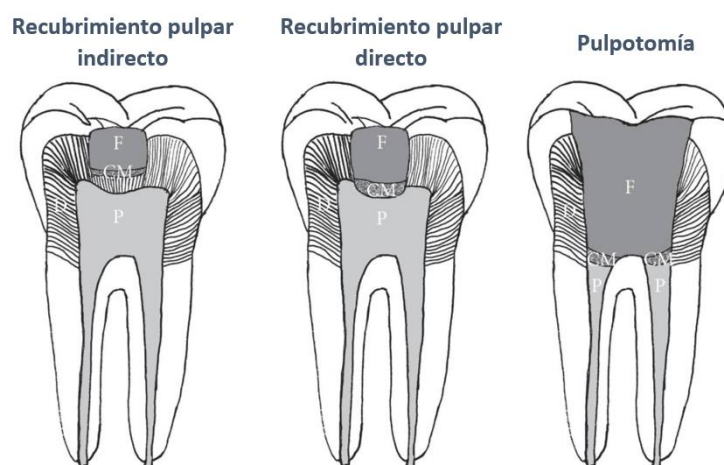


Figura 7: Procedimientos de terapia vital pulpar. D = dentina, P = Pulpa, CM = Material de recubrimiento, F = Obturación. Tomado de *Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. Int J Dent, Zhang W, Yelick PC. (87).*

El recubrimiento pulpar indirecto se utiliza generalmente en casos de cavidades profundas, próximas a la pulpa, que no llegan a mostrar exposición pulpar. En cambio,

el recubrimiento pulpar directo se realiza cuando existe pulpa vital asintomática expuesta, ya sea debido a la propia preparación de la cavidad para eliminar la caries o por traumatismos (98). Por otro lado, en dientes que presentan pulpitis graves o exposiciones pulpares contaminadas, se recomienda la realización de la pulpotomía (total/parcial). En estos casos, se produce una eliminación de tejido pulpar infectado, que puede ser parcial, cuando tras eliminar 2-3 mm del tejido pulpar se logra controlar el sangrado en un periodo de tiempo próximo a los 5 minutos; en cambio, si no se logra, será necesario la realización de la pulpotomía total. Finalmente, si no se consigue la hemostasia, se llevará a cabo el tratamiento de conductos (92, 98).

Tras la eliminación de los irritantes del tejido, existen ciertos factores que pueden mejorar el pronóstico de los procedimientos realizados como: la desinfección de los tejidos con hipoclorito de sodio o clorhexidina (89, 99), el mantenimiento de un campo de trabajo lo más estéril posible, incluyendo el uso de dique de goma (98), y finalmente la elección de un material con óptimas propiedades biológicas y físico-químicas (87).

1.4.3. MATERIALES

Una parte importante del éxito de los procedimientos llevados a cabo en la terapia vital pulpar está influenciado por el material empleado y sus propiedades (29). Durante años el hidróxido de calcio fue considerado como el material de referencia en los tratamientos de VPT. Sin embargo, los estudios han puesto en evidencia ciertas limitaciones que incluyen defectos de sellado, alta solubilidad, falta de adhesión e inflamación de la superficie pulpar; factores que han demostrado comprometer las tasas de éxito a largo plazo de los tratamientos (98, 100).

Hoy en día, tanto la ESE como la AAE (Asociación Americana de Endodoncistas), coinciden en señalar a los materiales basados en silicato de calcio como los nuevos “*gold standard*” a emplear en la terapia vital pulpar (89, 101). De este modo, el hidróxido de calcio está siendo desplazado por nuevos materiales que muestran resultados clínicos más predecibles junto con una alta biocompatibilidad y bioactividad, que permiten la formación de puentes de dentina de mayor calidad y con mejor capacidad de sellado (98, 102).

Actualmente, se considera que el material ideal debe presentar principalmente tres características: biocompatibilidad, bioactividad y capacidad de sellado (88, 103). No obstante, existen también otras propiedades claves como la capacidad antiinflamatoria, el manejo, el tiempo de fraguado o la radiopacidad (29).

El agregado trióxido mineral (MTA) fue el primer material basado en silicato de calcio utilizado en los tratamientos pulpares. Dicho material posee excelentes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, así como una adecuada capacidad de sellado (97, 104).

Sin embargo, algunos inconvenientes como su potencial de decoloración, el largo tiempo de tiempo de fraguado y la difícil manipulación, han provocado la realización de múltiples modificaciones sobre su composición tradicional, dando lugar a nuevos materiales como el MTA Angelus, un material con menor tiempo de fraguado y mejor manejo (97, 105-107).

A pesar de la aparición de nuevas fórmulas de MTA, durante las últimas dos décadas han aparecido numerosos cementos basados en silicato de calcio (CSCs), que han intentado mejorar las propiedades del MTA, entre los cuales se encuentra Biodentine y TheraCal (97, 108).

Por un lado, Biodentine, es un cemento a base de silicato tricálcico, con menor radiopacidad que el MTA pero que mejora ciertas propiedades como el tiempo de fraguado, la manipulación, y el potencial de decoloración (98, 109, 110). Actualmente, existen estudios que muestran una eficacia clínica similar entre Biodentine y MTA, por lo que Biodentine es considerado una alternativa real como material en la terapia vital pulpar (111, 112).

El TheraCal es un cemento fotopolimerizable de silicato de calcio modificado con resina, con una alta capacidad de sellado, que tenía como fin mejorar la adhesión de los cementos a la restauración final. Sin embargo, dicho material presenta dos grandes limitaciones: un potencial de remineralización muy inferior a otros materiales (109, 113, 114); y la presencia de cuadros de citotoxicidad pulpar (114, 115) debido a la existencia de monómeros de resina que permanecen sin polimerizar (116). Por ello, recientemente, se incorporó al mercado el TheraCal PT, un nuevo material con polimerización dual que tiene como objetivo mejorar las propiedades de su predecesor.

Hoy en día, a pesar de que existen estudios que confirman la mejora de dichas propiedades, sigue siendo necesario la realización de más ensayos clínicos con dicho material (117).

A pesar de los distintos CSCs comercialmente disponibles, la mayoría de autores coinciden en la necesidad de un mayor número de investigaciones a largo plazo, para confirmar a los nuevos materiales como alternativas reales en los tratamientos de terapia vital pulpar (97, 98, 106, 109).

1.5. CONCEPTOS DE BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD

Los materiales empleados en VPT, requieren unas propiedades biológicas específicas que ayuden a crear un medio favorable para la reparación del complejo dentino-pulpar, ya que se encuentran en contacto directo o indirecto con el tejido pulpar (118). Por lo que idealmente, los materiales deben presentar características tanto de biocompatibilidad como de bioactividad, que estimulen la migración, proliferación y diferenciación osteogénica de las células (119). La evaluación de dichas propiedades antes de su uso clínico es transcendental, y para ello son empleadas las células madre procedentes de la pulpa dental, debido a su capacidad de diferenciación en células similares a odontoblastos que participan en la reparación del tejido pulpar (118).

El concepto de biocompatibilidad hace referencia a la capacidad de un biomaterial para realizar su función sin provocar efectos indeseables en el tejido (120). Este es un factor muy a tener en cuenta, ya que la superficie de los materiales, es la parte que se encuentra en íntimo contacto con los tejidos vivos adyacentes. De este modo si la superficie química no presenta características de biocompatibilidad pueden ocurrir efectos adversos en la interfaz célula-biomaterial (121).

Para tratar de evitar daños locales o sistémicos sobre los tejidos, existen una gran variedad de métodos de ensayo que evalúan los posibles efectos biológicos adversos, asegurando la biocompatibilidad de los materiales antes de su comercialización. Además, existen normas internacionales que establecen criterios para la evaluación de seguridad de los materiales dentales (ISO 10993 e ISO 7405); siendo la prueba de citotoxicidad más común el análisis de la viabilidad celular (122).

Otra propiedad esencial en los materiales empleados para la terapia vital pulpar, es la bioactividad que muestran para la reparación de los tejidos. Así, estos materiales deben favorecer el depósito de una capa superficial similar a la hidroxiapatita (118), es por ello que a través de la liberación de iones calcio e hidróxido, favorecen: la proliferación y diferenciación celular, la cicatrización de heridas y la formación de un puente dentinario que ayuda a mantener la vitalidad pulpar (123).

Los estudios existentes destacan principalmente dos métodos para determinar la bioactividad de un material, por un lado, el más común y utilizado, ha sido la medición de la expresión de marcadores osteo-odontogénicos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR). No obstante, también se han empleado otros métodos de ensayo como el análisis de la formación de depósitos de calcio mediante la tinción de Alizarin Rojo S (119, 124).

En general, se puede concluir que tanto la biocompatibilidad como la bioactividad de los cementos basados en silicato de calcio se observa principalmente en las interacciones con los tejidos circundantes (97), por lo que en este punto es donde se deben centrar las investigaciones para analizar, tanto los actuales, como los futuros materiales empleados para tratamientos de terapia vital pulpar.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Evaluar la biocompatibilidad y bioactividad de tres materiales basados en silicato de calcio, frente a células madre de pulpa dental.

Objetivos específicos:

- Determinar la viabilidad celular de las células madre pulpaes tras el contacto con los materiales seleccionados para el estudio, así como observar su respuesta ante una herida mediante la migración celular.
- Analizar la morfología y adhesión celular de las células madre pulpaes cuando se encuentran en contacto directo con los materiales del estudio.
- Caracterizar la composición de las superficies de los materiales de estudio, y comparar la liberación de compuestos en solución salina de pH fisiológico.
- Establecer el porcentaje de células pulpaes tanto vivas, como apoptóticas tempranas y necróticas apoptóticas tardías; tras la aplicación de los materiales seleccionados, así como determinar las especies reactivas de oxígeno producidas tras la aplicación de los distintos materiales.
- Examinar la expresión de marcadores osteo-odontogénicos y evaluar la formación de depósitos cálcicos en las células madre de la pulpa dental expuestas a los materiales de estudio.
- Establecer diferencias en cuanto a la composición de los materiales y su implicación en la biocompatibilidad y bioactividad que poseen.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia (Anexo I) y por la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia (Anexo II).

Los materiales basados en silicato de calcio utilizados para terapia vital pulpar examinados en este estudio fueron MTA Angelus®, TheraCal PT® y Biodentine XP®, cuyas características se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de los materiales empleados.

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSICIÓN	NÚMERO DE LOTE
MTA Angelus®	Angelus, Londrina, PR, Brasil	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de calcio y tungstato de calcio.	69755
TheraCal PT®	Bisco Inc. Schaumburg, IL, EE.UU.	Cemento SG-Mix, bisfenol A-glicidil metacrilato (Bis-GMA), circonato de bario, fluoruro de iterbio e iniciador.	2300002964
Biodentine XP®	SEPTODONT, Saint Maur des Fossés, Francia	– Polvo: silicato tricálcico, óxido de circonio, óxido de calcio, carbonato de calcio y óxidos de hierro. – Líquido: cloruro cálcico, policarboxilato y agua purificada.	B31376AA

A continuación, se describen los procedimientos que se llevarán a cabo para evaluar tanto la biocompatibilidad como la bioactividad de dichos materiales sobre células madres de la pulpa dental de diente permanente. Todos los procedimientos se realizarán en una cabina de seguridad Telstar BIO II A (Telstar, Terrasa, España) (Figura 8) cumpliendo con las condiciones de esterilidad y bioseguridad.



Figura 8. Cabina de seguridad Telstar BIO II A.

3.1. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS

Las DPSCs se conservan congeladas a una temperatura de -80°C en las cámaras de congelación (NuAire, Plymouth, EE.UU.) o en nitrógeno líquido. Las muestras seleccionadas poseían una densidad celular mínima de un millón de células por mililitro en Pase 3, y su descongelación se llevó a cabo siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se introdujo el tubo criogénico en el baño termostatzado (Ovan, Barcelona, España) a 37°C para el inicio de su descongelación.
2. En un tubo BD (Corning, Tamaulipas, México) de 15 ml, se depositó 9 ml de medio de cultivo DMEM completo y se le incorporó la suspensión celular previamente descongelada. La composición del medio de cultivo utilizado fue la siguiente:
 - DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest, Nuailé, Francia).
 - Suero bovino fetal al 10% (Cytiva, Pasching, Austria).
 - Antibióticos (10,000 unidades/ml de penicilina G; 10,000 unidades/ml de estreptomicina) (Corning, Manassas, EE.UU.).
 - Glutamina al 1% (glutamina 200 mM en 0.85% de solución de cloruro de sodio) (Gibco, Paisley, Reino Unido).
3. Se homogenizó la suspensión celular en el tubo BD.
4. Se centrifugó (Heraeus Multifuge 3SR+, Thermo Fisher, Osterode, Alemania) (Figura 9) el tubo BD durante 5 minutos a 300 g.



Figura 9. Centrífuga.

5. Se descartó el sobrenadante dejando solo el pellet celular y se resuspendió en 12 ml de medio DMEM completo.
6. La suspensión celular se sembró en un frasco de 75 cm², que se agita ligeramente para un crecimiento celular homogéneo y se introdujo en la estufa incubadora a 37°C y 8,5% CO₂.

3.2. TRIPSINIZACIÓN

Una vez las células alcanzan una confluencia celular próxima al 80%, se lleva a cabo el subcultivo, para el cual se efectúa el protocolo de tripsinización:

1. Se retira el medio de cultivo del frasco de 75 cm² con la ayuda del pipeteador automático.
2. Lavado del frasco con 10 ml de PBS (Gibco, Paisley, Reino Unido).
3. Se añade la solución de tripsina (trypsin-EDTA 0.25%) (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.). La cantidad de tripsina añadida depende del volumen del frasco, para un frasco de 25 cm² se añaden 2 ml de tripsina, para uno de 75 cm² serán 3 ml, y 5 ml para uno de 175 cm².
4. Incubación (Hera Cell 150, Thermo Fisher, Langenselbold, Hessen, Alemania) (Figura 10) del frasco a 37°C y 8,5% de CO₂ durante 5 minutos, con el objetivo de despegar las células adheridas al mismo.

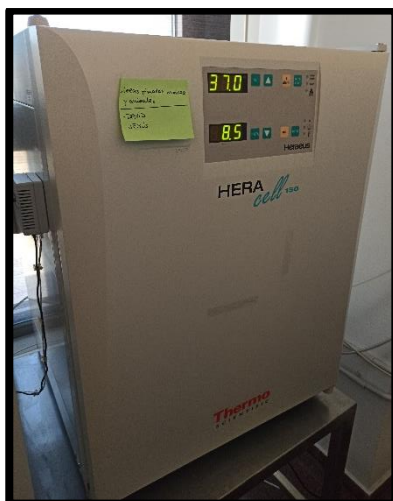


Figura 10. Incubadora.

5. Se comprueba en un microscopio de contraste de fases invertido (Motic AE30 Series, Vancouver, Canadá), que todas las células se han despegado correctamente del fondo del frasco.
6. Se inactiva la tripsina añadiendo el doble de medio de cultivo completo que la cantidad de tripsina utilizada, en este caso 6 ml de medio DMEM completo.
7. Se recoge todo el contenido del frasco y se deposita en un tubo BD de 50 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) que se centrifuga durante 5 min a 300 g.
8. Se descarta el sobrenadante del tubo BD y se resuspende el precipitado celular añadiendo medio DMEM completo, hasta conseguir una mezcla homogénea, para su posterior recuento y siembra celular.

3.3. RECuento CELULAR

Se efectúa el recuento y la estimación de la viabilidad celular, como paso previo para determinar la cantidad de células a sembrar en cada ensayo experimental. Para desarrollar dicho proceso se siguen los siguientes pasos:

1. Realización de una dilución 1:1 de azul tripán (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.) y suspensión celular, añadiendo 100 μ l de cada uno y resuspendiendo varias veces.
2. Se deposita la dilución en la cámara de conteo (BIO-RAD, California, EE.UU.).

3. Se realiza una lectura en el contador celular automático (TC20 Automated Cell Counter, BIO-RAD, California, EE.UU.) (Figura 11), los valores de células totales y viables serán expresadas por el contador en “células/ml”.



Figura 11. Contador celular automático.

El recuento celular efectuado mediante la tinción azul tripán se fundamenta en la capacidad de las células vivas para expulsar el colorante, por el contrario, las células no viables resultan teñidas de azul sin expulsar el colorante.

3.4. ENSAYOS EXPERIMENTALES

3.4.1. PREPARACIÓN DE LOS ELUATOS DE CADA MATERIAL

Para la obtención de los eluatos de cada material de estudio, se mezclaron sus componentes según las indicaciones de los fabricantes, y se prepararon moldes cilíndricos. Seguidamente, los discos se depositaron en placas de 12 pocillos, y se colocaron dentro de la cabina de flujo bajo el efecto de la luz ultravioleta durante 30 minutos, para asegurar la esterilidad de los mismos. Posteriormente, se añadió 4 ml/pocillo de medio de cultivo DMEM completo y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 8,5 CO₂.

Tras el condicionamiento, se retiró el sobrenadante de medio de cultivo de cada uno de los materiales, y se filtraron a través de microfiltros (RoweMed AG, Parchim, Alemania) con porosidad de 0,2 µm, eliminándose cualquier posible residuo sólido. Los extractos de los materiales se conservaron a 4°C.

3.4.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR

La determinación de la actividad metabólica, se efectuó a través del ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT) (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.), mediante dicho compuesto se pretende analizar la capacidad de las células para transformar el MTT en cristales de formazán, tras ello se analiza la acumulación de cristales con el fin de establecer la actividad metabólica celular en función del número de cristales presentes.

Para la realización de este experimento, se sembraron placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1.500-4.000 células/pocillo, en 180 µl de medio de cultivo DMEM completo; y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 8,5 CO₂. Tras lograr una óptima adhesión y confluencia celular, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 180 µl de medio celular condicionado (1:1, 1:2 y 1:4) preparado para cada material de estudio, y un control con medio DMEM sin condicionar, seguidamente se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones mencionadas durante tres tiempos (24, 48 y 72 horas).

A los pocillos adyacentes a aquellos destinados para la medición de la actividad metabólica celular se les añadió PBS (Gibco), para así proteger de la evaporación a los pocillos del ensayo.

Finalmente, una vez transcurridos los periodos de tiempo a evaluar, el protocolo a seguir fue el siguiente:

1. Se retira el medio de cultivo, quedando únicamente las células adheridas.
2. Se añade a cada pocillo 200 µl de medio de cultivo DMEM sin suero ni rojo fenol (Thermo Fisher, Paisley, Reino Unido).
3. En condiciones de oscuridad se agrega 50 µl/pocillo de MTT a 5 mg/ml quedando una concentración final de 1 mg/ml.
4. Las placas se incuban en oscuridad a 37°C y 8,5 CO₂ durante un periodo tiempo de 2 a 4 horas.
5. Se elimina la solución de MTT de los pocillos.
6. Se añade, 100 µl/pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO) (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polonia), con el fin de solubilizar los cristales de formazán.

7. Empleando el espectrofotómetro INFINITE 200 PRO (Tecan, Grödig, Austria) (Figura 12) se efectúa el agitado de la placa y la lectura de absorbancia a 570 y 690 nm.

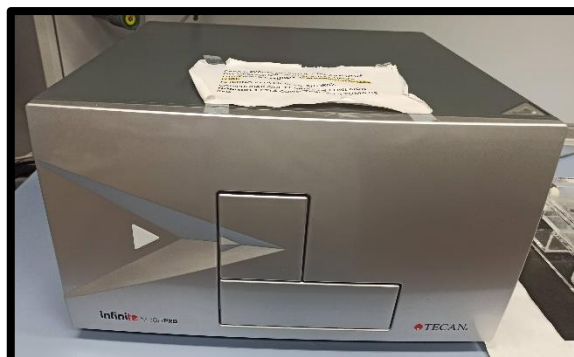


Figura 12. Espectrofotómetro INFINITE 200 PRO.

3.4.3. MIGRACIÓN CELULAR

Este ensayo pretende analizar y comparar la capacidad migratoria de las DPSCs ante una herida a lo largo del tiempo, una vez expuestas las células a los diferentes materiales de estudio.

Para su ejecución, se sembraron 200.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos, utilizando 2 ml/pocillo de medio DMEM completo. Tras la siembra, el siguiente objetivo fue promover el crecimiento y la adherencia celular para lograr una óptima confluencia, para ello se incubaron las placas en la estufa a 37°C y 8,5 CO₂, durante 24 horas.

Posteriormente, se siguió el siguiente procedimiento:

1. Realización en el centro de cada pocillo de una herida a modo de cruz, utilizando una punta de micropipeta estéril.
2. Se retira el medio de cultivo de los pocillos.
3. Lavado con 2ml/pocillo de PBS, para eliminar las células y restos celulares que hayan sido arrastrados al realizar las heridas.
4. Se añade 2 ml/pocillo de medio de cultivo condicionado con MTA Angelus, TheraCal PT y Biodentine XP, diluido 1:1, 1:2 y 1:4. El control se realiza con medio de cultivo con DMEM completo sin tratamiento.
5. Tras aplicar a cada placa su correspondiente dilución de tratamiento, se observa la progresión del cierre de la herida con el microscopio de contraste de fases

invertido (Nikon Eclipse Ti-S, Japón) (Figura 13), a un aumento de x100, obteniendo las imágenes con la capturada de imágenes (Nikon Digital Sight, Japón) en la misma zona del pocillo a las 0, 24, 48 y 72 horas.

6. La realización del análisis y la comparativa de los cambios producidos entre las heridas de los pocillos, se realizó mediante el programa ImagenJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.), que permite medir el área de herida remanente sin cerrar; seguidamente se empleó el software Graph-Pad Prism v8.1.0 (GraphPad Software) con el fin de llevar a cabo la comparativa entre las diferentes heridas.



Figura 13. Microscopio de contraste de fases invertido.

3.4.4. INMUNOFLUORESCENCIA

Para llevar a cabo el experimento de inmunofluorescencia (Figura 14) se sembró una placa de 24 pocillos, con un volumen de 500 µl/pocillo y una cantidad celular de 20.000 células por pocillo. A continuación, la placa se incubó en la estufa durante 24 horas a 37°C y 8,5% de CO₂ para lograr la adhesión y el crecimiento celular en los pocillos.



Figura 14. Preparación de la cabina para la realización del experimento.

Una vez pasadas las 24 horas el protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

1. Se retiró el medio de cultivo de los pocillos.
2. Se aplicó el medio cultivo condicionado en tres diluciones distintas, 1:1, 1:2, 1:4 y el control con medio DMEM sin condicionar.
3. Se introdujo la placa en la estufa durante 72 horas a 37°C y 8,5% CO₂.
4. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se llevaron a cabo tres lavados con PBS (Gibco).
5. Fijación de las células con paraformaldehído (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.) al 4% en PBS, que se dejó actuar durante 15-20 minutos con los pocillos cubiertos.
6. Se efectuaron 3 lavados con PBS.
7. Se añade a los pocillos la dilución al 0,25% de Tritón X100 (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.) en PBS (0,125 ml en 50 ml de PBS), manteniéndose durante 5-15 minutos; para lograr gracias a la acción del Tritón, la permeabilización de la membrana celular.
8. Realización de tres lavados con PBS.
9. Se añadieron 300 µl/pocillo de la tinción de faloidina (Thermo Fisher, Rockford, EE.UU.) (solución de 20 µl de stock en 5,98 ml de PBS), en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, para lograr el marcaje celular.
10. Durante un periodo de entre treinta minutos y dos horas, se dejó la placa en agitación orbital continua (Elmi, Riga, Letonia) a 36 rpm (Figura 15).



Figura 15. Agitador orbicular.

11. Se retira la faloidina y se realizan tres lavados con PBS.
12. Una vez llevada a cabo la tinción de faloidina, se realiza el marcado celular con 4,6-diclorhidrato de diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher, Waltham, EE.UU.) (dilución 1/500 en PBS, 20µl de stock en 10 ml de PBS), en oscuridad.

13. Se añadieron 400 μ l/pocillo de la dilución DAPI; se incubó durante 1-5 minutos para un correcto marcaje del núcleo.
14. Finalmente, se hacen los tres últimos lavados con PBS de los pocillos.

La observación de la placa se realizó con el microscopio de contraste de fases con fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania) (Figura 16), a un aumento de x100. En primer lugar, se hace la observación con fluorescencia roja (exposición 800-1000 ms y ganancia 2), y finalmente sin mover el campo de visión, se captura la imagen con fluorescencia azul (exposición 50-100 ms y ganancia 2); una vez efectuadas las capturas de ambas fluorescencias, se superponen para la obtención de una imagen conjunta.

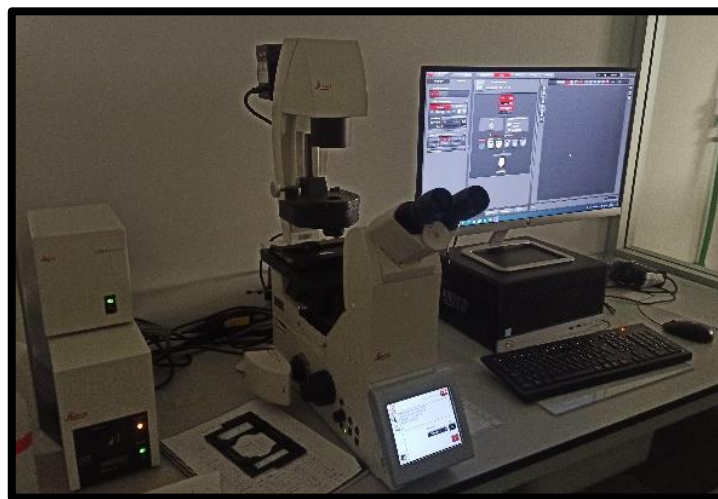


Figura 16. Microscopio de contraste de fases con fluorescencia.

3.4.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

A. Morfología celular y adhesión a los materiales

A través del siguiente experimento se pretende analizar a nivel microscópico tanto la adhesión celular a los materiales de estudio, como la adaptación morfológica de las células a la superficie de los materiales.

Para ello se empleó un disco de cada material, preparado previamente, siguiendo el protocolo anteriormente desarrollado, y se colocaron en una placa de 12 pocillos, tratando que la parte cóncava de la pastilla quedase situada hacia la superficie para favorecer la siembra de células, que se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se añadió minuciosamente sobre cada pastilla 1,5 ml de suero bovino fetal y se dejó actuando sobre las mismas durante 20 minutos, con el fin de lograr posteriormente una mejor adhesión de la suspensión celular a la superficie de los materiales.
2. Se retiró el suero de los pocillos.
3. Se sembró sobre cada pastilla la suspensión celular con 100.000 células y se incubó durante 5-10 minutos para que las células se asentasen sobre las pastillas.
4. Se cubrieron las pastillas con 2 ml/pocillo de medio DMEM completo.
5. Se incubó durante 72 horas en la estufa.
6. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados de los pocillos con PBS.
7. Se fijaron las células adheridas empleando glutaraldehído (Sigma Aldrich, St Louis, EE.UU.) al 2,5% que se mantiene actuando a 4°C durante 30 minutos.
8. Se retiró el fijador y se conservaron las pastillas con lavador de sacarosa hasta la posterior realización del análisis microscópico.

Las muestras se trasladaron al Servicio de Microscopía y Análisis de Imagen en el edificio SACE, donde se lavaron para su posterior fijación en tetróxido de osmio durante 1 hora. Seguidamente, fueron deshidratadas mediante concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70% y 90% vol.), para finalmente llevar a cabo una deshidratación final empleando alcohol absoluto. Tras ello, las muestras se secaron mediante el método de punto crítico con el fin de preservar las estructuras biológicas y los materiales evitando su colapso. Posteriormente tras lograr muestras secas y estables, estas fueron recubiertas con oro y paladio, para su posterior observación en el microscopio electrónico de barrido (Apreo 2 SEM, Thermo Fisher, Oregón, EE.UU.) con un voltaje de 10 kV. Tras la evaluación microscópica de las muestras, se procedió a capturar imágenes de forma aleatoria de diferentes áreas de los materiales con aumentos de x100, x300 y x1500.

B. Espectrometría dispersiva de rayos X (EDX).

Mediante el sistema de espectrometría de rayos X (EDX) se realiza una medida cualitativa y cuantitativa de los elementos que componen los materiales de estudio, obteniéndose información acerca de la composición química que presenta cada material.

Para la ejecución de este experimento se utilizaron discos sin ningún tratamiento previo a su traslado al Servicio de Microscopia y Análisis de Imagen; fue aquí donde al igual que en el anterior experimento, se recubrieron con oro y paladio para su posterior análisis, para el cual se empleó el sistema de captación de rayos X (EDAX AMETEK) incorporado en el microscopio electrónico de barrido Apreo 2 SEM.

3.4.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

La finalidad de este experimento fue analizar la liberación de iones: aluminio (Al), bario (Ba), bismuto (Bi), hierro (Fe), estroncio (Sr), wolframio (W), zirconio (Zr), calcio (Ca), azufre (S) y sílice (Si); por cada muestra de los materiales de estudio, al entrar en contacto con PBS.

Para ello, se colocaron las muestras de los materiales en una placa de 12 pocillos donde se dejaron durante 24 horas con 4 ml/pocillo de PBS, transcurrido dicho periodo de tiempo, se filtraron a través de microfiltros (RoweMed AG, Parchim, Alemania) con porosidad de 0,2 μm , eliminándose cualquier posible residuo sólido. Se analizaron los eluyentes empleando la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Agilent 7900, Stockport, Reino Unido).

3.4.7. MEDICIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS

Para la realización de este experimento se usaron placas de seis pocillos, donde en un volumen de 2 ml/pocillo se sembraron un total de 100.000 células por pocillo, que fueron incubadas durante 24 horas, a 37°C y 8,5 CO₂. Se asignó una placa para cada material, y una columna para cada dilución, añadiéndose 2 ml/pocillo de la correspondiente dilución de estudio (sin diluir, diluido 1:2 y diluido 1:4), además una de las placas fue utilizada como control, depositándose 2 ml/pocillo de medio de cultivo DMEM completo. Finalmente, las placas fueron incubadas nuevamente en la estufa durante 72 horas; transcurrido dicho periodo de tiempo, se llevó a cabo el siguiente protocolo para lograr medir la exposición de fosfatidilserina presente durante el proceso apoptótico en las membranas celulares, empleándose distintos conjugados de anexina V marcados con fluorescencia.

1. Se despegaron las células de los pocillos, mediante el protocolo de tripsinización previamente desarrollado, pero sin descartar los sobrenadantes.
2. Se efectuó la tinción celular empleando anexina-V marcada con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (Immunostep, Salamanca, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, dejando actuar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Realización de la citometría de flujo empleando el BD FACS Canto™ (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).
4. Análisis de los porcentajes de células pulpares tanto vivas (Anexina-V-/7-AAD-), como apoptóticas tempranas o tardías (Anexina+/7-AAD-) y necróticas (Anexina-V+/7-AAD+); se efectuó mediante el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EE.UU.).

3.4.8. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE ÓXIGENO INTRACELULAR

La siembra y el cultivo celular de este experimento se desarrolló del mismo modo que en el experimento anterior. De modo, que una vez concluidas las 72 horas y los cultivos efectuados se encuentran en unas óptimas condiciones. Se llevó a cabo el protocolo para la medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas bajo diferentes condiciones:

1. Se despegaron las células de los pocillos, siguiendo el mismo protocolo de tripsinización que se desarrolló anteriormente.
2. Se realizaron 2 lavados a las células con PBS.
3. Se tiñeron empleando como marcador de estrés oxidativo 5 $\mu\text{mol/L}$ de 5-(γ -6)-clorometil-2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H₂DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), en condiciones de oscuridad, 30 minutos a 37°C.
4. Cuantificación de la fluorescencia intracelular a través del citómetro de flujo LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), estableciendo como valores 492 nm de excitación y 517 de emisión.
5. Análisis de las células positivas para CM-H₂DCFDA mediante el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EE.UU.).

3.4.9. EXPRESIÓN DE MARCADORES OSTEO-ODONTOGÉNICOS

El propósito de este ensayo fue evaluar la expresión de los marcadores osteo-odontogénicos de las células madre de pulpa dental, como medida de diferenciación celular. Para ello se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR).

Las secuencias de los primers para marcadores osteo-odontogénicos, empleados para la realización del ensayo se muestran en la Tabla 2. La expresión génica relativa se calculó empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizándose como referencia la expresión del gen housekeeping, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados para el estudio.

Primers	Secuencia (forward/reverse)
Fosfatasa alcalina (ALP)	5'-TCAGAAGCTCAACACCAACG-3'/5'-TTGTACGTCTTGGAGAGGGC-3'
Sialofosfoproteína dentinaria (DSPP)	5'-GCATTGGGCAGTAGCATGG-3'/5'-CTGACACATTGATCTTGCTAGGAG-3'
Factor de transcripción involucrado en la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética (RUNX2)	5'-TCCACACCATTAGGGACCATC-3'/5'-TGCTAATGCTTCGTGTTTCCA-3'
Colágeno tipo 1 (Col1A1)	5'-CCCGGGTTTCAGAGACAATTC-3'/5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
Osteonectina (ON)	5'-GCATCAAGCAGAAGGATA-3'/5'-AATAGTTAAGTTACAGCTAAGAAT-3'
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	5'-TCAGCAATGCCTCCTGCAC-3'/5'-TCTGGGTGGCAGTGATGG-3'

Para llevar a cabo el procedimiento de diferenciación celular, se emplearon placas de seis pocillos (100.000 células/pocillo). Una vez las células presentaron una confluencia cercana al 80%, se aplicaron los siguientes tratamientos (2 ml/pocillo): medio DMEM completo para el control negativo, medio de cultivo OsteoDiff (PromoCell, Heidelberg, Alemania) como control positivo, y medio de cultivo condicionado sin diluir de los tres materiales a evaluar. Todos los tratamientos se incubaron de manera simultánea durante 3 y 7 días, a 37°C y 8,5 CO₂; los medios de cultivo se reemplazaron cada 3 días.

Una vez cumplidos cada uno de los periodos de tiempo establecidos, se llevaron a cabo los protocolos de extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN), retrotranscripción de ARN a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y finalmente el protocolo de qPCR.

3.4.9.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL

El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

1. Se retiró el sobrenadante de los pocillos.
2. Lavado con 2 ml/pocillo de PBS.
3. Se llevó a cabo el protocolo de tripsinización, previamente desarrollado, para despegar las células de los pocillos.
4. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS.
5. Se añadió el mililitro de PBS junto al pellet disuelto en los microtubos Eppendorf y se centrifugaron (Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania) durante 5 minutos a 500 g.
6. Se descartó el PBS con la ayuda de la micropipeta evitando despegar el pellet celular.
7. Se realizó la extracción de ARN de las células, siguiendo el protocolo propuesto por el mini kit RNeasy®(Qiagen).
8. Se cuantificó el ARN extraído, utilizando el NanoDrop 2000 (Figura 17), cuyos valores se expresaron en ng/μl.
9. Finalizada la cuantificación, se conservaron las muestras a -80°C en las cámaras de congelación.



Figura 17. Espectrofotómetro NanoDrop 2000.

3.4.9.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN A ADNc

Tras la extracción y cuantificación del ARN, el siguiente paso fue la síntesis de ADNc mediante la retrotranscripción de 1 µg/muestra de ARN; para lo cual se siguieron las instrucciones del kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, California, EE.UU.).

3.4.9.3. PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE qPCR

La preparación de las muestras obtenidas de ADNc, para la posterior realización de las qPCR, se realizó en la cabina Telstar Mini-V/PCR (Telstar, Terrasa, España), donde siguiendo las instrucciones del kit TB Green® Premix Ex Tag™ (Takara Bio Inc, Nojihigashi, Kusatsu, Japón), se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Preparación de la “Master Mix” de cada gen, utilizando un microtubo y añadiendo:
 - 5 µl/reacción de TAKARA.
 - 0,3 µl/reacción del oligonucleótido correspondiente.
 - 2 µl/reacción de agua ultrapura.
 - 0,2 µl/reacción de ROX.
2. Se diluyó con agua ultrapura el ADNc, y se añaden 8,33 ng/ reacción.
3. Se preparó una placa PCR de 96 pocillos, donde se añadieron 7,5 µl/pocillo de cada “Master Mix” y 2,5 µl/pocillo de ADNc, cada reacción se repitió por triplicado.
4. Se selló la placa con una lámina de microsellado.
5. Previo a la realización de la lectura se centrifugó la placa durante unos segundos.
6. Establecemos los parámetros de la reacción, tal como indica el fabricante TAKARA, en Bio-Rad iQS.
7. La lectura de la placa se efectuó mediante el My iQ (Figura 18), un sistema de detección de PCR en tiempo real de un solo color.



Figura 18. My iQ, sistema de detección de PCR en tiempo real.

3.4.10. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE DEPÓSITOS CÁLCICOS

La finalidad de este experimento es analizar el potencial de mineralización que presentan las células madre pulpaes, una vez entran en contacto con MTA Angelus, TheraCal PT y Biodentine XP.

La siembra celular se efectuó en placas de seis pocillos (100.000 células/pocillo); que se incubaron a 37°C y 8,5 CO₂ hasta que las células alcanzaron una confluencia celular entorno al 80%.

A continuación, se aplicó el tratamiento utilizando tres medios de cultivo diferentes: para el control negativo se empleó medio de cultivo DMEM completo, el control positivo de mineralización con medio de cultivo OsteoDiff que promueve la diferenciación osteogénica; y finalmente, el medio de cultivo condicionado con los materiales de estudio sin diluir. En los tres casos, el volumen añadido a los correspondientes pocillos fue de 2 ml.

Posteriormente, las placas fueron cultivadas durante 21 días en la estufa, a 37°C y 8,5% CO₂, cada 3 días se les realizaron cambios de medio de cultivo y una vez concluido el periodo de tiempo, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las placas aplicando 2 ml/pocillo de PBS.
2. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, y seguidamente se lavaron y conservaron los pocillos con agua ultrapura (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), hasta su posterior tinción de Alizarin Rojo S.
3. Preparación de la dilución de Alizarin:
 - 3.1. Se disuelve 1 gr de Alizarin en 50 ml de agua ultrapura.
 - 3.2. Se resuspende la disolución y se agita el tubo para homogeneizarlo todo.
 - 3.3. Se ajusta el pH hasta que alcance un valor próximo a 4,2.
4. Se retiró el agua ultrapura de las placas con las células ya fijadas, y se añadió 1 ml/pocillo de la disolución de Alizarin (Figura 19).



Figura 19. Preparación de los pocillos con Alizarin Rojo S.

5. Se colocaron las placas en condiciones de oscuridad sobre el agitador orbicular durante 30 min a 100 rpm.
6. Se retiró la tinción de Alizarin.
7. Se realizaron varios lavados con 1 ml/pocillo de agua ultrapura, para eliminar el exceso de Alizarin.
8. Se observó la tinción de las muestras usando el microscopio Nikon Eclipse Ti-S, con el aumento de x100, y se realizaron fotografías con la capturar de imágenes Nikon Digital Sight; para así estudiar la formación de depósitos cálcicos.

Una vez realizada la tinción de las muestras con la disolución de Alizarin y tras observar microscópicamente la capacidad de mineralización de las células en contacto con los materiales de estudio, se realizó la cuantificación de los depósitos de calcio:

9. Se retiró el agua ultrapura y se añadieron 800 µl/pocillo de ácido acético al 10% (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España).
10. Se colocaron las placas en oscuridad en el agitador durante 30 minutos a 120 rpm, para la solubilización de los depósitos de calcio teñidos.
11. Se desprendieron las células adheridas a los pocillos rascando suavemente con el rascador celular (Corning, Tamaulipas, México).
12. El sobrenadante de los pocillos junto con las células anteriormente despegadas se recogió mediante la pipeta de 1000 µl a los microtubos.
13. Se sellaron los microtubos con parafina (Bemis, Neenah, Wisconsin, EE.UU.) y seguidamente el contenido de los mismos fue mezclado con la ayuda del vórtex.
14. Se calentó la solución a una temperatura de 85°C durante 10 minutos en el termobloque (OHAUS, Greifensee, Suiza), y posteriormente se enfrió en hielo durante 5 minutos.
15. Se centrifugó durante 15 minutos a 20.000 g.
16. Se trasladó el sobrenadante (500 µl) a nuevos tubos Eppendorf.
17. Se añadió 200 µl/tubo de hidróxido de amonio para neutralizar el ácido acético.
18. Se preparó un microtubo adicional, que actuaría como blanco en la posterior medición de la absorbancia, por lo que se le añadió: 500 µl de ácido acético y 200 µl de hidróxido de amonio.
19. En una placa de 96 pocillos (Figura 20), se prepararon las medidas de los materiales y controles por triplicado.

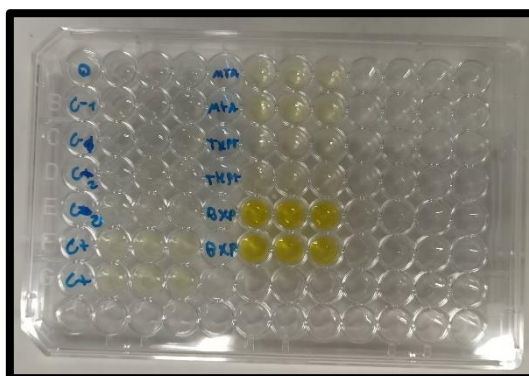


Figura 20. Placa preparada para la lectura de absorbancia.

20. Se efectuó la lectura de absorbancia de la placa en el espectrofotómetro INFINITE 200 PRO, ajustando el valor de medición de absorbancia a 405 nm.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos se han analizado empleando el software Graph-Pad Prism v8.1.0 (GraphPad Software). La cuantificación de dichos datos se calculó como las medias y desviaciones estándar (DE). La distribución de los datos fue comprobada previamente utilizando un gráfico Q-Q. La significancia estadística se evaluó mediante el test de análisis de la varianza ANOVA, seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Cada dilución fue considerada como un tratamiento independiente, en las representaciones gráficas * expresa valor $p < 0,05$, ** expresa valor $p < 0,01$ y *** expresa valor $p < 0,001$; considerándose significación estadística para un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

La actividad metabólica celular de las DPSCs en presencia de los materiales de estudio (sin diluir, diluidos 1:2 y diluidos 1:4) se evaluó tras 24, 48 y 72 horas de exposición.

El tratamiento con TheraCal PT sin diluir disminuyó de forma estadísticamente significativa la actividad metabólica con respecto al control (***) $p < 0,001$) en los tres periodos de tiempo evaluados (Figura 21). Sin embargo, tanto MTA Angelus como Biodentine XP, mostraron una actividad celular semejante a la del control tanto a las 24 como 48 horas, únicamente a las 72 horas mostraron una ligera diferencia significativa respecto al control (* $p < 0,05$).

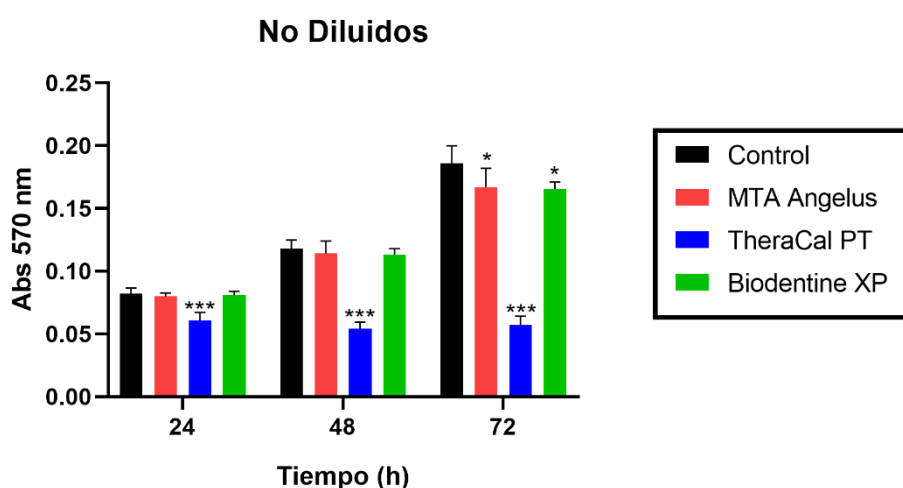


Figura 21. Resultados de MTT tras la aplicación de los materiales sin diluir.

La actividad metabólica de las células en presencia de los materiales a una dilución 1:2 se muestra en la Figura 22. Nuevamente se observa una disminución significativa (***) $p < 0,001$) de actividad respecto al control ante la exposición a TheraCal PT, en los tres periodos de tiempo analizados. En cambio, MTA Angelus, mantiene una actividad celular similar a la observada en el grupo control a las 24, 48 y 72 horas, no observándose diferencias significativas. En el caso de Biodentine XP, tan solo muestra una diferencia significativa (** $p < 0,01$) a las 72 horas, al comparar la actividad metabólica con el control, no observando diferencias a las 24 y 48 horas.

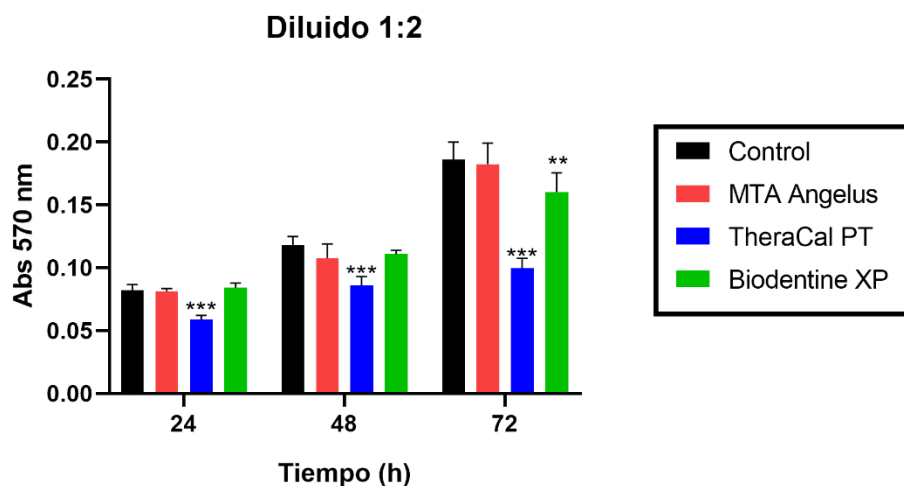


Figura 22. Resultados de MTT tras la aplicación de los materiales diluidos 1:2.

En la Figura 23, se muestran los resultados obtenidos cuando los materiales se diluyen 1:4. En este caso, únicamente el tratamiento con TheraCal PT provocó una ligera diferencia en la actividad metabólica (* $p < 0,05$) respecto al control a las 72 horas. El resto de tratamientos presentan valores próximos a los expresados por el control tanto a las 24, como a las 48 y 72 horas.

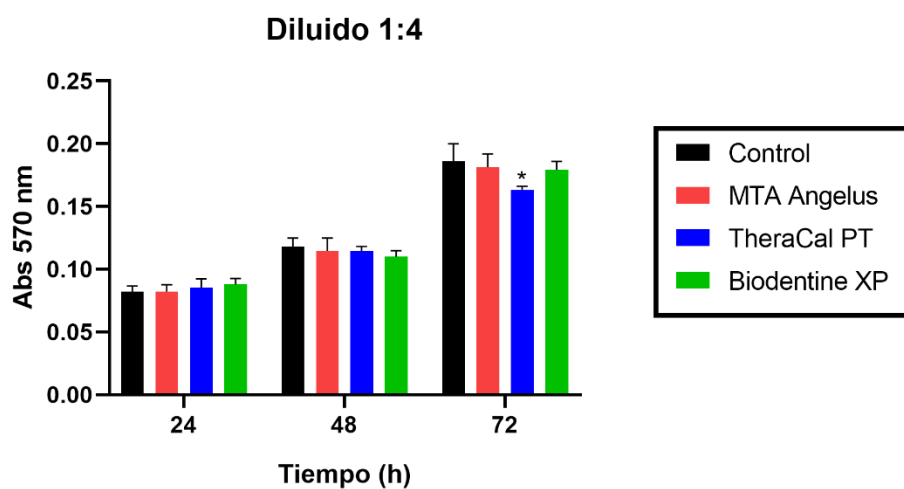


Figura 23. Resultados de MTT tras la aplicación de los materiales diluidos 1:4.

4.2. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

El análisis de los resultados obtenidos a partir del ensayo de migración celular (Figura 24), muestra como el MTA Angelus no provocó cambios significativos en el proceso de cicatrización celular en ninguno de los intervalos de tiempo estudiados, siendo los resultados obtenidos similares a los resultantes del grupo control, no evidenciándose interferencias significativas del MTA Angelus con los mecanismos de migración celular bajo las condiciones del estudio.

Sin embargo, se observó una menor capacidad de migración, tanto para TheraCal PT como para Biodentine XP, al ser comparados con el cultivo control, especialmente cuando se analizaron sin diluir.

El TheraCal PT, a pesar de no mostrar diferencias estadísticamente significativas cuando se presenta en dilución 1:2 y 1:4, muestra el menor porcentaje de herida abierta de todo el ensayo a las 72 horas, cuando se encuentra en dilución 1:2. No obstante, al evaluar dicho material sin diluir se observa una tasa significativamente reducida de cicatrización en comparación con el grupo control a las 48 (** $p < 0,01$) y a las 72 horas (***) $p < 0,001$).

Por otro lado, Biodentine XP en su forma sin diluir, evidenció una tasa significativamente menor de cicatrización (***) $p < 0,001$) que TheraCal PT a las 48 horas, al ser comparados ambos con el grupo control. Sin embargo, a las 72 horas, Biodentine XP refleja al igual que TheraCal PT una disminución en la capacidad de cicatrización que resulta estadísticamente significativa (***) $p < 0,001$) al ser comparada con la presentada por el control. Al igual que MTA Angelus y TheraCal PT, no se observan diferencias significativas al comparar Biodentine XP en dilución 1:2 y 1:4 con el grupo control.

En general, tras el análisis de los resultados del ensayo de migración celular, se observa que los materiales evaluados contribuyen positivamente al cierre de la herida, principalmente cuando se encuentra en dilución 1:2 o 1:4.

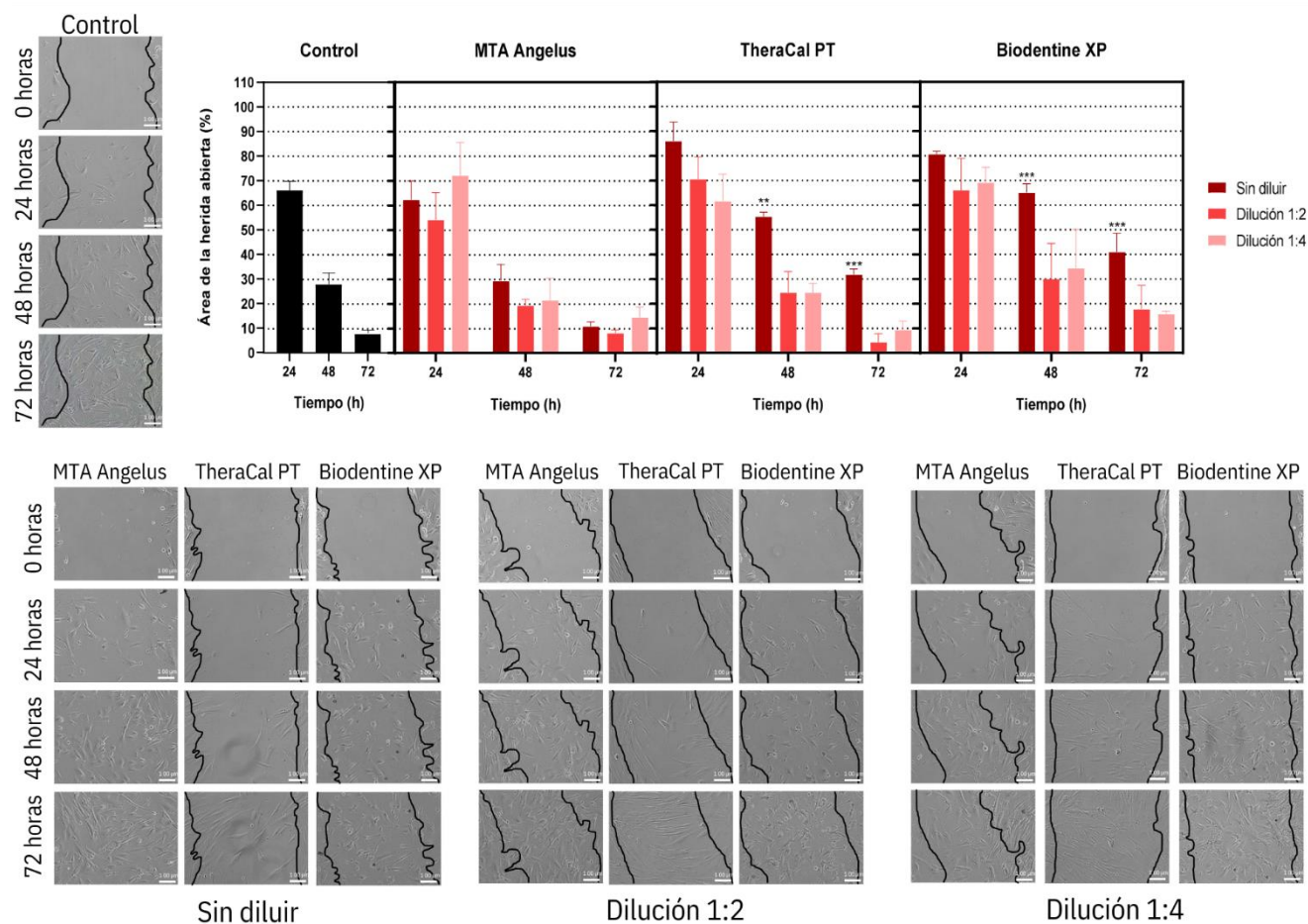


Figura 24. Evolución de la migración celular tras la exposición de las DPSCs a los diferentes eluatos de los materiales de estudio (1:1, 1:2 y 1:4).

El porcentaje de herida abierta se capturó en intervalos de 24 horas durante 3 días, en relación el porcentaje total de herida abierta a las 0 horas. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Adicionalmente, las imágenes muestran el área de herida abierta (escala 100 μm).

4.3. ENSAYO DE FLUORESCENCIA

En la Figura 25 se presentan las imágenes de las muestras evaluadas, el citoesqueleto se observa en rojo (Tinción con faloidina) y los núcleos celulares se observan en azul (Tinción con DAPI).

La cantidad de células viables observadas en presencia de TheraCal PT sin diluir fue claramente menor que en el resto de materiales, no obstante, cuando dicho material se encuentra en dilución tanto 1:2 como 1:4, se observa una mayor confluencia celular, al igual que ocurre en MTA Angelus y Biodentine XP, por lo que la respuesta a la faloidina afecta a la arquitectura celular del citoesqueleto de forma dependiente de la concentración.

Por otro lado, MTA Angelus y Biodentine XP, muestran una confluencia celular bastante similar a la observada en el cultivo control. No obstante, MTA Angelus, tanto sin diluir como en dilución 1:2, evidencia una mayor densidad y confluencia celular que el resto de materiales. Sin embargo, cuando la dilución del cultivo de MTA Angelus pasa a ser 1:4, se aprecia un leve aumento de expansión celular acompañado de un mayor tamaño celular, pese a que la densidad celular observada es menor que la del control.

En presencia de Biodentine XP, los cultivos se observan con células marcadamente fusiformes en comparación con las halladas en el control; especialmente cuando se encuentran sin diluir y en dilución 1:2. En cambio, cuando dicho material se encuentra diluido 1:4, a pesar de que presenta una confluencia y un crecimiento celular ligeramente inferior al control, la morfología celular alcanza su mayor grado de similitud en comparación con las analizadas en el cultivo de control.

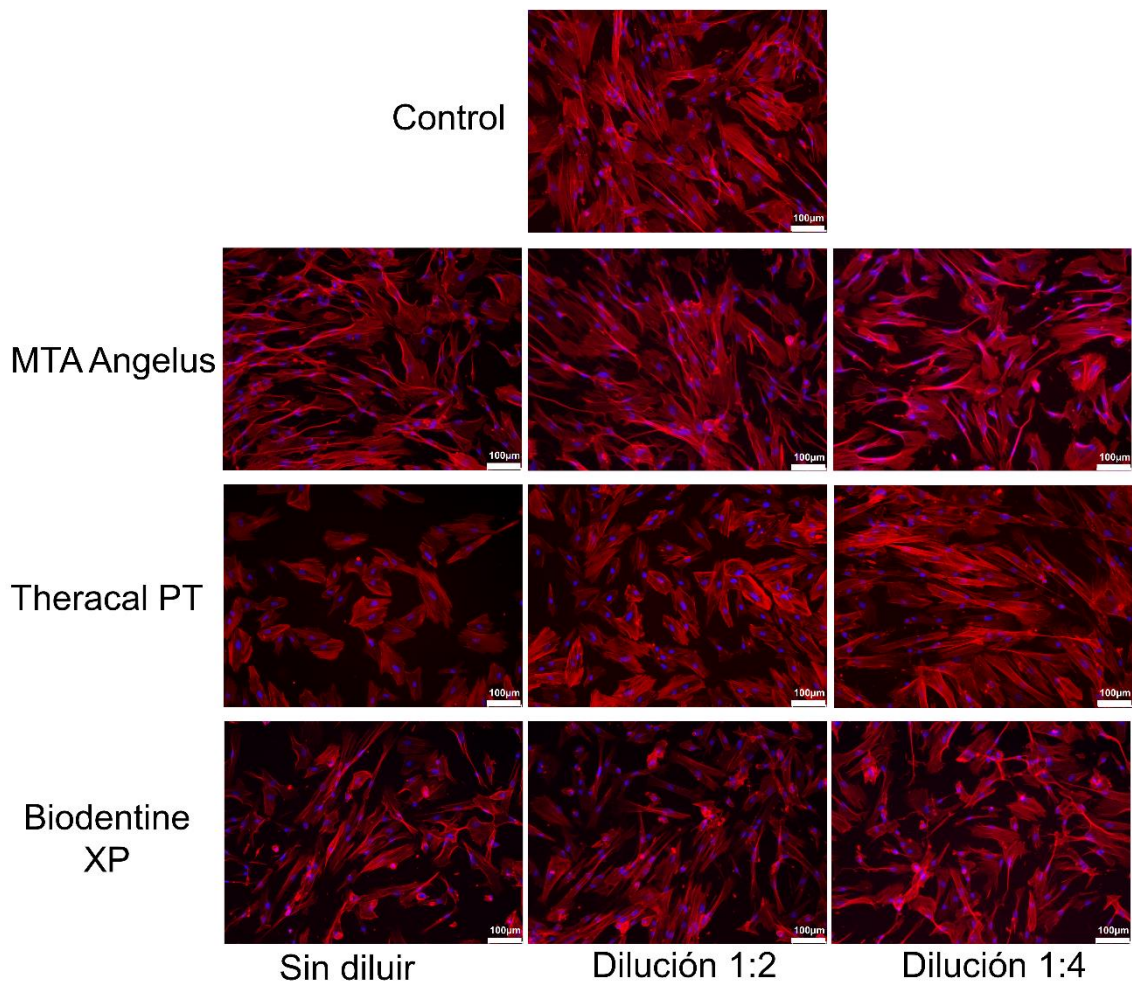


Figura 25. Observación de la estructura y organización del citoesqueleto y el núcleo celular de las DPSCs mediante microscopia de fluorescencia, tras el cultivo con los tres materiales de estudio durante 72 horas.

4.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

4.4.1. MORFOLOGÍA CELULAR Y ADHESIÓN A LOS MATERIALES

El análisis de la morfología y la adhesión celular de las DPSCs sembradas y posteriormente fijadas sobre los distintos materiales de estudio empleados para terapia vital pulpar, refleja la presencia de células con una morfología generalmente fusiforme, acentuada principalmente en MTA Angelus con células de mayor tamaño. En presencia de Biodentine XP, al igual que en MTA, se observaron células fusiformes especialmente alargadas, pero con un tamaño más reducido. En cambio, las células sembradas sobre TheraCal PT presentaron una morfología más irregular que el resto de células.

En cuanto a la adhesión celular observada sobre las superficies de los distintos materiales, las muestras con TheraCal PT presentaron una menor densidad celular junto con una menor adhesión celular a la superficie. Sin embargo, cuando las células se exponen a MTA Angelus, se observa un aumento en la cantidad de células adheridas, ampliamente extendidas e interconectadas sobre su superficie. La presencia de Biodentine XP, indujo una moderada cantidad de células con numerosos filopodios promoviendo la adhesión celular a la superficie de los discos.

Por tanto, las células, tras su observación con microscopía electrónica de barrido, mostraron una cierta adherencia a la superficie de todos los materiales evaluados, como se puede observar en la Figura 26, alineándose estos resultados con los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular.

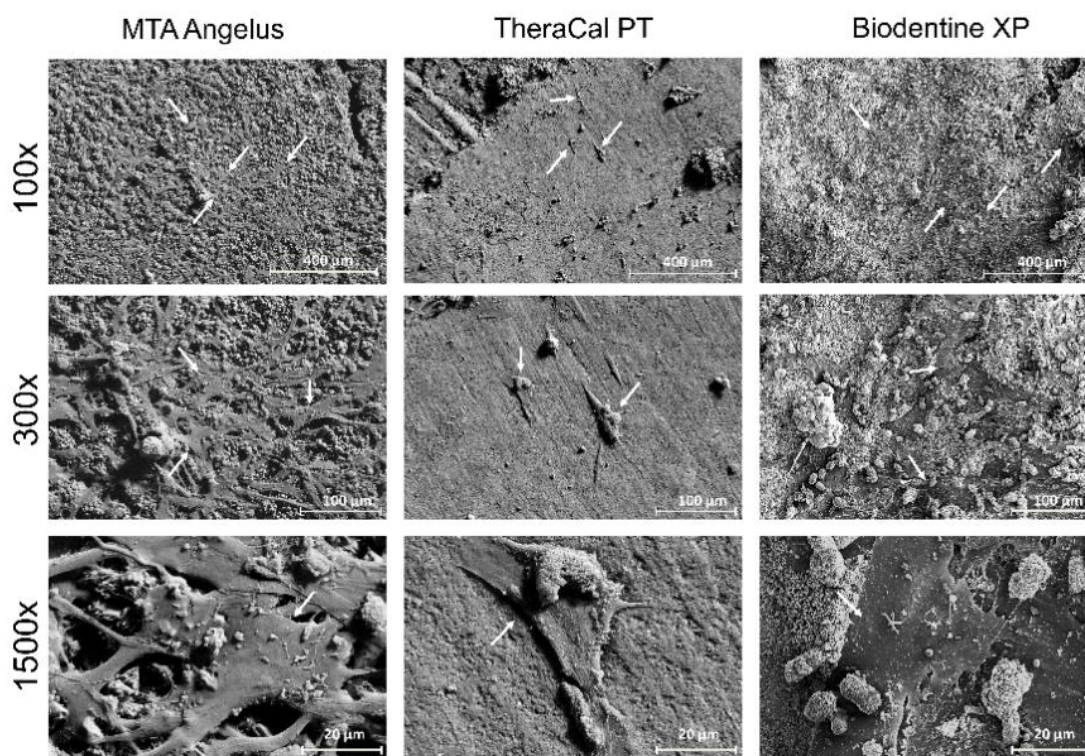


Figura 26. Micrografías tomadas a 100x, 300x y 1500x de la morfología y adhesión celular de las DPSCs cultivadas sobre los materiales de estudio.

4.4.2. ESPECTROMETRÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

El análisis EDX, evidenció la presencia en la superficie de los discos, de elementos químicos acordes con la composición indicada por los fabricantes de los materiales, como se observa en la Figura 27 y en la Tabla 1.

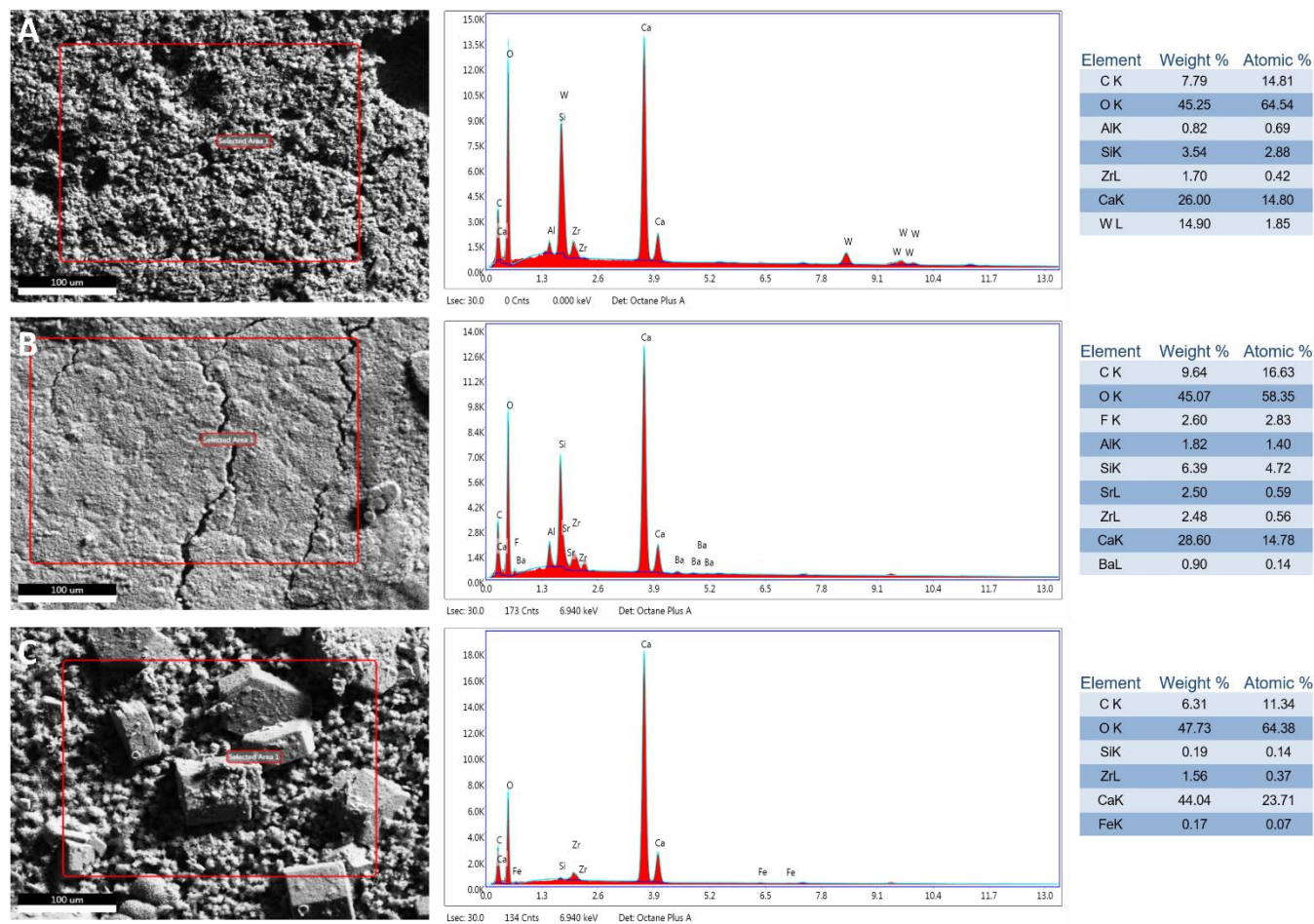


Figura 27. Espectrometría de los discos de MTA Angelus (A), TheraCal PT (B), y Biodentine XP (C). En la primera columna se muestran micrografías de la superficie de los materiales, en la segunda columna aparece el espectro de los elementos detectados y en la tercera se cuantifican los elementos de cada material por peso y peso atómico.

Los tres materiales analizados reflejaron principalmente altos porcentajes de calcio, oxígeno y carbono, siendo estos tres valores similares, se observó una mayor cantidad de calcio para Biodentine XP. En menor medida se detectó la presencia de otros elementos como silicio y hierro, en Biodentine XP; así como de aluminio y silicio en TheraCal PT y MTA Angelus. Además, se identificó en todos los materiales la presencia de circonio cuya función es actuar como elemento radiopacificador; adicionalmente se observó la presencia de un segundo elemento radiopacificador, como el tungsteno, en MTA Angelus.

4.5. ENSAYO DE ICP-MS

La liberación de iones producida por los materiales al entrar en contacto con PBS se analizó mediante el ensayo de ICP-MS, mostrándose los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados del análisis de ICP-MS de los materiales (ppb: partes por billón, ppm: partes por millón).

Nombre de la muestra	Al Conc. (ppb)	Ba Conc. (ppb)	Bi Conc. (ppb)	Fe Conc. (ppb)	Sr Conc. (ppb)	W Conc. (ppb)	Zr Conc. (ppb)	Ca Conc. (ppm)	S Conc. (ppm)	Si Conc. (ppm)
MTA Angelus	< 10	< 50	42,32	< 10	649,96	891,37	< 5	26,49	0,41	21,09
TheraCal PT	< 10	< 50	< 5	< 10	124,68	< 10	< 5	109,94	0,23	3,17
Biodentine XP	< 10	196,35	< 5	< 10	2854,98	< 10	< 5	40,61	45,71	32,03

Los datos revelaron que la concentración de iones calcio, azufre y silicio liberados por los materiales fue notablemente superior a la del resto de elementos. Principalmente todos los materiales liberaron iones calcio, siendo mayor en TheraCal PT. En cuanto a la liberación de iones azufre y silicio fue superior en Biodentine XP, comparado con el resto de materiales, no obstante, MTA Angelus también presentó una moderada liberación de iones silicio.

El resto de iones analizados presentaron una concentración notablemente reducida, no obstante, MTA Angelus presentó niveles de iones tungsteno y bismuto superiores a TheraCal PT y Biodentine XP; también mostró valores relevantes de estroncio, aunque fue Biodentine XP quién evidenció la mayor liberación de iones estroncio, al igual que de iones bario.

4.6. ENSAYO DE APOPTOSIS/NECROSIS CELULAR

El análisis de la apoptosis/necrosis celular, proporcionó gráficos de densidad que indicaron el porcentaje de células vivas (Q4), células apoptóticas tempranas (Q3), células apoptóticas tardías (Q2) y células necróticas (Q1) en las diferentes diluciones (1:1, 1:2 y 1:4) de los materiales analizados. Los diagramas representan los resultados de tres experimentos independientes realizados por triplicado para cada material.

Como se indica en la Figura 28, el porcentaje más alto de células vivas se observó en presencia de Biodentine XP, con valores próximos al 93% en las tres diluciones analizadas, siendo estas cifras muy similares al control. El porcentaje de células apoptóticas tempranas en presencia de dicho material en las tres concentraciones osciló entre el 5,1% y el 5,66%; con apenas células apoptóticas tardías y necróticas, cuyos valores se situaron en el intervalo del 0% al 1%.

Por otro lado, tras la incubación con MTA Angelus se obtuvo un porcentaje de células vivas prácticamente idéntico en dilución 1:4 y 1:2 (90,7% y 90,6% respectivamente), siendo este valor ligeramente inferior cuando se ensayó sin diluir, con un porcentaje de 88,2%. La cantidad de células apoptóticas tempranas aumentó al disminuir la dilución de los materiales, observando un 8,75% de células apoptóticas tempranas cuando el material se analizó sin diluir. En cambio, la concentración de 1:2 y 1:4, los valores fueron del 8,4% y del 7,63%.

La cantidad de células vivas detectadas en presencia de TheraCal PT fue idéntica tanto en su dilución 1:4 como 1:2, siendo el porcentaje de un 89%. Sin embargo, la cantidad de células apoptóticas tempranas fue mayor ante la dilución 1:2 (8,84%) que 1:4 (8,18%). Al disminuir la dilución del material aumentaron la cantidad de células apoptóticas tempranas. A su vez, TheraCal PT sin diluir indujo el mayor porcentaje de células apoptóticas tardías y necróticas con un valor de 3,09%.

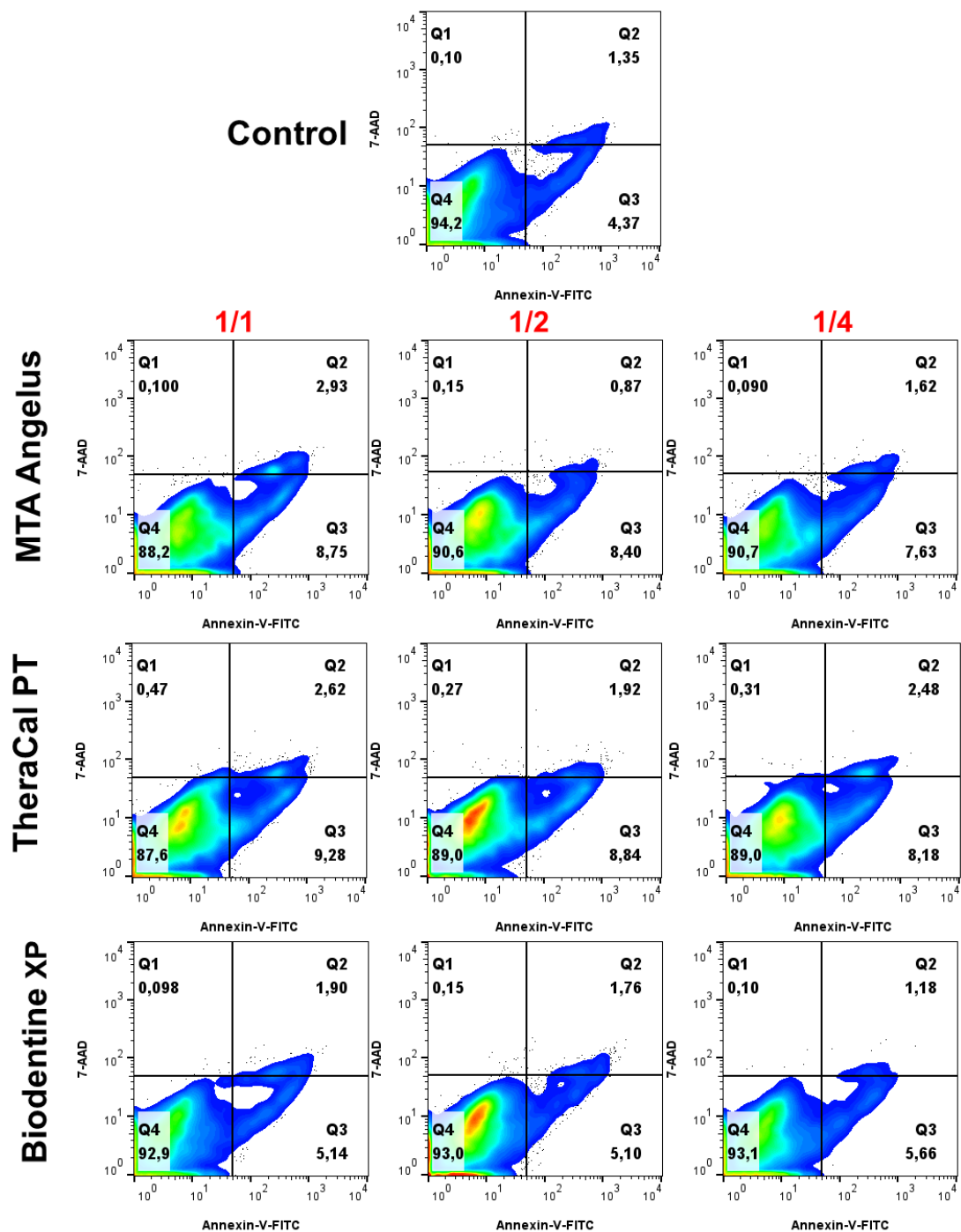


Figura 28. Análisis de la citometría de flujo de la apoptosis y necrosis celular inducida por los tres materiales de terapia vital pulpar en DPSCs mediante la tinción con Anexina-V-FITC y 7-AAD.

4.7. ENSAYO DE LA LIBERACIÓN DE ROS

La cantidad de especies reactivas de oxígeno intracelular, producida por parte de las DPSCs al ser tratadas con los materiales de estudio y posteriormente teñidas con CM-H₂DCFDA, reflejó tras la citometría de flujo (Figura 29) un incremento en los niveles intracelulares de ROS con el aumento de la concentración de los materiales.

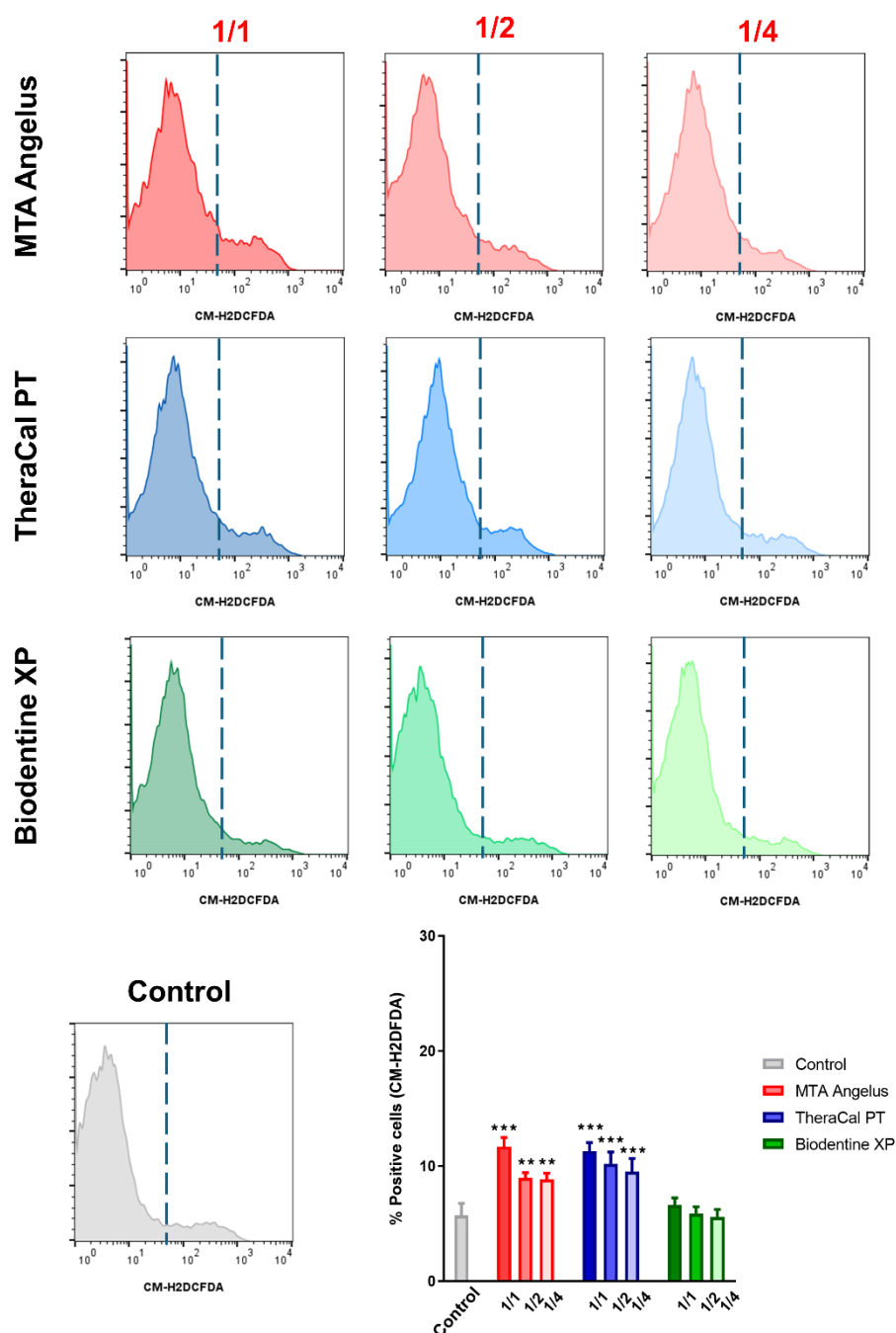


Figura 29. Análisis de la liberación de ROS en presencia de los materiales sobre DPSCs empleando CM-H₂DCFDA. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Los niveles más altos de ROS fueron evidenciados para TheraCal PT y MTA Angelus, cuando los materiales se encontraban en dilución 1:1, observándose diferencias significativas respecto a las células control ($*** p < 0,001$). Además, TheraCal PT, en diluciones 1:2 y 1:4, continuó presentando altos niveles de ROS intracelular en comparación con el grupo control.

Sin embargo, MTA Angelus al reducir su concentración a 1:2 y 1:4, disminuyó sus niveles de especies reactivas de oxígeno intracelular, no obstante, continuó induciendo niveles significativamente más elevados que el control ($** p < 0,01$).

En cambio, los niveles de ROS tras la incubación en el grupo de Biodentine XP, fueron muy semejantes a los observados en las células del grupo control. No evidenciándose diferencias estadísticamente significativas, entre dicho material en cualquiera de sus diluciones respecto al control.

4.8. ENSAYO RT-QPCR

La capacidad de diferenciación osteo-odontogénica de las DPSCs tras su cultivo junto a los materiales de estudio, se evaluó mediante el ensayo de RT-qPCR a los 3 y 7 días (Figura 30).

Los resultados mostraron una regulación positiva y estadísticamente significativa del gen ALP en presencia de MTA Angelus y de Biodentine XP, a los 3 días de incubación. Así, en ambos casos, los niveles de expresión del gen fueron significativamente superiores a los obtenidos tanto para el control positivo y negativo, como para TheraCal PT. No obstante, a los 3 días, los niveles de expresión de ALP en presencia de MTA Angelus fueron estadísticamente superiores a los inducidos por Biodentine XP ($** p < 0,01$). Este aumento de la expresión de ALP, se mantiene a los 7 días para el caso de MTA Angelus, siendo significativamente superior a la obtenida para el resto de los materiales y los controles positivos y negativos ($*** p < 0,001$). Por el contrario, se observa una caída drástica en los niveles de expresión del gen ALP en presencia de Biodentine XP a los 7 días, con niveles inferiores a ambos controles.

Los niveles de expresión DSPP, variaron en función del momento del análisis, observándose un aumento de expresión estadísticamente significativo a los 3 días en el

cultivo que presentaba Biodentine XP, al ser comparado con el resto de grupos (** $p < 0,001$). Sin embargo, a los 7 días fue en el cultivo con MTA Angelus donde se observaron las mayores diferencias (** $p < 0,001$) en el aumento de la expresión de dicho gen con respecto a los grupos control, así como con los resultados obtenidos para el resto de los materiales analizados. No obstante, Biodentine XP produce un aumento en la expresión de DSPP a los 3 días claramente superior al que induce MTA Angelus a los 7 días.

Por lo que se observó como tanto MTA Angelus como Biodentine XP estimularon la expresión génica principalmente de DSPP y ALP con niveles claramente superiores al control negativo, y por tanto superando los niveles basales.

En cuanto a Col1A1, se evidenció un incremento en la expresión de dicho gen a los 3 y 7 días en presencia de MTA Angelus. Este incremento resultó ser estadísticamente significativo al compararse con los resultados obtenidos tanto para ambos grupos control como para el resto de materiales analizados (** $p < 0,001$). Estas diferencias de expresión resultaron ser menores a los 7 días cuando se comparó con el control negativo, a pesar de que seguían siendo significativas (* $p < 0,05$).

Finalmente, la expresión génica de RUNX2 y ON en presencia de los materiales estudiados, no mostró diferencias significativas en cuanto a una mayor estimulación de expresión génica con respecto al control negativo, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. Únicamente se observó un aumento de expresión significativo en presencia de MTA Angelus con respecto a OsteoDiff (** $p < 0,01$) a los 3 días.

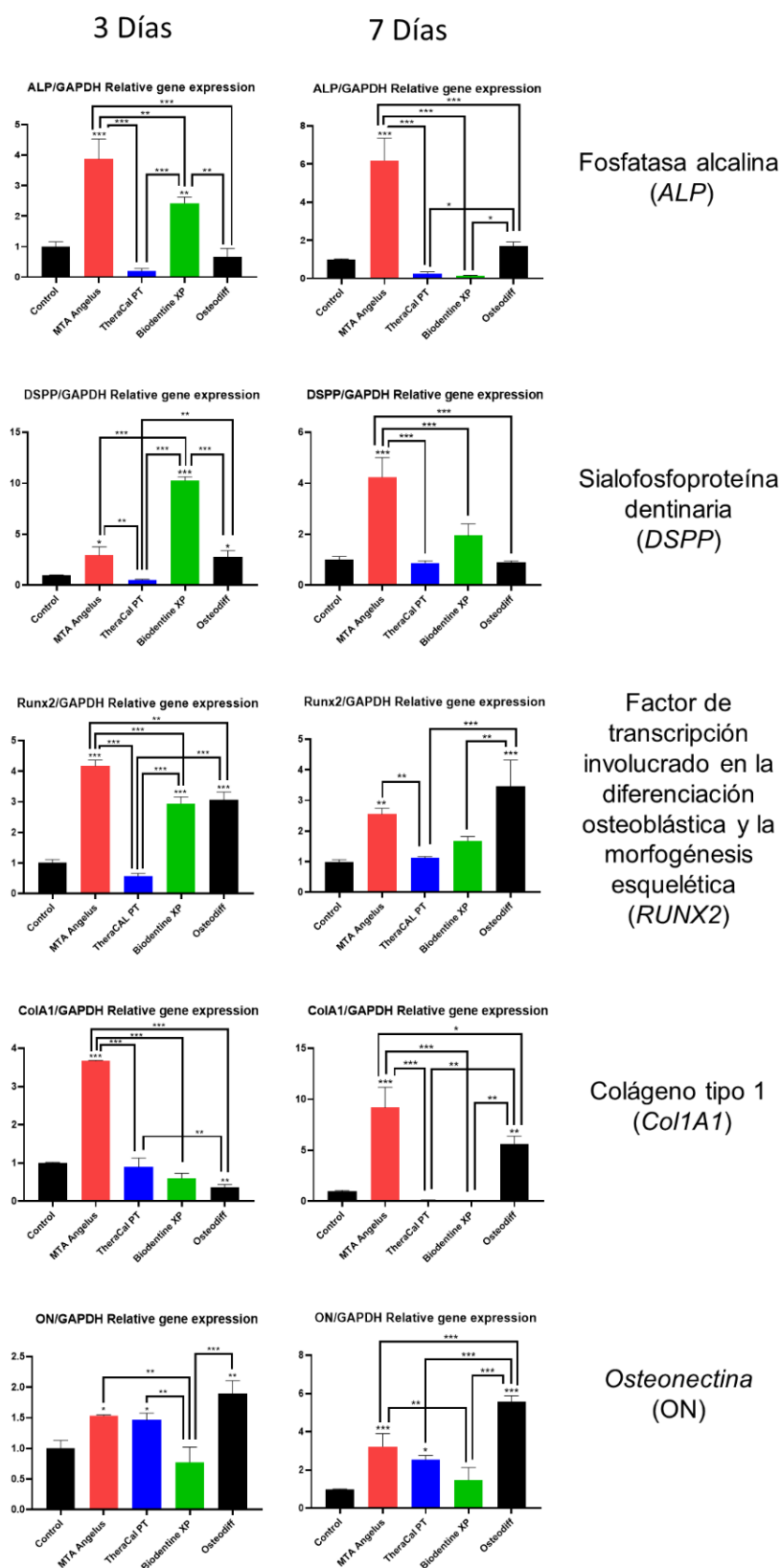


Figura 30. Expresión de marcadores osteo-odontogénicos por parte de las DPSCs tras su cultivo junto a los materiales de estudio, y posteriormente analizadas mediante RT-qPCR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.9. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN

El potencial de mineralización mostrado por parte de las DPSCs cultivadas junto con los materiales de VPT, se observó tras la aplicación de la tinción Alizarin Rojo S a los 21 días. Los resultados se representan en la Figura 31. En general, todos los materiales presentaron un potencial de mineralización distinto, con diferencias significativas tanto entre ellos como respecto a los controles de cultivo.

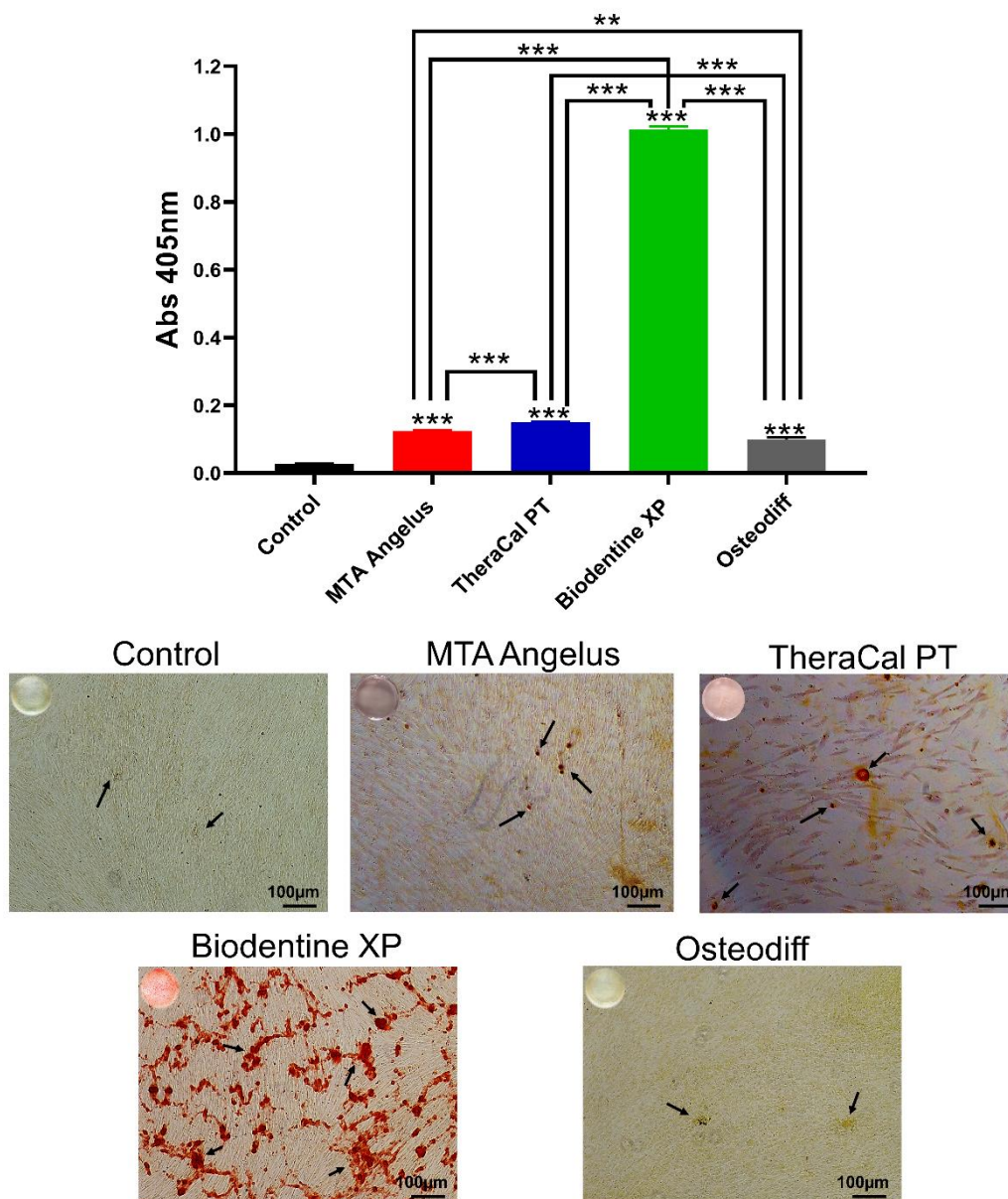


Figura 31. Resultados de la tinción con Alizarin Rojo S para el estudio de la formación de nódulos mineralizados por parte de las DPSCs cultivadas junto a los materiales y a los grupos control, analizadas en el día 21. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En relación con el control negativo, tanto OsteoDiff (control positivo) como el resto de materiales exhibieron una capacidad significativamente superior de mineralización (** $p < 0,001$). En particular, el grupo tratado con Biodentine XP fue quien mostró un pico de mineralización significativamente más alto al ser comparado con el resto de materiales y controles (** $p < 0,001$).

Por otro lado, MTA Angelus y TheraCal PT, también evidenciaron diferencias significativas tanto entre ellos como respecto al control negativo (** $p < 0,001$), en cambio, al ser ambos comparados con OsteoDiff, fue MTA Angelus quien menores diferencias mostró (* $p < 0,01$).

En consonancia con el análisis estadístico, las imágenes de microscopia muestran la presencia de un elevado número de nódulos calcificados en el cultivo de Biodentine XP, siendo estos acúmulos los que presentan un tamaño más pronunciado y un color más intenso en comparación con el resto de materiales; ya que en los cultivos de MTA Angelus y TheraCal PT, aunque las imágenes reportan cierta presencia de nódulos mineralizados, estos son de menor tamaño y de un rojo más claro que los observados en Biodentine XP, no obstante TheraCal PT presenta tanto en las imágenes como en el análisis estadístico un leve incremento en su capacidad de mineralización al ser comparado con MTA Angelus.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. MANTENIMIENTO DE LA VITALIDAD PULPAR

Durante los últimos años se ha producido un cambio de paradigma en el manejo de caries profundas, los traumatismos y en las exposiciones pulpares iatrogénicas, donde se busca evitar el carácter invasivo de ciertos procedimientos dentales, como el tratamiento de conductos radiculares (125). Esto ha desembocado en estrategias de tratamiento menos invasivas basadas en principios biológicos, que tratan de preservar la vitalidad pulpar; por ello, a través de la VPT se persigue la eliminación de la irritación microbiana y la prevención de nuevos daños, mediante técnicas y biomateriales capaces de proteger y promover la reparación del complejo dentinopulpar (89).

Tradicionalmente, solo se aconsejaba la realización de tratamientos de terapia vital pulpar, en dientes que presentaban signos y síntomas de pulpitis reversible (126), pero realmente el diagnóstico preciso del estado pulpar es complejo, por lo que cada vez existe una mayor evidencia a favor de realizar VPT en dientes que presentan un estado pulpar susceptible de ser clasificado como irreversible (127). En ocasiones la inflamación no compromete a la totalidad de la pulpa y se localiza únicamente en el área afectada, por lo que al extraer el tejido infectado es posible la conservación de la vitalidad pulpar (128).

No obstante, el control del sangrado tras la eliminación del tejido infectado es un factor clave para el mantenimiento de la vitalidad pulpar. Un aumento del sangrado pulpar en el lugar de exposición sugiere que la respuesta inflamatoria se extiende de forma más profunda en el tejido pulpar, y por tanto se debe continuar eliminando tejido infectado, hasta intentar lograr el control de la hemorragia, pero si tras ello no se consigue estará indicado el tratamiento de conductos radiculares (126). El grado de sangrado pulpar es considerado como un indicador del estado inflamatorio pulpar que puede ayudar en la toma de decisiones acerca del tratamiento a realizar (125, 129). De este modo, si tras un periodo de 5 minutos se consigue la hemostasia, la conservación del tejido pulpar restante está indicada, y por tanto el siguiente factor a considerar es la elección de los materiales a emplear para lograr una mayor tasa de éxito de los tratamientos realizados (89).

5.2. USO DE MATERIALES EN TERAPIA PULPAR VITAL

Las últimas décadas han supuesto un notable avance en el estudio y comprensión de la biología pulpar, aspecto fundamental de la VPT. Así, gracias a los avances en el estudio del mecanismo de respuesta dentinopulpar, el enfoque actual se centra en el análisis y la posible mejora de los materiales empleados en tratamientos destinados a conservar la vitalidad pulpar (130).

En la literatura científica, se observa un creciente número de artículos acerca de los materiales utilizados en VPT. Sin embargo, son múltiples los materiales que aparecen de manera constante en el mercado, lo que hace necesario realizar estudios no solo que evalúen su eficacia y tasa de éxito, sino también sus propiedades de biocompatibilidad y bioactividad. Es por ello que el presente estudio examina dichas propiedades biológicas a través de una serie de ensayos experimentales.

Actualmente, el MTA es uno de los materiales más utilizados en la mayoría de los tratamientos de VPT, no obstante, en los últimos años han surgido nuevos materiales a base de silicato de calcio con el fin de mejorar las propiedades del MTA (131, 132); como es el caso del Biodentine.

Hoy en día los estudios apenas muestran diferencias significativas entre MTA y Biodentine, ni entre las tasas de éxito (112, 133-136), ni entre las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad (137).

En este contexto, las propiedades del nuevo Biodentine XP, únicamente han sido objeto de estudio por Cassiano y cols. (138), quienes evaluaron de forma conjunta tanto sus propiedades fisicoquímicas como ciertas propiedades biológicas (ensayo XTT y qPCR). Por ello, en la presente investigación se ha realizado un exhaustivo análisis *in vitro* de las propiedades biológicas de dicho material, y a su vez se han comparado con las de otros materiales sobre los que existe una mayor bibliografía como MTA Angelus y TheraCal PT.

5.3. SOBRE EL MÉTODO *IN VITRO*

El método *in vitro* llevado a cabo durante la presente investigación es considerado como el primer escalón a la hora de analizar las propiedades biológicas de los materiales (139).

Es evidente que el factor más importante y que distingue a un biomaterial de otro material, es su capacidad para coexistir en contacto con los tejidos sobre los que se coloca dicho biomaterial, por lo que el análisis de su biocompatibilidad es un hecho transcendental (120). Posteriormente, en función de los resultados obtenidos tras el análisis *in vitro*, será cuando se decida si se pasa a la parte de ensayos *in vivo* y finalmente a las pruebas clínicas, de modo que este proceso es obligatorio para garantizar la seguridad biológica de los materiales odontológicos empleados (140).

La metodología *in vitro*, se trata de un procedimiento relativamente rápido, sencillo, de carácter replicable, y con capacidad tanto para controlar el entorno del interfaz célula-material, como para medir la respuesta celular de forma precisa. Sin embargo, se trata de una técnica cuyos resultados clínicos son cuestionables ya que las condiciones simuladas no son idénticas a las que se obtendrían empleando el método *in vivo*. Es por esto, que los ensayos realizados *in vitro* precisan de un mayor número de investigaciones antes de poder establecer conclusiones sólidas. Lo ideal sería una combinación de ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos; para obtener unos resultados altamente satisfactorios (141).

Así, existen estudios como el de Lee y cols. (142), y Pedano y cols. (143), que analizaron el potencial de remineralización ósea y dental de las DPSCs en presencia de ciertos materiales, mostrando correlación entre los resultados tras analizar simultáneamente los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Nuestro estudio se basó estrictamente en la normativa internacional sobre la evaluación biológica de los productos sanitarios biológicos respecto a dispositivos médicos (ISO 10993:2009), donde se establecen los protocolos a seguir tanto para la preparación de las muestras y materiales de referencia, como para la realización de los ensayos *in vitro* de citotoxicidad; estableciéndose la obligatoriedad de realizar siempre que sea posible ensayos *in vitro* previos. Se trata de una normativa ampliamente utilizada que ayuda a simular de forma aproximada la situación clínica real, siendo por tanto utilizada en las investigaciones odontológicas que impliquen elementos que puedan conllevar riesgos biológicos como la citotoxicidad celular (144, 145).

5.4. SOBRE EL USO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL

Este estudio se ha llevado a cabo empleando DPSCs, ya que son consideradas como las candidatas ideales para la reparación y regeneración del tejido pulpar dañado. Son células de fácil acceso, que se pueden obtener de extracciones de terceros molares sanos o de piezas extraídas por indicación ortodóncica. Las células madre pulpaes destacan por su alto potencial de diferenciación, su fácil cultivo y su baja morbilidad (146, 147), características que han puesto en evidencia como las DPSCs pueden ayudar en la reparación del complejo dentinopulpar; efecto que en múltiples ocasiones se ve favorecido al entrar en contacto con las moléculas bioactivas de ciertos materiales (146, 148).

Sin embargo, la capacidad de diferenciación odontogénica de las DPSCs es un mecanismo complejo en el cual participan múltiples vías de señalización como las vías Wnt, BMP/Smad, MAPK, NF-Kb, PI3K/AKT/mTOR, vías de señalización de Notch y las vías de señalización paralelas multipath (149).

El potencial dentinogénico de las DPSCs, es una parte fundamental de la base biológica de la VPT, por ello se busca que los materiales promuevan la diferenciación de las células madre de la pulpa en células similares a odontoblastos. El objetivo es lograr la formación de dentina terciaria, y tratar de favorecer el pronóstico de los tratamientos de terapia vital pulpar. Este proceso está regulado por factores de crecimiento y reguladores transcripcionales tales como: BMP, TGF, FGF y Wnt; cuyo papel es la producción de dentina reparadora (35, 150).

El uso de las células madre pulpaes es esencial en aquellas investigaciones que tratan de evaluar las propiedades de los materiales empleados en VPT. Dichas células participan en los procesos de reparación del complejo dentinopulpar y presentan condiciones histológicas que permiten una evaluación precisa de las propiedades de bioactividad y biocompatibilidad que exhiben los materiales al entrar en contacto con las células pulpaes.

5.5. SOBRE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR

El ensayo MTT se basa en la capacidad de las células para a través de la acción mitocondrial reducir y convertir la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán, una sustancia púrpura altamente lipofílica, cuya concentración se determina por medio del análisis fotométrico de la placa y tras el cual se obtiene un dato que se correlaciona con el número de células metabólicamente activas (151, 152). Además, es necesario que las células se encuentren en un intervalo de crecimiento exponencial (153), por lo que en el presente estudio se compararon los resultados obtenidos en el ensayo a las 24, 48 y 72 horas. Este ensayo, es considerado una forma indirecta de cuantificar la proliferación celular (154).

Los hallazgos obtenidos reflejan como MTA Angelus y Biodentine XP tienden a aumentar la actividad metabólica celular con el tiempo (proliferación), ya sea en su forma sin diluir o en las diluciones 1:2 y 1:4. En cambio, TheraCal PT sin diluir presentó durante los tres intervalos de tiempo evaluados valores semejantes de actividad y por lo tanto de viabilidad celular; sin embargo, cuando se analizó en dilución mostró especialmente tras 72 horas en dilución 1:4 un aumento de la proliferación celular, aunque menos acentuado que los observados en MTA Angelus y Biodentine XP. Por lo que TheraCal PT, tanto en su forma sin diluir como en dilución 1:2, presentó diferencias claramente significativas respecto al control (***) $p < 0,001$), mostrando una menor actividad metabólica celular; únicamente cuando la dilución pasó a ser 1:4, las diferencias se observaron ligeramente reducidas (*) $p < 0.05$) a las 72 horas.

Estos resultados coinciden con los observados en el estudio realizado por Sanz y cols., donde la actividad metabólica celular aumentó cuanto más diluidos se encontraban los materiales y mayor intervalo de tiempo de cultivo transcurría, especialmente dicho estudio evaluó la viabilidad celular del TheraCal PT (118). De igual forma Lozano-Guillén y cols. (132), analizaron la viabilidad celular del MTA, y concluyeron al igual que Sanz y cols., que con el tiempo la actividad metabólica celular se veía claramente aumentada sin observarse diferencias significativas con el control, tampoco observó diferencias significativas con el control el estudio realizado por Khedmat y cols. (155), que analizó la actividad metabólica del MTA Angelus durante 14 días.

En el estudio de Rodríguez-Lozano y cols. (117), se realizó una comparación entre MTA Angelus y TheraCal PT, exhibiendo ambos resultados similares de actividad metabólica a los obtenidos en nuestro estudio, no evidenciándose diferencias significativas en MTA Angelus al ser comparado con el control positivo; pero si observándose en TheraCal PT (***) $p < 0,001$) al realizar la comparativa con el grupo control, tanto en la forma sin diluir como en dilución 1:2.

Por otro lado, existen estudios discordantes con los resultados expuestos por los autores anteriores, y que de igual modo tampoco siguen la línea obtenida en nuestra investigación, como el artículo de Küden y cols. (156), donde tanto MTA Angelus como TheraCal PT mostraron unas tasas de actividad metabólica celular significativamente menores que las observadas por el grupo control. No obstante, en consonancia con nuestro estudio sí que se observó una mayor actividad metabólica celular en presencia de MTA Angelus respecto a TheraCal PT. Sin embargo, tal estudio tiene una serie de diferencias respecto a los anteriores, ya que el ensayo empleado para la medición de la actividad metabólica en dicho caso fue el WST-1 (sal de tetrazolio soluble en agua) un método con menor citotoxicidad, que no requiere el uso de solventes adicionales para la medición de la absorbancia. Además, el estudio únicamente evaluó a los materiales en la forma 1:1, por lo que los resultados no son del todo equiparables a los obtenidos en nuestro estudio. De igual forma ocurrió con el estudio de Panda y cols. (157), donde aunque el método empleado fue el MTT y los intervalos de tiempo analizados coinciden con los llevados a cabo en la presente investigación, los materiales únicamente se evaluaron sin diluir; y todos ellos, excepto TheraCal PT, disminuyeron su actividad metabólica con el tiempo, siendo este el único estudio observado donde TheraCal PT mostró una actividad metabólica superior a la evidenciada en MTA Angelus.

En nuestra investigación, la mayor viabilidad celular fue observada en aquellas células cultivadas junto a MTA Angelus y Biodentine XP, concretamente a las 72 horas cuando se encontraron en dilución 1:4, siendo los valores equiparables a los del control.

Actualmente, no existen estudios suficientes que evalúen la biocompatibilidad del nuevo Biodentine XP, únicamente se ha logrado comparar con la reciente publicación de Cassiano y cols. (138), quien empleó el ensayo XTT para analizar la viabilidad celular de Biodentine XP, Bio-C Repair y Endosequence RRM Fast Set; cultivados junto a DPSCs

donde además se comparó con la posible afectación del ácido lipoteicoico, concluyendo finalmente que todos los materiales empleados mantenían la viabilidad celular, sin que la presencia del LTA afectase en la misma.

En cambio, si existe evidencia que equipare el uso de Biodentine convencional con el MTA e incluso se ha observado la mejora ciertas propiedades físicas y biológicas del Biodentine frente al MTA (158), presentando ambos una actividad metabólica celular equiparable donde en la mayoría de los casos no se observan diferencias significativas entre MTA Angelus y Biodentine, como se observa en el estudio realizados por Omid y cols. (159), donde tras 72 horas de cultivo no se apreciaron diferencias significativas entre los materiales, no obstante dicho estudio se realizó con materiales sin diluir.

Otro estudio, realizado recientemente por Novotná y cols. (160), comparó Biodentine convencional y TheraCal PT, en este caso en vez de DPSCs emplearon fibroblastos de ratón para llevar a cabo el cultivo, y tras 24 horas el ensayo de MTT reflejó como al ir disminuyendo la concentración de TheraCal PT los resultados eran cada vez más similares a los obtenidos con Biodentine, observándose una actividad metabólica significativamente reducida en las diluciones 1:1, 1:2 y 1:4, únicamente no se observó dicha diferencia cuando la dilución pasó a ser del 10%, no obstante dicho estudio para poder ser realmente comparado con el nuestro precisaría de un mayor número de intervalos de tiempo analizados, así como idealmente testar los materiales en DPSCs.

Los resultados de forma global sugieren que el uso de estos materiales aumenta la viabilidad celular con el tiempo, sin embargo, son necesarios más estudios que analicen y comparen la actividad metabólica especialmente de Biodentine y sus nuevas formas comerciales, para poder realmente equiparar sus efectos a los del MTA.

5.6. SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

El mecanismo de migración celular es un procedimiento complejo en el que participan múltiples factores de crecimiento, así como quimiocinas y esfingosinas, con el fin de que las DPSCs se movilicen a través de la matriz extracelular hasta el lugar de la lesión para lograr el cierre de la herida. Este proceso está influenciado por el microambiente local del tejido afectado, el estado inflamatorio y los materiales restauradores empleados (161, 162).

Por lo que debido a la influencia que tienen los materiales sobre las células a la hora de desplazarse hasta la zona dañada, se ha probado la afectación que producen MTA Angelus, TheraCal PT y el nuevo Biodentine XP sobre la migración celular. Además, para una mejor simulación de las condiciones biológicas se llevaron a cabo diferentes diluciones, por un lado 1:1 para aquellos casos en los que el material está sobre la pulpa, y por otro lado diluciones 1:2 y 1:4 simulando los casos en los que el material se emplea para tratamientos pulpares indirectos.

Son múltiples los estudios que emplean la migración celular para evaluar la capacidad de cicatrización de las DPSCs cuando entran en contacto con otros materiales (119, 132, 163, 164), y a pesar de que existen varias técnicas para su análisis (161), la mayoría de las investigaciones emplean la técnica de “woundhealing” (ensayo de herida). Sin embargo, Omid y cols. (159), emplearon el sistema Transwell para analizar la capacidad de migración tras 24 horas de MTA Angelus, TheraCal LC, CEM y Biodentine, siendo los dos últimos materiales los que presentaron mejores resultados.

En nuestro estudio se empleó técnica “woundhealing”, pudiéndose observar cómo al utilizar los materiales en dilución 1:2 o 1:4 no existieron diferencias significativas respecto al control en ninguno de los tres intervalos de tiempo analizados. En cambio, MTA Angelus fue el único material que no presentó diferencias en su forma sin diluir; ya que tanto TheraCal PT como Biodentine XP cuando se encuentran en proporción 1:1 muestran una reducción significativa en el porcentaje de herida abierta.

Varias publicaciones recientes llevaron a cabo procedimientos metodológicos idénticos a los efectuados en la presente investigación, obteniéndose en los estudios resultados semejantes a los nuestros. Por un lado, Rodríguez-Lozano y cols. (117), al comparar MTA Angelus con TheraCal LC y TheraCal PT, tampoco encontró diferencias entre MTA Angelus y el control en ningún periodo de tiempo ni dilución; pero sí al comparar TheraCal PT sin diluir con el control, en los tres intervalos de tiempo, en cambio en nuestro estudio solo se observó a las 48 y 72 horas. Además, también reportaron una ligera reducción en la capacidad de cicatrización en la dilución 1:2, que no fue reportada ni en nuestro estudio, ni en el publicado por Sanz y cols. (118), que no llegó a evidenciar afectación en la capacidad de cicatrización cuando TheraCal PT se encontraba en dilución 1:2 y 1:4; evaluó también la capacidad de otros materiales como TheraCal LC,

que afectó negativamente a la migración celular, y de Biodentine, que presentó una respuesta positiva en los tres periodos de tiempo, reduciendo únicamente la capacidad de cicatrización a las 48 y 72 horas cuando se encontraba sin diluir, por lo que presentó resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio acerca del nuevo Biodentine XP.

Aunque no se hayan encontrado estudios acerca del nuevo material, si existen algunos artículos que comparan materiales de VPT con el Biodentine convencional, como Manaspon y cols. (114), que comparó Biodentine con Dycal, ProRoot MTA y TheraCal LC, siendo los mejores resultados obtenidos para MTA y Biodentine. Siguiendo la misma línea, Tomás-Catalá y cols. (165), compararon el Biodentine con Neo MTA y MTA Repair HP, mostrando una clara superioridad el Biodentine, ya que logró el cierre de la herida de una forma significativamente más rápida que el MTA y el control, especialmente en dilución 1:2 y 1:4.

De forma global los nuevos materiales empleados en terapia vital pulpar buscan la liberación de sustancias que favorezcan el cierre de las heridas, por lo que este tipo de ensayos son necesarios para intentar analizar el comportamiento de los materiales sobre las células y su afectación en la cicatrización de heridas.

5.7. SOBRE EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA.

La morfología celular representa un signo de ausencia o no de citotoxicidad, puesto que la presencia de elementos citotóxicos en los materiales dentales puede afectar a la integridad celular, y por ende provocar la contracción del citoesqueleto de actina, la aparición de núcleos picnóticos y una disminución de células adheridas (121, 166, 167). La tinción con faloidina es una técnica comúnmente utilizada para el análisis del estado del citoplasma, ya que permite visualizar los filamentos de actina presentes en el mismo (168). A su vez, permite estudiar los efectos sobre los núcleos celulares, usualmente se emplea la tinción DAPI (169), con el fin de obtener conclusiones sobre la influencia de los nuevos biomateriales sobre la morfología celular.

En consonancia con lo obtenido en las mencionadas pruebas, en el caso de TheraCal PT sin diluir, se observó una menor presencia de células viables, sin embargo, este fenómeno fue mitigándose conforme fue aumentando la dilución de TheraCal PT.

La presencia de resina en la composición de TheraCal PT, podría ser el condicionante de estos resultados. De hecho, en estudios previos se ha podido comprobar que, aunque la evolución de TheraCal PT supera las propiedades biológicas de TheraCal LC no llega aún a las óptimas propiedades de Biodentine o MTA Angelus (117, 118). En ambos estudios el análisis de inmunofluorescencia evaluó la organización citoesquelética de DPSCs expuestas a diferentes diluciones de TheraCal PT, TheraCal LC, MTA Angelus y Biodentine. TheraCal PT y Biodentine en diluciones 1:2 y 1:4 mostraron filamentos de actina bien organizados, morfología similar a fibroblastos y alto contenido de actina F, lo que indica una buena adhesión y diseminación celular, similar al grupo de control. Las células tratadas con MTA Angelus exhibieron una fuerte integridad citoesquelética, con una gran cantidad de células similares a fibroblastos adheridas y bien diseminadas, particularmente en diluciones 1:1 y 1:2, lo que confirma sus propiedades bioactivas superiores para la terapia de la pulpa vital frente a los otros biomateriales.

Por el contrario, las células tratadas con TheraCal LC mostraron una morfología aberrante y una organización citoesquelética reducida, particularmente en concentraciones más altas (1:1 y 1:2), lo que indica una citocompatibilidad deficiente. Aunque se observó cierta mejora en la adhesión y propagación celular con una dilución 1:4, siguió siendo inferior a los otros materiales probados. La intensidad de la tinción con actina F en MTA Angelus y Biodentine confirmó su baja citotoxicidad y su capacidad para apoyar la unión y diferenciación celular, lo que los convierte en opciones óptimas para la curación de la pulpa (117, 118); en cambio, la adición de resinas a los materiales de silicato de calcio, puede desencadenar cuadros de citotoxicidad pulpar que alteren los resultados de los tratamientos efectuados y que por tanto comprometan la vitalidad pulpar (115).

En general, MTA Angelus exhibió la mejor organización citoesquelética, seguido de TheraCal PT y Biodentine, mientras que TheraCal LC evidenció la biocompatibilidad más baja. Estos hallazgos enfatizan la importancia de seleccionar materiales bioactivos que promuevan la integridad de los filamentos de actina y la adhesión celular para garantizar una reparación/regeneración óptima del tejido pulpar en los procedimientos VPT (118).

Existen también estudios como el de Lozano-Guillén y cols. (132), que siguen una metodología similar a la empleada en nuestra investigación, para tratar de evaluar

mediante la técnica de inmunofluorescencia, distintas formas comerciales de MTA; tras su análisis, todas ellas exhibieron una morfología celular similar al control, al igual que ocurrió tanto en nuestro estudio como en los mencionados anteriormente.

Otros autores, efectuaron una comparativa acerca de la integridad citoesquelética exhibida por ciertos materiales basados en silicato de calcio, entre los que se encontraban ProRoot MTA y Biodentine convencional, ambos estudios mostraron para ProRoot MTA una morfología celular extendida y filamentos actina F similares a los observados en el grupo control (121, 170). En cambio, los resultados expuestos para Biodentine no fueron coincidentes entre ambos autores, ya que Ghilotti y cols. (121), no evidenciaron cambios morfológicos en Biodentine 1:1 respecto al control, y sin embargo, Bossù y cols. (170), tras el análisis de inmunofluorescencia realizado sobre células de sarcoma osteogénico humano (SaOS-2), evidenciaron una ligera alteración en la morfología celular, al realizar la comparativa entre Biodentine sin diluir y el grupo control, no siendo así cuando Biodentine se presentaba en dilución 1:4, ya que en tal caso los resultados presentaban una integridad citoesquelética similar al control; no obstante, estos últimos resultados coinciden con lo observado en la presente investigación, ya que cuando Biodentine se analizó en la concentración más baja (1:4), este presentó el mayor grado de similitud en cuanto a morfología celular al ser comparado con el control.

5.8. SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS MATERIALES Y SU RELACIÓN EN LA ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR.

El comportamiento de las DPSCs en contacto con los materiales de estudio, así como la composición química presentada por dichos materiales, requiere de la precisión de la microscopia electrónica de barrido (SEM), ya que permite la observación de las microestructuras de los materiales, y además al emplearse de forma conjunta con EDX permite obtener información adicional acerca de la composición de los materiales (171), ambas características desempeñan un papel relevante en el análisis de la biocompatibilidad de los materiales, puesto que permiten la observación de las interacciones morfológicas entre las células y los materiales de estudio (172).

De acuerdo con los hallazgos obtenidos en los anteriores ensayos de la investigación, el análisis del SEM aportó información adicional acerca de la adaptación celular a la superficie de los materiales mediante filopodios celulares. Todos los materiales analizados presentaron células adheridas, aunque MTA Angelus fue quien mayor adhesión e interconexiones celulares mostró, seguido de Biodentine XP, y en menor medida de TheraCal PT, este último apenas evidenció células adheridas a la superficie de estudio. Estos resultados parecen asociados a la composición de los materiales, puesto que tras el análisis EDX principalmente se observó la destacada presencia de calcio, oxígeno y carbono en los materiales; siendo los iones calcio liberados por los materiales un factor clave en la formación del puente dentinario (173).

En general, son varios los autores que han empleado la técnica de microscopía electrónica de barrido junto a la espectrometría dispersiva de rayos X para analizar las propiedades de los materiales dentales pulpares (117, 121, 132, 171, 173-176).

Los estudios realizados por Lozano-Guillén y cols. (132), y Tomás-Catalá y cols. (176), acerca de diversos materiales basados en MTA, concluyeron al igual que nuestro estudio la presencia de numerosas DPSCs adheridas a las superficies estudiadas formando amplias redes de células interconectadas, siendo MTA Angelus, quien mayor confluencia celular evidenció; a su vez el análisis EDX mostró en todos los materiales analizados elevados picos de calcio.

Rodríguez-Lozano y cols. (117), observaron al igual que los autores anteriormente, mencionados elevados picos de calcio tras el análisis EDX sobre la superficie de MTA Angelus, en cambio cuando estos datos fueron comparados con TheraCal LC y TheraCal PT, ambos materiales presentaron bajos porcentajes de ion calcio, siendo estos resultados equiparables a los obtenidos por Küden y cols. (156), quienes tras analizar dichos materiales reflejaron altos valores cálcicos en MTA Angelus pero bajos para TheraCal. No obstante, Rodríguez-Lozano y cols. profundizaron en el análisis de la adaptación celular sobre la superficie de los materiales mediante SEM y evidenciaron una gran adhesión celular sobre la superficie de MTA Angelus; en cambio cuando estos datos fueron comparados con TheraCal LC y TheraCal PT, el primero evidenció escasas células sobre su superficie estudiada, pudiendo evidenciar una situación de muerte

celular, sin embargo, TheraCal PT reflejó resultados moderadamente superiores, pudiendo ser estos datos equiparables a los obtenidos en nuestro estudio.

Existen otros estudios que a pesar de no investigar acerca de la adhesión a la superficie de los materiales mediante microscopía electrónica de barrido, si analizaron los componentes de los materiales mediante la técnica EDX. En la mayoría de casos, los autores reflejaron los mayores picos de ion calcio en la forma convencional de Biodentine, como se observa en las publicaciones de Anthrayose y cols. (173), quien tras 14 días de cultivo en agua desionizada a 37°C mostró un porcentaje 42,59%; en cambio Sismanoglu y cols. (174), cultivaron células procedentes de germen dental porcino durante 24 horas sobre diversos materiales, y del mismo modo el valor más alto de Ca^{2+} se observó en Biodentine con una cifra del 33,5%. Por su parte, Kunert y cols. (175), publicaron en consonancia con lo anterior y tras un intervalo de cultivo de 1 día y 28 días sobre fragmentos de dentina humana, como Biodentine presentó los valores más altos de calcio de todos los materiales analizados con un porcentaje de 44,73% y 35,09% respectivamente, estos resultados se pueden equiparar a los obtenidos en nuestro estudio, a pesar de que en nuestro caso el periodo de cultivo fue de 72 horas y se emplearon DPSCs, el valor máximo de ion calcio tras el EDX se observó en Biodentine XP con un porcentaje de 44,04%.

Aun así tras los datos obtenidos con el ensayo SEM-EDX, hay que tener en cuenta que existen otros métodos analíticos complementarios que ayudan a distinguir picos de hidróxido de calcio y fases cristalinas en los materiales, como son el análisis de difracción de rayos X (XRD) y la espectroscopía de infrarrojo con transformadora de Fourier por reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) que han sido empleados en diversos estudios sobre materiales dentales, aportando información adicional sobre la estructura química y cristalina de los materiales, ayudando a determinar la biocompatibilidad de los mismos (171, 173, 175, 177).

5.9. SOBRE EL ICP-MS

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, permite detectar los niveles totales de iones liberados por el objeto de estudio, ayudando a identificar la presencia de elementos tóxicos en los tejidos del organismo; por lo que dicha técnica es

cada vez más empleada en el ámbito sanitario para intentar mejorar la biovigilancia celular (178).

En este caso se empleó el ensayo ICP-MS como técnica complementaria al SEM-EDX, con el fin de cuantificar la cantidad total de iones liberados al medio por los materiales. Ambas técnicas, coincidieron en la presencia y liberación de iones calcio en todos los materiales estudiados, pese a ello, tras el ICP-MS se observó la mayor liberación de calcio en TheraCal PT, hecho que difiere de los resultados expuestos tras el SEM-EDX. Sin embargo, coincide con lo observado en el estudio de Rodríguez-Lozano y cols., donde tras la espectrometría de masas el mayor pico de calcio fue observado en TheraCal PT (117).

En general, la capacidad de liberación de iones está relacionada con las propiedades de los materiales, por lo que la presencia de iones calcio es un factor clave para el éxito de los procedimientos de terapia vital pulpar, debido a su impacto sobre la diferenciación de las células madre dentales (179).

No obstante, la alta liberación de iones calcio estuvo acompañada a su vez de la notable presencia de iones silicio, cuyos picos fueron observados tanto en Biodentine XP como en MTA Angelus; Tomás-Catalá y cols. publicaron dos artículos donde comparan MTA Repair HP y NeoMTA Plus, con la forma convencional de Biodentine (165) y con MTA Angelus (176), ambos artículos evidenciaron tasas más elevadas de liberación de iones silicio en los últimos materiales testados, siendo Biodentine quien mayor liberación mostró, hechos coincidentes con lo observado en los resultados de nuestro estudio.

Además del calcio, el silicio, es uno de los oligoelementos más importantes del cuerpo humano, ya que participa en el proceso de mineralización y crecimiento óseo, por lo que con el fin de aprovechar sus características se ha incorporado, junto con los iones calcio, en numerosos biomateriales para potenciar su bioactividad, de modo que existen estudios que corroboran como la liberación de iones silicio por parte de los materiales estimula la diferenciación osteogénica (180, 181).

Asimismo, existen otros autores que tras el ICP-MS tratan de identificar la presencia de elementos con potencial de toxicidad en los biomateriales dentales. Simsek y cols., evaluaron una serie de materiales dentales, entre los que se encontraba la forma

convencional de Biodentine, y analizaron la posible presencia de elementos carcinógenos (plomo, cromo y berilio) y neurotóxicos (aluminio) en tejidos de cerebro, hígado y riñón de rata; concluyendo la ausencia de cantidades susceptibles de provocar daños toxicológicos (182). Una metodología similar fue seguida por Janini y cols. (183), quienes emplearon muestras renales de rata para analizar la presencia de acúmulos de metales procedentes de los elementos radiopacificadores de múltiples materiales dentales, siendo Biodentine, el material que mayor estabilidad renal mostró.

En contraposición Jang y cols. (184), publicaron acerca de una comparativa entre MTA, BioAggregate y Biodentine donde tras el ICP-MS, Biodentine mostró niveles significativamente altos de arsénico, cobre, hierro, manganeso y zinc; pudiendo esto afectar a la citotoxicidad celular y a la decoloración del material. Sin embargo, no existen más informes que reporten resultados similares a estos, ya que como se ha observado a lo largo del análisis de la espectrometría, y como concluye Camilleri y cols. (185), tras analizar MTA Angelus, BioAggregate y Biodentine; los materiales dentales basados en silicato de calcio liberan cantidades mínimas de oligoelementos tóxicos, siendo en general materiales altamente biocompatibles.

5.10. SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR

El análisis de la apoptosis y necrosis celular observada en las DPSCs tras su contacto con los materiales de estudio, se realizó a través de la citometría de flujo con la tinción Anexina V/7-amino-actinomicina, que permite diferenciar la apoptosis temprana y tardía de la necrosis celular, esto se debe a que las células apoptóticas tempranas expresan en la capa externa de la membrana plasmática, fosfatidilserina, un fosfolípido que se puede detectar mediante la Anexina V; en cambio, cuando las células pierden la integridad de la membrana celular, se convierten en permeables a ciertos colorantes vitales como el 7-AAD, permitiendo diferenciar células tanto apoptóticas tardías como necróticas (186, 187).

Las características de este método hacen que sea ampliamente utilizado para evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de ciertos materiales dentales como: adhesivos (188, 189), cementos de resina (190) o el peróxido de hidrógeno (191) .

Así pues, en nuestra investigación, se empleó con el fin de analizar los valores producidos por ciertos materiales empleados en VPT, observándose como tras comparar los resultados del ensayo, Biodentine XP fue el material que mejores tasas de viabilidad celular evidenció, mostrando en todas las concentraciones datos muy próximos a los del control. En cambio, TheraCal PT, a pesar de expresar datos altamente aceptables, fue el material con mayor número de células apoptóticas; resultados que pueden estar asociados a la liberación de sustancias citotóxicas procedentes de la resina presente en el material. No obstante, los resultados de este ensayo siguen la línea observada tras el análisis de MTT y de la migración celular, donde TheraCal PT mostró una menor capacidad de respuesta celular, siendo Biodentine XP y MTA Angelus los materiales que mejores resultados reportaron.

Estos resultados siguen mostrando consonancia con los datos obtenidos tanto por Rodríguez-Lozano y cols. (117), como por Sanz y cols. (118), cuyos resultados fueron prácticamente idénticos a los observados en nuestro estudio, donde la mayor viabilidad celular se logró en la forma más diluida de los materiales. En contraposición, existe un artículo publicado por Rodrigues y cols., que tras analizar los valores de apoptosis/necrosis celular producidos en presencia de MTA Plus y MTA Angelus en dilución 1:8 a las 24 horas de cultivo, observaron un ligero aumento significativo en el porcentaje de células necróticas en ambos materiales, lo cual puede estar asociado con alteraciones en el pH del medio, y que esto genere un estrés químico con capacidad para afectar a la integridad de la membrana celular (192).

Otros autores, ejecutaron el ensayo de apoptosis celular realizando una comparativa entre diferentes intervalos de tiempo, donde las DPSCs estaban en contacto con materiales dentales bioactivos (116, 193).

Kunert y cols. (116), evaluaron durante 24 y 48 horas los resultados obtenidos en distintos materiales de recubrimiento pulpar, entre los que se encontraban: TheraCal LC, ProRoot MTA, MTA Angelus, Biodentine, ACTIVA BioACTIVE y Predicta Bioactive. Tras su estudio, fue TheraCal LC quien reflejó un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas en ambos periodos de tiempo. Además, también se observó como a las 48 horas ProRoot MTA presentó un ligero descenso de células viables, pero sin llegar

a evidenciarse diferencias significativas. En cambio, el resto de materiales presentaron en ambos intervalos valores semejantes de viabilidad celular.

Por su parte, Birant y cols. (193), tras comparar los datos obtenidos de ProRoot MTA, Neo MTA Plus y Biodentine convencional, evidenciaron como la forma convencional de Biodentine mostró los mejores resultados del estudio, siendo este el material que presentó una mayor viabilidad celular y un menor número de células apoptóticas, especialmente a los 7 días. Sin embargo, no se llegaron a evidenciar diferencias significativas entre los intervalos de tiempo examinados.

5.11. SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS

El estudio de la liberación de especies reactivas de oxígeno se realizó con el fin de complementar los datos obtenidos tras el ensayo de apoptosis/necrosis celular; dichas especies tienen capacidad para generarse tanto de forma endógena, como a partir de interacciones con fuentes exógenas, como podrían ser los materiales de estudio, además son moléculas de señalización fundamentales en procesos como la apoptosis, proliferación y supervivencia celular (194). Por lo que, el aumento tanto de la citotoxicidad como de la genotoxicidad celular puede estar asociado con el estrés oxidativo producido por los materiales, lo que conlleva valores más elevados de ROS, que resultan en daños significativos a las estructuras celulares que pueden desembocar en muerte celular (195-197).

El análisis de la producción de ROS en las DPSCs al entrar en contacto con los materiales estudiados, reflejó como Biodentine XP en todas sus diluciones expresó valores muy similares al control, en cambio tanto MTA Angelus como TheraCal PT, evidenciaron un porcentaje de ROS aumentado significativamente, datos que coinciden con lo observado en el ensayo de apoptosis, siendo Biodentine XP el material con mejores resultados respecto a viabilidad celular y con menor capacidad para inducir estrés oxidativo. Siguiendo estos resultados se encuentra el estudio de Sanz y cols. (118), donde al igual que en nuestra investigación Biodentine no mostró diferencias significativas con el control, en cambio los resultados obtenidos en su análisis difieren de los nuestros al comparar los valores obtenidos para TheraCal PT, en su investigación no se observaron diferencias significativas en las formas diluidas de TheraCal, no obstante, no se han

observado otros artículos acerca de dicho material que analice su potencial de estrés oxidativo.

Autores como Chang y cols. (198), llevaron a cabo una técnica similar y evaluaron los niveles de ROS producidos por las células al entrar en contacto con Biodentine, Ortho-MTA, MTA Angelus e IRM, todos los materiales excepto IRM exhibieron valores muy similares sin diferencias significativas por lo que concluyeron, a diferencia de nuestro estudio, que los valores de MTA Angelus son comparables a la forma convencional de Biodentine.

En cambio, existen publicaciones de otros autores que llevaron a cabo ciertas modificaciones metodológicas que difieren de la presente investigación, ya que Bossù y cols. (170), a pesar de emplear el mismo indicador de estrés oxidativo, utilizaron para su cultivo células SaOS-2 y compararon los resultados obtenidos entre ProRoot MTA y Biodentine, concluyendo que aunque ambos materiales aumentaron la liberación de ROS, fue Biodentine quién mayor porcentaje evidenció. En cambio, Victoria-Escandell y cols. (199), analizaron MTA Angelus, AH-Plus y MTA-Fillapex en DPSCs, empleando OxyBlot como indicador de estrés oxidativo puesto que tenían como objetivo la detección de proteínas carboniladas para medir el daño oxidativo acumulado, tras el estudio MTA Angelus expresó un menor estrés oxidativo que el resto de materiales.

En general, tras los resultados de los siete experimentos realizados con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los tres materiales, se evidenciaron resultados prometedores para la nueva fórmula comercial de Biodentine XP.

5.12. SOBRE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

El potencial de diferenciación osteo-odontogénico de las DPSCs en presencia de los materiales de estudio, se evaluó mediante la cuantificación de la expresión génica asociada tanto a la formación ósea como de dentina; para ello se empleó la técnica RT-qPCR, que permite de un modo específico y extremadamente sensible, determinar el nivel de expresión de los genes diana (200, 201). Tras la cuantificación de los resultados, destacó principalmente la expresión altamente significativa de los genes fosfatasa alcalina (ALP) y sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), por parte tanto de Biodentine XP como de MTA Angelus.

En cuanto a la fosfatasa alcalina, se trata de un marcador celular que se expresa en las etapas iniciales de la maduración de los osteoblastos y odontoblastos, por lo que ALP es considerado uno de los marcadores tempranos que aparece en las etapas iniciales de la diferenciación odontogénica, presentando un rol clave en la reparación y calcificación de los tejidos dentales dañados tras lesiones pulpares, ya que estimula al tejido pulpar para la formación de matriz dentinaria (174, 202). En la investigación actual, se puede observar principalmente a los 3 días una sobreexpresión significativa de ALP tanto para MTA Angelus como para Biodentine XP; en cambio a los 7 días únicamente se evidencia para MTA Angelus, tales resultados coinciden con los expresados anteriormente ya que se trata de un marcador que aparece en etapas iniciales, asimismo estos resultados son coincidentes con otras publicaciones de materiales basados en silicato de calcio cultivados junto a DPSCs (117, 118, 138, 155, 203, 204), entre tales publicaciones destaca Cassiano y cols. (138), quien analizó el potencial de diferenciación de Biodentine XP, BIO-C Repair y Endosequence RRM Fast Set durante unos intervalos de 6 y 24 horas, evidenciando principalmente una regulación al alza significativa para ALP en el cultivo de celular que contenía el eluato de Biodentine XP, no obstante también destacó la presencia de otros marcadores como Col1A1 y RUNX2 tanto en Biodentine como en el resto de materiales, reflejando el potencial de los materiales basados en silicato de calcio para promover tanto la remodelación como la formación ósea.

La sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), es considerada uno de los marcadores específicos más relevantes de los odontoblastos, expresándose inicialmente en los pre-odontoblastos y en las células de la pulpa dental durante el proceso de desarrollo dental, por lo que está involucrada tanto en el proceso de diferenciación, como en la dentinogénesis primaria; a su vez DSPP es una proteína de matriz no colágena que aparece muy marcada en los odontoblastos maduros, siendo clave en la predicción del potencial de biomineralización (203, 205).

En esta investigación, a los 3 días de cultivo de las células en presencia de Biodentine XP, se observa para DSPP el pico máximo de expresión en cuanto a los marcadores osteo-odontogénicos analizados. No obstante, a los 7 días, dicha expresión se vio disminuida, destacando en cambio una regulación al alza de las células cultivadas junto a MTA Angelus; por lo que en general, ambos materiales mostraron altos umbrales de

diferenciación. Un estudio publicado por Widbiller y cols. (204), empleó materiales como ProRoot MTA y Biodentine para realizar un cultivo tridimensional directo sobre DPSCs, tras el cual efectuaron el análisis de diferenciación celular analizando un periodo de tres semanas, en este caso tras 7 días de cultivo no se apreciaron diferencias significativas entre los materiales y el control, en cambio tanto a los 7 como a los 14 días se evidenció como ambos materiales promovieron la regulación altamente significativa de DSPP, hecho que sustenta la presencia de dicha proteína en odontoblastos maduros.

Por otro lado, estudios como el de Koutrouli y cols. (203), tras evaluar el potencial de diferenciación tanto de MTA como de Biodentine, concluyeron al igual que en nuestro análisis y en el publicado por Sanz y cols. (118), como DSPP mostró valores de expresión significativamente amentados en comparación con MTA, especialmente a los 3 días de cultivo, concluyendo un mayor potencial de diferenciación celular por parte de Biodentine en comparación con MTA, ya que todos los marcadores investigados fueron altamente expresados por la forma convencional de Biodentine.

Siguiendo la línea de estas investigaciones, Wang y cols. (206), estudiaron la capacidad de diferenciación celular producida por Biodentine al entrar en contacto con DPSCs de tres grupos de edad diferentes, finalmente evidenciaron como a pesar de existir una disminución de sus propiedades al entrar en contacto con los grupos de edad más avanzados, Biodentine continuó promoviendo de forma significativa la diferenciación osteo-odontogénica.

5.13. SOBRE LA FORMACIÓN DE NÓDULOS CALCIFICADOS

El potencial de inducción de mineralización de los materiales empleados en los tratamientos englobados en VPT, es un indicador transcendental para analizar las propiedades bioactivas de los materiales de estudio, ya que la formación de puentes dentinarios ayudar a proteger la vitalidad de los tejidos pulpares dañados (207). Para evaluar dichas características, se empleó la tinción Alizarin Rojo S, que permite analizar de forma tanto cualitativa como cuantitativa la formación de nódulos calcificados (145, 208).

En la presente investigación, tras 21 días de cultivo se observaron valores significativamente elevados indicativos de una alta presencia de nódulos calcificados en

las DPSCs cultivadas junto a Biodentine XP, a su vez este fue el material que mayor intensidad colorimétrica presentó, en comparación con las células no tratadas y aquellas tratadas con MTA Angelus, TheraCal PT y OsteoDiff; hechos que parecen guardar relación con la cantidad de calcio presente en los materiales estudiados, ya que el contenido en calcio presente en los materiales está asociado con un mayor potencial de mineralización (209).

La composición de los materiales, por tanto, juega un papel fundamental, ya que como se puede observar en la Tabla 1, Biodentine XP emplea como medio líquido el cloruro de calcio, y en cambio, MTA Angelus utiliza agua destilada; existen estudios que indican que el uso de CaCl_2 es clave para una mayor liberación de iones calcio, ya que acelera la reacción de fraguado y mantiene un ambiente alcalino (209, 210). No obstante, a pesar de que se ha llegado a probar la adicción de CaCl_2 junto a MTA, pudiéndose observar una mejora de sus propiedades, siguen siendo necesarios más estudios sobre la influencia del cloruro de calcio para establecer mayores conclusiones para su uso junto a MTA (211, 212).

Así pues, actualmente, el potencial de mineralización está asociado a la rápida capacidad de liberación de iones calcio e hidróxido, junto a la estimulación de los depósitos de fosfato cálcico, siendo por tanto la capacidad de mineralización en los materiales bioactivos fundamental tanto para la cicatrización de los tejidos como para la formación de dentina reparativa (207, 213).

En consonancia con los resultados obtenidos, existen múltiples investigaciones acerca de la capacidad para estimular la formación de nódulos calcificados por parte de ciertas células en presencia de materiales dentales. En su mayoría, los estudios coinciden señalando a Biodentine convencional como uno de los materiales de VPT con mayor potencial de mineralización (118, 209, 210, 214-216).

Collado-González y cols. (216), efectuaron dicho ensayo durante 7, 14 y 21 días empleando como materiales de estudio MTA Angelus, Biodentine, TheraCal LC e IRM; tras 7 días el cultivo de Biodentine ya empezó a exhibir registros significativamente más elevados que el resto, tras culminarse el estudio a los 21 días, se evidenció la mayor diferencia respecto al resto de materiales. Estos resultados siguen la línea de Kale y cols.

(217), quienes emplearon los mismos intervalos de tiempo para analizar las posibles diferencias entre Biodentine y Propolis, finalmente a los 21 días, Biodentine mostró los resultados con mayores diferencias significativas acerca del potencial de mineralización.

Por tanto, se puede concluir que tras 21 días de cultivo la tinción con rojo Alizarin S refleja resultados concluyentes en cuanto a formación de nódulos calcificados. En nuestro estudio, además del alto pico de mineralización observado en Biodentine XP, destacó como MTA Angelus a pesar de mostrar valores próximos a TheraCal PT, fue superado por este último en cuanto a potencial de mineralización, datos que contrastan con lo observado por Rodríguez-Lozano y cols. (117), donde MTA Angelus superó ligeramente los resultados de TheraCal PT. No obstante, existen múltiples estudios que destacan la capacidad de MTA Angelus para estimular la formación de depósitos de calcio favoreciendo así sus propiedades de bioactividad (218, 219).

Finalmente, tras los ensayos de bioactividad se puede observar como Biodentine XP presenta resultados favorables tanto acerca de su potencial de diferenciación celular como en su capacidad de mineralización. Sin embargo, al igual que ocurrió con los ensayos de biocompatibilidad, es necesaria la presencia de mayor bibliografía acerca de Biodentine XP para una comparación directa con los hallazgos de esta investigación.

5.14. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La presente investigación muestra ciertas limitaciones sobre las que reflexionar antes de poder extrapolar las conclusiones obtenidas. En primer lugar, el hecho de que se trate de un estudio *in vitro* es uno de los principales aspectos a considerar, ya que las condiciones en las que se han llevado a cabo los ensayos del estudio no reproducen de manera exacta los parámetros que se encuentran en el medio oral, a pesar de que se han tratado de simular de la manera más precisa posible en el ámbito experimental, empleando diferentes diluciones de los materiales para simular los distintos espesores dentinarios; la concentración de los materiales que puede llegar a entrar en contacto con el tejido pulpar e incluso con la dentina, depende en todo momento del espesor de tejido dentario restante, siendo esto algo único en cada situación dental, hecho que el método científico *in vitro* no logra reproducir fielmente. Por ello, los resultados

obtenidos se deben interpretar de una forma global siendo necesarios estudios *in vivo* sobre animales que permitan una mayor divulgación científica de estos resultados.

Otro aspecto para considerar es el exclusivo análisis de las propiedades biológicas que se ha efectuado en este estudio, por lo que en el futuro es necesario que se lleven a cabo investigaciones acerca de las propiedades físico-químicas de los materiales empleados en la terapia pulpar vital, especialmente sobre los nuevos materiales, como es el caso de Biodentine XP. Así pues, también es necesaria bibliografía que analice la posible afectación sobre las posteriores restauraciones finales que se lleven a cabo, y su interacción con las tasas de éxito a medio y largo plazo.

Por otro lado, una limitación igualmente relevante en este estudio fue la dificultad para obtener evidencia científica con la que comparar nuestros resultados, sobre todo en lo que a Biodentine XP se refiere, ya que únicamente se pudo comparar con un artículo recientemente publicado donde analizaron tanto viabilidad celular (ensayo XTT) como capacidad de diferenciación celular (RT-qPCR). Ningún autor hasta el momento ha analizado su comportamiento en ensayos de migración celular, inmunofluorescencia, SEM-EDX, ICP-MS, apoptosis celular, ni acerca de su potencial para la formación de nódulos calcificados. En cambio, sí existe evidencia de dichos ensayos en publicaciones de otros autores acerca de MTA Angelus y TheraCal PT.

Por lo que, esta investigación se trata de uno de los primeros estudios que analizan las propiedades biológicas tanto de biocompatibilidad y bioactividad del nuevo Biodentine XP, en condiciones controladas de laboratorio siguiendo la normativa ISO.

5.15. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tras el análisis de las limitaciones del presente estudio, es evidente la necesidad de futuros estudios *in vivo* empleando modelos animales que permitan dar una mayor validez y enfatizar los resultados obtenidos tras el presente análisis *in vitro*. La principal línea de investigación a seguir sería la realización de un estudio donde se empleen modelos de ratas Wistar, donde poder analizar la respuesta de estos materiales al entrar en contacto con unas condiciones orales más próximas a las observadas en el ser humano.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Una vez concluida la presente investigación y analizada la bibliografía existente, los hallazgos del estudio muestran como los materiales basados en silicato de calcio, de forma general mejoran las propiedades biológicas y el potencial de mineralización de las células madre de la pulpa dental. Especialmente, el nuevo Biodentine XP evidenció resultados significativamente favorables en comparación con el resto de los materiales, aunque semejantes a los mostrados por MTA Angelus, siendo TheraCal PT el material que expresó resultados ligeramente inferiores en cuanto a biocompatibilidad y bioactividad.

No obstante, en base a nuestro estudio se pueden establecer las siguientes conclusiones específicas:

- La mayor viabilidad celular fue observada en las formas más diluidas de los materiales, y en los intervalos de tiempo más prolongados, siendo principalmente MTA Angelus y Biodentine XP quienes evidenciaron los valores más similares al control. Del mismo modo, la velocidad de migración celular fue mayor en MTA Angelus, seguida de Biodentine XP y TheraCal PT.
- El análisis acerca de la morfología celular reflejó un menor número de células presentes junto a TheraCal PT, en cambio tanto MTA Angelus como Biodentine producen en las células morfologías celulares semejantes al control. Todos los materiales presentaron células adheridas sobre la superficie de estudio, siendo TheraCal PT el material que menor número exhibió.
- La espectrometría sobre la composición de la superficie de los materiales, mostró elevados valores de calcio en todos los materiales, destacando el alto contenido en Biodentine XP, hechos coincidentes con los datos observados tras la liberación de iones por parte de los materiales, liberando todos principalmente calcio, silicio y azufre.
- Los porcentajes más bajos de apoptosis/necrosis celular fueron alcanzados en presencia de Biodentine XP, seguido de MTA Angelus y TheraCal PT. Del mismo modo, Biodentine XP fue el material que produjo menor estrés oxidativo al entrar en contacto con las DPSCs.

- MTA Angelus y Biodentine XP activan la expresión de los marcadores ALP y DSPP, por lo que tienen capacidad para inducir la diferenciación osteo-odontogénica y favorecer la reparación de los tejidos dañados; especialmente Biodentine XP mostró altos valores de DSPP, observándose a su vez una marcada deposición de nódulos calcificados en presencia de Biodentine XP en comparación con el resto de grupos.
- El alto contenido en calcio presente en los materiales de estudios, muestra relación con las óptimas propiedades evidenciadas acerca de la biocompatibilidad y de la bioactividad celular, especialmente por parte de Biodentine XP, hecho que resalta su alto potencial como material de terapia vital pulpar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scheid RC, Weiss G, Woelfel JB. Woelfel's dental anatomy. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
2. García Barbero J. Patología y terapéutica dental. 1ª , 2ª reimpr. ed. Madrid: Síntesis; 2014.
3. Zohrabian VM, Poon CS, Abrahams JJ. Embryology and Anatomy of the Jaw and Dentition. Semin Ultrasound CT MR. 2015;36(5):397-406.
4. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. Int J Mol Sci. 2021;22(3).
5. García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. J Am Dent Assoc. 2008;139 Suppl:25s-34s.
6. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(1):13-29.
7. Barrancos Mooney J. Operatoria dental : integración clínica. 4ª ed. Buenos Aires [etc: Editorial Médica Panamericana; 2006.
8. Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. Dent Clin North Am. 2013;57(1):59-73.
9. Cohen S, Hargreaves KM, Berman LH, Rotstein I. Cohen : vías de la pulpa. 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2022.
10. Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellermann O, Goldberg M. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. J Endod. 2014;40(4 Suppl):S13-8.
11. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. J Dent. 2010;38(9):687-97.
12. Álvarez-Vásquez JL, Castañeda-Alvarado CP. Dental Pulp Fibroblast: A Star Cell. J Endod. 2022;48(8):1005-19.
13. Jeanneau C, Lundy FT, El Karim IA, About I. Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. J Endod. 2017;43(9S):S17-S24.

14. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod*. 2007;33(7):773-81.
15. Zaky SH, Shehabeldin M, Ray H, Sfeir C. The role of inflammation modulation in dental pulp regeneration. *Eur Cell Mater*. 2021;41:184-93.
16. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007;52(1 Suppl):S4-16.
17. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S6-12.
18. Quispe-Salcedo A, Ohshima H. The Role of Dendritic Cells during Physiological and Pathological Dentinogenesis. *J Clin Med*. 2021;10(15).
19. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;348:1-68.
20. Sheethal HS, Kn H, Smitha T, Chauhan K. Role of mast cells in inflammatory and reactive pathologies of pulp, periapical area and periodontium. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(1):92-7.
21. Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. Endodoncia : técnicas clínicas y bases científicas. 3ª ed. Barcelona: Elsevier/Masson; 2014.
22. Rechenberg DK, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167289.
23. Sui B, Chen C, Kou X, Li B, Xuan K, Shi S, et al. Pulp Stem Cell-Mediated Functional Pulp Regeneration. *J Dent Res*. 2019;98(1):27-35.
24. Bae YC, Yoshida A. Morphological foundations of pain processing in dental pulp. *J Oral Sci*. 2020;62(2):126-30.
25. Van Hassel HJ. Reprint of: Physiology of the Human Dental Pulp. *J Endod*. 2021;47(5):690-5.
26. Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019;55(1):5-11.
27. Lin LM, Ricucci D, Saoud TM, Sigurdsson A, Kahler B. Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Aust Endod J*. 2020;46(1):154-66.
28. Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):328-36.

29. Duncan HF, Kobayashi Y, Kearney M, Shimizu E. Epigenetic therapeutics in dental pulp treatment: Hopes, challenges and concerns for the development of next-generation biomaterials. *Bioact Mater.* 2023;27:574-93.
30. Kearney M, Cooper PR, Smith AJ, Duncan HF. Epigenetic Approaches to the Treatment of Dental Pulp Inflammation and Repair: Opportunities and Obstacles. *Front Genet.* 2018;9:311.
31. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171-83.
32. Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, et al. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009;312b(5):425-36.
33. Badavannavar AN, Ajari S, Nayak KUS, Khijmatgar S. Abfraction: Etiopathogenesis, clinical aspect, and diagnostic-treatment modalities: A review. *Indian J Dent Res.* 2020;31(2):305-11.
34. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C35-8.
35. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018;51(8):829-46.
36. Neves VCM, Sharpe PT. Regulation of Reactionary Dentine Formation. *J Dent Res.* 2018;97(4):416-22.
37. Kalyva M, Papadimitriou S, Tziafas D. Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. *Int Endod J.* 2010;43(5):382-92.
38. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1-10.
39. Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Kuramoto H, Takegawa D, Nakanishi T, et al. The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. *Jpn Dent Sci Rev.* 2018;54(3):105-17.
40. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:794143.

41. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S46-51.
42. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.
43. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*. 2007;33(6):643-51.
44. Duncan HF. Present status and future directions-Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J*. 2022;55 Suppl 3(Suppl 3):497-511.
45. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
46. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
47. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
48. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.
49. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1111-26.
50. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev (Pavia)*. 2022;14(3):37498.
51. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36.
52. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Assadzadeh-Aghdai H, Sharifian A, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2017;10(3):208-13.
53. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2173-85.

54. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *Apmis*. 2005;113(11-12):831-44.
55. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.
56. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
57. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339-47.
58. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007;25(1):100-6.
59. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
60. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2).
61. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res*. 2012;56(4):229-48.
62. Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, et al. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11).
63. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
64. Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med*. 2017;49(8):644-51.
65. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.

66. Ebrahimi M, Botelho M. Adult Stem Cells of Orofacial Origin: Current Knowledge and Limitation and Future Trend in Regenerative Medicine. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(6):719-33.
67. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-
-part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012;56(3):151-65.
68. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
69. Mattei V, Martellucci S, Pulcini F, Santilli F, Sorice M, Delle Monache S. Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect? *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(5):1635-46.
70. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 2007;14(6):1162-71.
71. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod*. 2010;36(3):469-74.
72. Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(5):511-23.
73. Sui B, Wu D, Xiang L, Fu Y, Kou X, Shi S. Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application. *J Endod*. 2020;46(9s):S46-s55.
74. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008;26(7):1787-95.
75. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671-9.
76. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).

77. Apel C, Forlenza OV, de Paula VJ, Talib LL, Denecke B, Eduardo CP, et al. The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009;116(1):71-8.
78. Wang F, Jia Y, Liu J, Zhai J, Cao N, Yue W, et al. Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. *Cell Biol Int*. 2017;41(6):639-50.
79. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91-8.
80. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4709572.
81. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1439-58.
82. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*. 2010;36(9):1504-15.
83. Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1081-93.
84. Ward J. Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Aust Endod J*. 2002;28(1):29-37.
85. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*. 2002;36(4):223-32.
86. Duncan HF, Cooper PR, Smith AJ. Dissecting dentine-pulp injury and wound healing responses: consequences for regenerative endodontics. *Int Endod J*. 2019;52(3):261-6.
87. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*. 2010;2010:856087.
88. Bjorndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF. Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J*. 2019;52(7):949-73.
89. Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, Kundzina R, et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J*. 2019;52(7):923-34.

90. Arora S, Cooper PR, Friedlander LT, Rizwan S, Seo B, Rich AM, et al. Potential application of immunotherapy for modulation of pulp inflammation: opportunities for vital pulp treatment. *Int Endod J*. 2021;54(8):1263-74.
91. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007;33(4):377-90.
92. Yong D, Cathro P. Conservative pulp therapy in the management of reversible and irreversible pulpitis. *Aust Dent J*. 2021;66 Suppl 1:S4-S14.
93. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod*. 2017;43(7):1033-51.
94. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod*. 2014;40(12):1932-9.
95. Wolters WJ, Duncan HF, Tomson PL, Karim IE, McKenna G, Dorri M, et al. Minimally invasive endodontics: a new diagnostic system for assessing pulpitis and subsequent treatment needs. *Int Endod J*. 2017;50(9):825-9.
96. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Li Y, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *J Dent*. 2019;86:41-52.
97. Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(3).
98. Kunert M, Lukomska-Szymanska M. Bio-Inductive Materials in Direct and Indirect Pulp Capping-A Review Article. *Materials (Basel)*. 2020;13(5).
99. Ballal NV, Duncan HF, Wiedemeier DB, Rai N, Jalan P, Bhat V, et al. MMP-9 Levels and NaOCl Lavage in Randomized Trial on Direct Pulp Capping. *J Dent Res*. 2022;101(4):414-9.
100. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod*. 2015;41(9):1412-7.
101. AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy. *J Endod*. 2021;47(9):1340-4.
102. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2008;41(2):128-50.

103. Kahler B, Taha NA, Lu J, Saoud TM. Vital pulp therapy for permanent teeth with diagnosis of irreversible pulpitis: biological basis and outcome. *Aust Dent J.* 2023;68 Suppl 1:S110-s22.
104. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018;51(2):177-205.
105. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-13.
106. Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. *J Pak Med Assoc.* 2020;70(3):497-504.
107. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(10):942-9.
108. Hanna SN, Perez Alfayate R, Prichard J. Vital Pulp Therapy an Insight Over the Available Literature and Future Expectations. *Eur Endod J.* 2020;5(1):46-53.
109. Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent.* 2017;8(2).
110. Arandi NZ, Thabet M. Minimal Intervention in Dentistry: A Literature Review on Biodentine as a Bioactive Pulp Capping Material. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5569313.
111. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):743-7.
112. Awawdeh L, Al-Qudah A, Hamouri H, Chakra RJ. Outcomes of Vital Pulp Therapy Using Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2018;44(11):1603-9.
113. Careddu R, Duncan HF. How does the pulpal response to Biodentine and ProRoot mineral trioxide aggregate compare in the laboratory and clinic? *Br Dent J.* 2018.
114. Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, et al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):209.

115. Jeanneau C, Laurent P, Rombouts C, Giraud T, About I. Light-cured Tricalcium Silicate Toxicity to the Dental Pulp. *J Endod*. 2017;43(12):2074-80.
116. Kunert M, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Sauro S, Bourgi R, Hardan L, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. *Cells*. 2022;11(20).
117. Rodríguez-Lozano FJ, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Lozano A, Pecci-Lloret MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. *Clin Oral Investig*. 2021;25(8):5009-24.
118. Sanz JL, Soler-Doria A, Lopez-Garcia S, Garcia-Bernal D, Rodriguez-Lozano FJ, Lozano A, et al. Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2021;47(12):1896-906.
119. Pedano MS, Li X, Yoshihara K, Landuyt KV, Van Meerbeek B. Cytotoxicity and Bioactivity of Dental Pulp-Capping Agents towards Human Tooth-Pulp Cells: A Systematic Review of In-Vitro Studies and Meta-Analysis of Randomized and Controlled Clinical Trials. *Materials (Basel)*. 2020;13(12).
120. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
121. Ghilotti J, Sanz JL, Lopez-Garcia S, Guerrero-Girones J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials (Basel)*. 2020;13(9).
122. Hosseinpour S, Gaudin A, Peters OA. A critical analysis of research methods and experimental models to study biocompatibility of endodontic materials. *Int Endod J*. 2022;55 Suppl 2(Suppl 2):346-69.
123. Iaculli F, Rodríguez-Lozano FJ, Briseño-Marroquín B, Wolf TG, Spagnuolo G, Rengo S. Vital Pulp Therapy of Permanent Teeth with Reversible or Irreversible Pulpitis: An Overview of the Literature. *J Clin Med*. 2022;11(14).
124. Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2019;12(7).
125. Edwards D, Stone S, Bailey O, Tomson P. Preserving pulp vitality: part two - vital pulp therapies. *Br Dent J*. 2021;230(3):148-55.

126. Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iran Endod J.* 2014;9(1):15-22.
127. Asgary S, Eghbal MJ, Fazlyab M, Baghban AA, Ghoddusi J. Five-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: a non-inferiority multicenter randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2015;19(2):335-41.
128. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod.* 2011;37(5):581-7.
129. Matsuo T, Nakanishi T, Shimizu H, Ebisu S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *J Endod.* 1996;22(10):551-6.
130. Meschi N, Patel B, Ruparel NB. Material Pulp Cells and Tissue Interactions. *J Endod.* 2020;46(9s):S150-s60.
131. da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TMD, Mesquita LC, Galarça AD, Silva AFD, et al. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106(3):1358-68.
132. Lozano-Guillen A, Lopez-Garcia S, Rodriguez-Lozano FJ, Sanz JL, Lozano A, Llena C, et al. Comparative cytocompatibility of the new calcium silicate-based cement NeoPutty versus NeoMTA Plus and MTA on human dental pulp cells: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2022;26(12):7219-28.
133. Cuadros-Fernández C, Lorente Rodríguez AI, Sáez-Martínez S, García-Binimelis J, About I, Mercadé M. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations.* 2016;20(7):1639-45.
134. Abuelniel GM, Duggal MS, Kabel N. A comparison of MTA and Biodentine as medicaments for pulpotomy in traumatized anterior immature permanent teeth: A randomized clinical trial. *Dental Traumatology.* 2020;36(4):400-10.
135. Vilella-Pastor S, Sáez S, Veloso A, Guinot-Jimeno F, Mercadé M. Long-term evaluation of primary teeth molar pulpotomies with Biodentine and MTA: a CONSORT randomized clinical trial. *European Archives of Paediatric Dentistry.* 2021;22(4):685-92.
136. Eshghi A, Hajiahmadi M, Nikbakht MH, Esmaeili M. Comparison of Clinical and Radiographic Success between MTA and Biodentine in Pulpotomy of Primary Mandibular Second Molars with Irreversible Pulpitis: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *International Journal of Dentistry.* 2022;2022.

137. Sanz JL, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J, Melo M, Rengo S, et al. Cytocompatibility and Bioactive Properties of Hydraulic Calcium Silicate-Based Cements (HCSCs) on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHEDs): A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Clin Med*. 2020;9(12).
138. Cassiano Ferraz D, Garuba Rahhal J, Paz Dotto ME, Alberti Ferreira L, Sipert CR, Letra A, et al. Physicochemical and Biological Properties of Biodentine XP, Endosequence RRM, and Bio-C Repair Cements. *J Endod*. 2025.
139. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019;9(1):3933.
140. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012;28(1):23-40.
141. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials (Basel)*. 2: © 2009 by the authors;; 2009. p. 514-48.
142. Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
143. Pedano MS, Li X, Camargo B, Hauben E, De Vleeschauwer S, Yoshihara K, et al. Injectable phosphopullulan-functionalized calcium-silicate cement for pulp-tissue engineering: An in-vivo and ex-vivo study. *Dent Mater*. 2020;36(4):512-26.
144. Cannella V, Altomare R, Chiaramonte G, Di Bella S, Mira F, Russotto L, et al. Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3469525.
145. Wairooy VW, Bagio DA, Margono A, Amelia I. In vitro Analysis of DSPP and BSP Expression: Comparing the Odontogenic Influence of Bio-C Repair and Biodentine in hDPSCs. *Eur J Dent*. 2025;19(1):220-6.
146. Tsutsui TW. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells Cloning*. 2020;13:33-42.
147. Kwack KH, Lee HW. Clinical Potential of Dental Pulp Stem Cells in Pulp Regeneration: Current Endodontic Progress and Future Perspectives. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:857066.

148. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-6.
149. Zhou L, Zhao S, Xing X. Effects of different signaling pathways on odontogenic differentiation of dental pulp stem cells: a review. *Front Physiol.* 2023;14:1272764.
150. Pan Y, Liu Y, Cui D, Yu S, Zhou Y, Zhou X, et al. METTL3 enhances dentinogenesis differentiation of dental pulp stem cells via increasing GDF6 and STC1 mRNA stability. *BMC Oral Health.* 2023;23(1):209.
151. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(2):314-9.
152. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23).
153. Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J.* 2017;50(1):67-76.
154. Osorio R, Rodriguez-Lozano FJ, Toledano M, Toledano-Osorio M, Garcia-Bernal D, Murcia L, et al. Mitigating lipopolysaccharide-induced impairment in human dental pulp stem cells with tideglusib-doped nanoparticles: Enhancing osteogenic differentiation and mineralization. *Dent Mater.* 2024;40(10):1591-601.
155. Khedmat S, Sarraf P, Seyedjafari E, Sanaei-Rad P, Noori F. Comparative evaluation of the effect of cold ceramic and MTA-Angelus on cell viability, attachment and differentiation of dental pulp stem cells and periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):628.
156. Küden C, Karakaş SN, Batmaz SG. Comparative chemical properties, bioactivity, and cytotoxicity of resin-modified calcium silicate-based pulp capping materials on human dental pulp stem cells. *Clin Oral Investig.* 2022;26(11):6839-53.
157. Panda P, Govind S, Sahoo SK, Pattanaik S, Mallikarjuna RM, Nalawade T, et al. Analysis of Pulp Tissue Viability and Cytotoxicity of Pulp Capping Agents. *J Clin Med.* 2023;12(2).

158. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels R, Anthonappa RP. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a 3 year literature review and update. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2018;19(1):1-22.
159. Omid S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(6):768-75.
160. Novotná B, Holík P, Morozova Y, Rosa M, Galandáková A, Langová K. Evaluation of Cytotoxicity of the Dental Materials TheraCal LC, TheraCal PT, ApaCal ART and Biodentine Used in Vital Pulp Therapy: In Vitro Study. *Dent J (Basel)*. 2024;12(8).
161. Rombouts C, Jeanneau C, Bakopoulou A, About I. Dental Pulp Stem Cell Recruitment Signals within Injured Dental Pulp Tissue. *Dent J (Basel)*. 2016;4(2).
162. Leprince JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J*. 2012;45(8):689-701.
163. Küçükkaya Eren S, Bahador Zirh E, Zirh S, Sharafi P, Zeybek ND. Combined effects of bone morphogenetic protein-7 and mineral trioxide aggregate on the proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp stem cells. *J Appl Oral Sci*. 2022;30:e20220086.
164. López-García S, Myong-Hyun B, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, et al. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clin Oral Investig*. 2020;24(5):1749-59.
165. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2018;44(1):126-32.
166. Rohr N, Bergemann C, Nebe JB, Fischer J. Crystal structure of zirconia affects osteoblast behavior. *Dent Mater*. 2020;36(7):905-13.
167. Lv F, Zhu L, Zhang J, Yu J, Cheng X, Peng B. Evaluation of the in vitro biocompatibility of a new fast-setting ready-to-use root filling and repair material. *Int Endod J*. 2017;50(6):540-8.
168. Belin BJ, Goins LM, Mullins RD. Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture. *Bioarchitecture*. 2014;4(6):189-202.

169. Chazotte B. Labeling nuclear DNA using DAPI. Cold Spring Harb Protoc. 2011;2011(1):pdb.prot5556.
170. Bossù M, Mancini P, Bruni E, Uccelletti D, Preziosi A, Rulli M, et al. Biocompatibility and Antibiofilm Properties of Calcium Silicate-Based Cements: An In Vitro Evaluation and Report of Two Clinical Cases. *Biology (Basel)*. 2021;10(6).
171. Mahmoud O, Al-Afifi NA, Salihu Farook M, Ibrahim MA, Al Shehadat S, Alsaegh MA. Morphological and Chemical Analysis of Different Types of Calcium Silicate-Based Cements. *Int J Dent*. 2022;2022:6480047.
172. Ahmed HM, Luddin N, Kannan TP, Mokhtar KI, Ahmad A. Cell attachment properties of Portland cement-based endodontic materials: biological and methodological considerations. *J Endod*. 2014;40(10):1517-23.
173. Anthrayose P, Aggarwal A, Yadav S, Nawal RR, Talwar S. Microscopic and elemental characterization of hydrated dental pulp capping agents. *J Conserv Dent*. 2021;24(5):496-501.
174. Sismanoglu S, Ercal P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Aust Endod J*. 2023;49(1):66-74.
175. Kunert M, Piwonski I, Hardan L, Bourgi R, Sauro S, Inchingolo F, et al. Dentine Remineralisation Induced by "Bioactive" Materials through Mineral Deposition: An In Vitro Study. *Nanomaterials (Basel)*. 2024;14(3).
176. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2017;50 Suppl 2:e63-e72.
177. Elbanna A, Atta D, Sherief DI. In vitro bioactivity of newly introduced dual-cured resin-modified calcium silicate cement. *Dent Res J (Isfahan)*. 2022;19:1.
178. Clases D, Gonzalez de Vega R. Facets of ICP-MS and their potential in the medical sciences-Part 1: fundamentals, stand-alone and hyphenated techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(25):7337-61.
179. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod*. 2014;40(10):1632-7.

180. Zhou Y, Wu C, Xiao Y. The stimulation of proliferation and differentiation of periodontal ligament cells by the ionic products from Ca₇Si₂P₂O₁₆ bioceramics. *Acta Biomater.* 2012;8(6):2307-16.
181. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2011;37(9):1240-6.
182. Simsek N, Bulut ET, Ahmetoğlu F, Alan H. Determination of trace elements in rat organs implanted with endodontic repair materials by ICP-MS. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(3):46.
183. Janini ACP, Pelepenko LE, Moraes BF, Dos Santos VAB, Barros-Costa M, Dos Santos IAM, et al. Chemical and in vivo analyses of calcium silicate-based materials in bone and connective tissues. *Int Endod J.* 2025;58(3):484-503.
184. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ, Joo NE, Chang HS, et al. Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod.* 2014;39(2):89-94.
185. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J.* 2012;45(8):737-43.
186. Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol.* 2011;740:57-63.
187. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.
188. Wawrzynkiewicz A, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Lukomska-Szymanska M, Lapinska B, Sokolowski J, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Dental Universal Adhesives-An In Vitro Study. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
189. Wawrzynkiewicz A, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Lukomska-Szymanska M, Lapinska B, Sokolowski J, et al. The Toxicity of Universal Dental Adhesives: An In Vitro Study. *Polymers (Basel).* 2021;13(16).
190. D'Alpino PHP, Moura G, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD, et al. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dent Mater.* 2017;33(12):1402-15.

191. Wu TT, Li LF, Du R, Jiang L, Zhu YQ. Hydrogen peroxide induces apoptosis in human dental pulp cells via caspase-9 dependent pathway. *J Endod*. 2013;39(9):1151-5.
192. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J*. 2017;50(8):780-9.
193. Birant S, Gokalp M, Duran Y, Koruyucu M, Akkoc T, Seymen F. Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Dent Sci*. 2021;16(3):971-9.
194. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-90.
195. Lins-Candeiro CL, Paranhos LR, de Oliveira Neto NF, Ribeiro RAO, de-Souza-Costa CA, Guedes FR, et al. Viability and oxidative stress of dental pulp cells after indirect application of chemomechanical agents: An in vitro study. *Int Endod J*. 2024;57(3):315-27.
196. Pires CW, Botton G, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, da Cruz IB, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J*. 2016;49(8):737-45.
197. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod*. 2014;40(2):255-60.
198. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod*. 2014;40(8):1194-200.
199. Victoria-Escandell A, Ibañez-Cabellos JS, de Cutanda SB, Berenguer-Pascual E, Beltrán-García J, García-López E, et al. Cellular Responses in Human Dental Pulp Stem Cells Treated with Three Endodontic Materials. *Stem Cells Int*. 2017;2017:8920356.
200. Mo Y, Wan R, Zhang Q. Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods Mol Biol*. 2012;926:99-112.
201. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol*. 2011;500:99-109.

202. Haniastuti T, Susilowati H, Rinastiti M. Viability and Alkaline Phosphatase Activity of Human Dental Pulp Cells after Exposure to Yellowfin Tuna Bone-Derived Hydroxyapatite In Vitro. *Int J Dent*. 2020;2020:8857534.
203. Koutrouli A, Machla F, Arapostathis K, Kokoti M, Bakopoulou A. "Biological responses of two calcium-silicate-based cements on a tissue-engineered 3D organotypic deciduous pulp analogue". *Dent Mater*. 2024;40(5):e14-e25.
204. Widbiller M, Lindner SR, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Schmalz G, et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig*. 2016;20(2):237-46.
205. Siew Ching H, Thirumulu Ponnuraj K, Luddin N, Ab Rahman I, Nik Abdul Ghani NR. Early Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Treated with Nanohydroxyapatite-Silica-Glass Ionomer Cement. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9).
206. Wang X, Cai Y, Zhang M, Xu J, Zhang C, Li J. Effect of Biodentine on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Bioengineering (Basel)*. 2022;10(1).
207. Cruz Hondares T, Hao X, Zhao Y, Lin Y, Napierala D, Jackson JG, et al. Antibacterial, biocompatible, and mineralization-inducing properties of calcium silicate-based cements. *Int J Paediatr Dent*. 2024;34(6):843-52.
208. Scardini IL, Spigariol KDS, Santos MD, Sipert CR, Santos LM. Cytotoxicity and bioactivity of CIMMO DTA restorative cement in human activated-dental pulp cells in vitro. *Braz Dent J*. 2025;36:e246402.
209. Rathinam E, Govindarajan S, Rajasekharan S, Declercq H, Elewaut D, De Coster P, et al. The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome. *Sci Rep*. 2021;11(1):645.
210. Ezawa N, Akashi Y, Nakajima K, Kokubun K, Furusawa M, Matsuzaka K. The Effects of Tricalcium-Silicate-Nanoparticle-Containing Cement: In Vitro and In Vivo Studies. *Materials (Basel)*. 2023;16(12).
211. Kulan P, Karabiyik O, Kose GT, Kargul B. The effect of accelerated mineral trioxide aggregate on odontoblastic differentiation in dental pulp stem cell niches. *Int Endod J*. 2018;51(7):758-66.

212. Antunes Bortoluzzi E, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod*. 2006;32(12):1194-7.
213. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(3):789-95.
214. López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Sanz JL, Forner L, Pecci-Lloret MP, Lozano A, et al. Biological properties of Ceraputty as a retrograde filling material: an in vitro study on hPDLSCs. *Clin Oral Investig*. 2023;27(8):4233-43.
215. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei DD, et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater*. 2015;31(12):1510-22.
216. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Álvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *International Endodontic Journal*. 2017;50(Special Issue 2):e19-e30.
217. Kale Y, Yadav S, Dadpe M, Dahake P, Kendre S. Bioinductive and anti-inflammatory properties of Propolis and Biodentine on SHED. *Saudi Dent J*. 2022;34(7):544-52.
218. Campi LB, Rodrigues EM, Torres FFE, Reis J, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties, cytotoxicity and bioactivity of a ready-to-use bioceramic repair material. *Braz Dent J*. 2023;34(1):29-38.
219. Benetti F, Queiroz Í OA, Cosme-Silva L, Conti LC, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. *Braz Dent J*. 2019;30(4):325-32.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO I

INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

 UNIVERSIDAD DE MURCIA	VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
	INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que D. Alejandro Mora Martínez ha presentado la memoria de trabajo de la Tesis Doctoral titulada "Biocompatibilidad y bioactividad de materiales para terapia vital pulpar", dirigida por D. Francisco Javier Rodríguez Lozano al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día diecinueve de julio de dos mil veinticuatro¹, por unanimidad, se emite **INFORME FAVORABLE**, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.

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

Le comunicamos que, cuando se incorpore nuevo personal a la investigación, el Investigador Principal es el responsable de que reciba la formación adecuada y de que conozca las condiciones de funcionamiento correspondiente de las instalaciones. Deberá comunicar al Comité cualquier modificación al respecto.

Vº Bº
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: CBE 630/2024

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

Comisión de Ética de Investigación
Vicerrectorado de Investigación
Edificio ESUM, 3ª planta
Campus de Espinardo
30071 - Murcia
ESPAÑA

comision.etica.investigacion@um.es
Tlf.: 868 88 3614/9898/9899
www.um.es/web/vic-investigacion/


HR EXCELLENCE IN RESEARCH




@investigación
electrónica



Código seguro de verificación: RUXFMrC4-GAK/54hN-05rKnEyq-7oBylyDT	COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1
--	-----------------------------------

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

ANEXO II

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

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO 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 la Tesis Doctoral titulada *"Biocompatibilidad y bioactividad
de materiales para terapia vital pulpar"*, presentada por D. Alejandro Mora
Martínez, está enmarcado en el proyecto titulado *"Comparación de células
madre de ligamento y pulpa dental de pacientes con síndromes genéticos y
pacientes sanos"*, siendo el investigador D. Francisco Javier Rodríguez Lozano
el responsable del mismo, con número de registro CEI 2199/2019, y que fue
informado, en la Comisión del seis de diciembre de dos mil diecinueve,
favorablemente.

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

Vº Bº

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

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 4930/2024

Comisión de Ética de Investigación
Vicerrectorado de Investigación
Edificio ESIUM, 3ª planta
Campus de Espinardo
30071 — Murcia
ESPAÑA

comision.etica.investigacion@um.es
Tlf.: 868 88 3614/9898/9899
www.um.es/web/vic-investigacion/



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



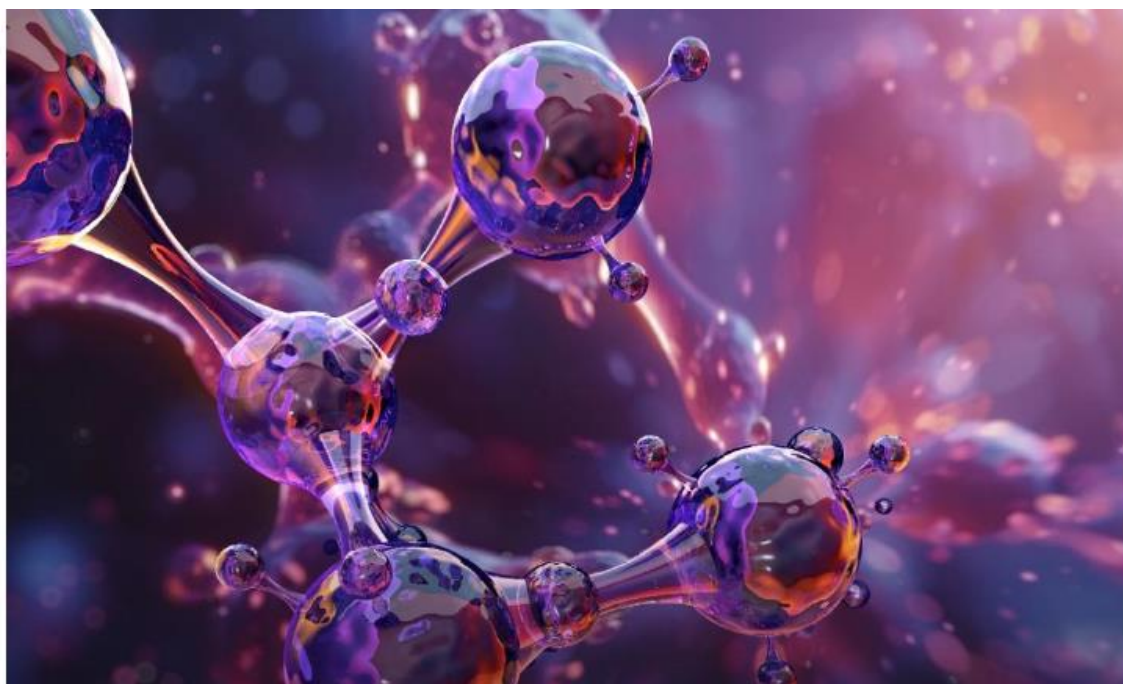
Código seguro de verificación: RUxFMvng-tH0GkMtu-VyRwzL+s-BPq694d7

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

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

ANEXO III

PARTICIPACIÓN "IX JORNADAS IMIB –Edición 1" Y PRESENTACIÓN DE PÓSTER



IX JORNADAS IMIB

21 de noviembre
Auditorio y Centro de
Congresos Víctor Villegas

Inscripción IX
Jornadas IMIB >>





Región de Murcia



IMIB Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Pascual Parrilla



Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia



UNIVERSIDAD DE MURCIA



Servicio Murciano de Salud



Pfizer

observaron diferencias en el marcaje de las fibras de colágeno entre los grupos experimentales. Además, encontramos que la superficie media de los adipocitos aumenta progresivamente conforme aumenta la gravedad de la MASLD, siendo de media un 25% mayor en pacientes con MASH frente a pacientes con hígado sano.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la MASH está relacionada con la inflamación, la fibrosis y la hipertrofia del WAT visceral en pacientes con obesidad severa.

1433. BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE MATERIALES PARA TERAPIA PULPAR VITAL

Autores:

Mora Martínez, Alejandro; López García, Sergio¹; Murcia Flores, Laura²; Rodríguez Lozano, Francisco Javier³

Afiliaciones:

¹Investigador licenciado, Universidad de Murcia, Región de Murcia, España; ²UCAM, Región de Murcia, España; ³TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO / TERAPIA CELULAR

Antecedentes

Actualmente, la caries dental es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes a nivel mundial, así como la principal causa de pulpitis; tras la exposición de la dentina, los túbulos dentinarios actúan como canales de difusión favoreciendo el acceso de las bacterias desde la superficie del diente hasta la pulpa. Sin embargo, la pulpa presenta varios mecanismos de respuesta básicos donde las células madre de la pulpa dental (DPSCs), tienen un rol transcendental debido a su capacidad de proliferación y de diferenciación a odontoblastos, apareciendo así el concepto de terapia pulpar vital (VPT), que tiene como objetivos: mantener la vitalidad de la pulpa y su estimulación para conseguir la regeneración del complejo dentino-pulpar. El siguiente paradigma al que se enfrenta la VPT, es la biocompatibilidad y bioactividad que poseen los materiales, ya que gran parte del éxito del tratamiento depende de dichas características, por ello el objetivo principal del estudio es analizar el potencial de biocompatibilidad y bioactividad de tres materiales para terapia pulpar vital.

Métodos

La viabilidad celular en presencia de los materiales de estudio se evaluó tras 24, 48 y 72 horas empleando el ensayo MTT, cuantificando la actividad metabólica celular. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa GraphPad Prism. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se observó la morfología y adhesión de las células sobre los materiales. Se analizó la bioactividad de los materiales de estudio, por un lado, mediante la

expresión de marcadores odontogénicos de las DPSCs, utilizando la técnica RT-qPCR, y por otro lado se efectuó la técnica de Alizarin-RedS, para determinar la presencia de depósitos de calcio.

Resultados

TheraCal-PT (THPT) sin diluir disminuyó la actividad metabólica celular con respecto al control en los tres periodos de tiempo evaluados, en cambio MTA Angelus (MTA) y Biodentine XP (BXP), solo mostraron una ligera diferencia a las 72 horas con respecto al control. Al diluir los materiales THPT provoca una disminución de la actividad metabólica, en los tres tiempos analizados a 1:2 y solamente a las 72 horas al diluirlo 1:4. El análisis del SEM reflejó la presencia de filopodios celulares que promovieron la adhesión a la superficie de los materiales, especialmente para MTA y BXP, que evidenciaron la presencia de células filiformes ampliamente extendidas sobre las superficies analizadas. Sin embargo, THPT presentó una menor cantidad de células junto con una menor adhesión a la superficie. El análisis de RT-qPCR reveló una regulación al alza significativa de los niveles de expresión de ALP y DSPP en los grupos tratados con BXP y MTA, en comparación con los otros grupos en el día 3. Además, el grupo MTA mostró una regulación al alza significativa de ALP, DSPP y COL-1 en comparación con el grupo control en el día 7. El ensayo de alizarin refleja que todos los materiales probados indujeron diversos grados de depósito de calcio. Al día 21, el grupo tratado con BXP exhibió niveles significativamente más altos de depósito de calcio, en comparación con los otros materiales y el grupo control.

Conclusiones

Los hallazgos del estudio demuestran una alta citocompatibilidad, así como la mejora en la expresión de marcadores osteo/odontogénicos, por parte del Biodentine XP, cuyas propiedades son muy similares y comparables a otros materiales como MTA Angelus. Las características de ambos materiales los convierten en altamente eficaces para su uso en VPT.

1434. ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DE EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL EN MODELOS CELULARES IN VITRO.

Autores:

Martínez Pérez-Munar, Paula¹; A. Moreno, Diego²; Núñez Sánchez, María Ángeles¹; Ruiz Alcaraz, Antonio José³

Afiliaciones:

¹Obesidad, Diabetes y Metabolismo; ²Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Región de Murcia, 30100, España; ³Inmunidad innata en la salud y la enfermedad

DIPLOMA

D./D^a. **Alejandro Mora Martínez**, con NIF, nº **48743304W** ha asistido al curso:

"IX Jornadas IMIB - Edición 1"

organizado por el Servicio Murciano de Salud y la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, e incluido en el Plan Integrado del IMIB 2024, celebrado en Murcia el 21 de noviembre de 2024, con una duración de **9 horas**.

La acción formativa ha quedado inscrita, con la clave nº **IMIB-CC-24-0017-01**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación, en Murcia, a 23 de diciembre de 2024.

El/la responsable de la actividad
y directora de la Fundación para la
Formación e Investigación Sanitarias
de la Región de Murcia



M^a Fuensanta Martínez Lozano

ANEXO IV

CERTIFICADO ASISTENCIA Y PARTICIPACIÓN “X JORNADAS DOCTORALES”



University of Murcia, Escuela Internacional de Doctorado (EIDUM) , Edificio Rector
Soler, sótano , 30100 Campus de Espinardo , Murcia , Spain

Alejandro Mora Martínez
Universidad de Murcia
C/Mayor, nº91-1B
30161 MURCIA
España

University of Murcia
Escuela Internacional de Doctorado (EIDUM)
Edificio Rector Soler, sótano
30100 Campus de Espinardo
Murcia
Spain

Murcia, 30/06/2025

Certificado de Asistencia

A Quien Corresponda

Confirmamos que **Alejandro Mora Martínez** asistió a las X Jornadas Doctorales EIDUM-EINDOC-CMN 2025, celebradas del 23 - 25 de junio de 2025 en la Universidad de Murcia (España), con una duración de 32 horas.

Alejandro Mora Martínez es autor/coautor de la(s) siguiente(s) contribución(es):

Análisis in Vitro de Las Propiedades Biológicas y el Potencial de Mineralización de Biodentine xp en Relación Con Otros Materiales de Silicato de Calcio Empleados Para Terapia Pulpal Vital

Autor(es): Mora Martínez, Alejandro; López García, Sergio; Murcia Flores, Laura; Rodríguez Lozano, Francisco Javier
Grupo de trabajo/Tipo de contribución: POSTERS

Asimetría Nasal Asociada A La Masticación Unilateral: Hallazgos Iniciales En Un Estudio Piloto

Autor(es): García Sampedro, Carmen María; Pecci Lloret, Miguel Ramón; Pecci Lloret, María Pilar; Mellinas Martínez, Irene; Mora Martínez, Alejandro; Rodríguez Lozano, Francisco Javier
Grupo de trabajo/Tipo de contribución: POSTERS

La Simulación Clínica de Alta Fidelidad Como Herramienta Docente Efectiva en el Aprendizaje a Largo Plazo de Los Alumnos de 5º de Odontología.

Autor(es): Mellinas Martínez, Irene; Mora Martínez, Alejandro; Parra Nicolás, Sandra; Manzanera Mondéjar, Ángeles; Guerrero Gironés, Julia; Adán Martínez, Gracia; Rodríguez Lozano, Francisco Javier
Grupo de trabajo/Tipo de contribución: POSTERS

Reciba un cordial saludo,

Natalia Arroyo Manzanares
(Secretaría Académica de EIDUM)

ANEXO V



Biocompatibility and osteogenic potential of novel tricalcium silicate-based materials in human dental pulp stem cells: Advancing vital pulp therapies

Alejandro Mora^a, David García-Bernal^b, Francisco Javier Rodríguez-Lozano^{a,*}, James Ghilotti^c, Adrián Lozano^c, Sergio López-García^a

^a Department of Dermatology, Stomatology, Radiology and Physical Medicine, Morales Meseguer Hospital, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia 30008, Spain

^b Department of Biochemistry, Molecular Biology B and Immunology, Faculty of Medicine, University of Murcia, Biomedical Research Institute (IMIB), Murcia 30120, Spain

^c Departament d'Estomatologia, Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València, València 46101, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Biodentine XP
Human dental pulp stem cells
Cytocompatibility
Osteogenic differentiation
Calcium silicate-based materials
Bioactivity
Mineralization

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the cytocompatibility, bioactivity, and mineralization potential of new tricalcium silicate-based Material (Biodentine XP) on human dental pulp stem cells (hDPSCs) compared to other calcium silicate-based materials (MTA-Ang and Ther-PT).

Materials and methods: Standardized discs and 1:1, 1:2, and 1:4 eluates of Biodentine XP (BD-XP), MTA-Ang, and Ther-PT were prepared after setting. Human dental pulp stem cells (hDPSCs) were isolated from extracted third molars of healthy patients and cultured under standard conditions. The following assays were performed: cell attachment and morphology were assessed by scanning electron microscopy (SEM); metabolic activity and cell viability was evaluated by MTT and cell cycle analysis; cellular calcium ion content was analyzed by energy dispersive X-ray (EDX) and calcium release analysis; cell migration/proliferation by wound healing assays; cytoskeletal organization, analysis of cell apoptosis and necrosis, reactive oxygen species production, osteogenic marker expression were quantified by flow cytometry and RT-qPCR; and cell mineralization potential was determined through Alizarin Red S staining. Comparisons were made with hDPSCs cultured in unconditioned media (negative control) and osteogenic culture media (positive control). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results: Biodentine XP (BD-XP) showed significantly positive results in cytocompatibility assays, including cell metabolic activity, viability, attachment, and morphology, compared to the negative control group, whereas MTA-Ang and Ther-PT showed moderate results. BD-XP exhibited a significant upregulation of osteogenic markers, including ALP and DSPP, compared to both the negative and positive control groups. In terms of mineralization potential, BD-XP-treated cells showed significantly higher calcified nodule formation compared to MTA-Ang, Ther-PT, the negative control, and the positive control groups.

Conclusion: BD-XP exhibits superior cytocompatibility and promotes osteo/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs). BD-XP significantly enhances the upregulation of osteo/odontogenic markers such as ALP and DSPP, and promotes calcified nodule formation more effectively than MTA-Ang and Ther-PT. The high calcium ion content of BD-XP plays a key role in its ability to promote cellular adhesion, proliferation, and mineralization, making it a highly effective material for regenerative dental applications. These findings provide strong evidence to support the use of Biodentine XP in regenerative dental therapies, particularly in vital pulp treatments, where enhanced cellular adhesion and mineralization are critical for clinical success.

1. Introduction

Dental pulp is highly susceptible to infection from caries, trauma,

retrograde periodontitis, and iatrogenic exposure, which can lead to pulp inflammation or necrosis [1]. A common intervention for infected pulp tissue in permanent teeth is root canal therapy, a procedure that involves

* Correspondence to: School of Dentistry, Hospital Morales Meseguer 2 pl., University of Murcia, Av. Marqués de los Vélez, s/n, Murcia 30008, Spain.
E-mail address: fcojavier@um.es (F.J. Rodríguez-Lozano).

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2025.03.011>

Received 21 January 2025; Received in revised form 13 March 2025; Accepted 21 March 2025

Available online 30 March 2025

0109-5641/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of The Academy of Dental Materials. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table 2

Analysis of migration of hDPSCs after treatment with different dilutions of tested materials by wound healing assays.

2-way ANOVA				
Multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. TheraCal PT ND	−23,63	Yes	***	< 0,0001
Control vs. Biodentine XP ND	−28,17	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus ND vs. TheraCal PT ND	−23,45	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus ND vs. Biodentine XP ND	−27,99	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus 1:2 vs. TheraCal PT ND	−30,46	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus 1:2 vs. Biodentine XP ND	−35	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus 1:2 vs. Biodentine XP 1:4	−12,54	Yes	*	0,0272
MTA Angelus 1:4 vs. TheraCal PT ND	−21,58	Yes	***	< 0,0001
MTA Angelus 1:4 vs. Biodentine XP ND	−26,11	Yes	***	< 0,0001
TheraCal PT ND vs. TheraCal PT 1:2	24,57	Yes	***	< 0,0001
TheraCal PT ND vs. TheraCal PT 1:4	25,87	Yes	***	< 0,0001
TheraCal PT ND vs. Biodentine XP 1:2	19,74	Yes	***	< 0,0001
TheraCal PT ND vs. Biodentine XP 1:4	17,93	Yes	***	0,0002
TheraCal PT 1:2 vs. Biodentine XP ND	−29,11	Yes	***	< 0,0001
TheraCal PT 1:4 vs. Biodentine XP ND	−30,41	Yes	***	< 0,0001
Biodentine XP ND vs. Biodentine XP 1:2	24,28	Yes	***	< 0,0001
Biodentine XP ND vs. Biodentine XP 1:4	22,46	Yes	***	< 0,0001

for Standardization (ISO) has established specific protocols to ensure consistency and reproducibility in the laboratory testing of biomaterials [15]. These protocols categorize cellular interactions into three types: extract-based, direct contact, and indirect contact. Extract-based methods expose cells to varying concentrations of a material, mimicking the diffusion of substances through tissues, particularly in scenarios involving irrigated tissues [4]. The assessment of cell viability is crucial in the selection process for new materials and provides important preliminary information before proceeding to clinical trials. Furthermore, there is a wide range of assays available to measure cell viability, each of which relies on different aspects of cellular functionality [16–18].

In light of the aforementioned considerations, the aim of this study was to evaluate the biological and bioactivity potential of three vital pulp therapy materials. The null hypothesis was that there would be no significant differences between the materials and their dilutions in terms of their biological and bioactivity properties.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and characterisations of hDPSCs

The protocol for the isolation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) was approved by the Ethics Committee of the University of Murcia (IRB number: 3686/2021). Written informed consent was obtained from all participants prior to the study. hDPSCs were obtained from the pulp tissues of impacted wisdom teeth of patients aged 16–22 years ($n = 10$). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich) and 1 % penicillin/streptomycin (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), according to standard procedures.

For characterization, 1×10^5 cells were suspended in 100 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 % FBS. To confirm their mesenchymal phenotype, cells were labelled with a panel of monoclonal antibodies conjugated to fluorescent markers (CD14, CD20, CD34, CD45, CD73, CD90, and CD105; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The expression of these markers was then assessed by flow cytometry, according to previously established methods [19].

2.2. Material extracts and preparation

The materials evaluated are listed in Table 1. Thirty cylindrical moulds, each measuring 5 mm in diameter and 2 mm in height, were constructed from rubber. These moulds were sterilized using ultraviolet light for 30 min. Sealers were mixed according to the manufacturer's instructions and allowed to cure. Each cured disc was then placed in an single well of a 24-well plate and immersed in freshly prepared growth medium at 37 °C for 24 hours. Initial extracts were prepared in a 1:1 ratio according to ISO 10993-5 standards. Different concentrations of these extracts, specifically dilution 1:1 (non-diluted), 1:2, and 1:4, were then prepared as previously described [20].

2.3. Cytocompatibility tests and cell cycle analysis

MTT assays were performed to assess the cell viability of hDPSCs in the presence of vital pulp materials [20]. For this analysis, 2.5×10^4 cells per well were cultured in 100 μ L of complete medium and incubated for 24 hours under standard cell culture conditions. Subsequently, the cells were exposed to different concentrations (25 %, 50 % and 100 %) of each material extract for 24, 48, and 72 hours. Following incubation, the cells were washed with PBS (pH 7.4), and an MTT solution was added. The cells were incubated with the MTT solution for 3 hours to allow formazan crystals to form. These crystals were then dissolved in a crystal dissolving buffer (11 g SDS in 50 mL of 0.02 M HCl and 50 mL isopropanol) by incubation at 37 °C with gentle shaking. Absorbance was measured at 570 nm using an ELISA plate reader (Epoch, Biotek, Germany). Cell cycle analysis by measuring the DNA content by flow cytometry was employed to distinguish cells in different cell cycle phases. The cells were cultured in 25-cm² culture flasks at a density of 1×10^5 cells per well in presence of the different concentrations (25 %, 50 % and 100 %) of each material extract for 72 h. After centrifuged at $400 \times g$ for 4 min, cells were collected and fixed with 70 % ethanol overnight at 4 °C and incubated with 40 μ g/mL of

Table 3

Calcium ion release.

Element	ANOVA: P value (Summary)		
	MTA Angelus VS Biodentine XP	MTA Angelus VS TheraCal PT	Biodentine XP VS TheraCal PT
Ca ²⁺ ppm	26,49 $\pm$ 2,51	109,94 $\pm$ 5,63	40,61 $\pm$ 2,08
	< 0,0001 (***)	0519 (ns)	< 0,0001 (***)

Ppm=parts per million

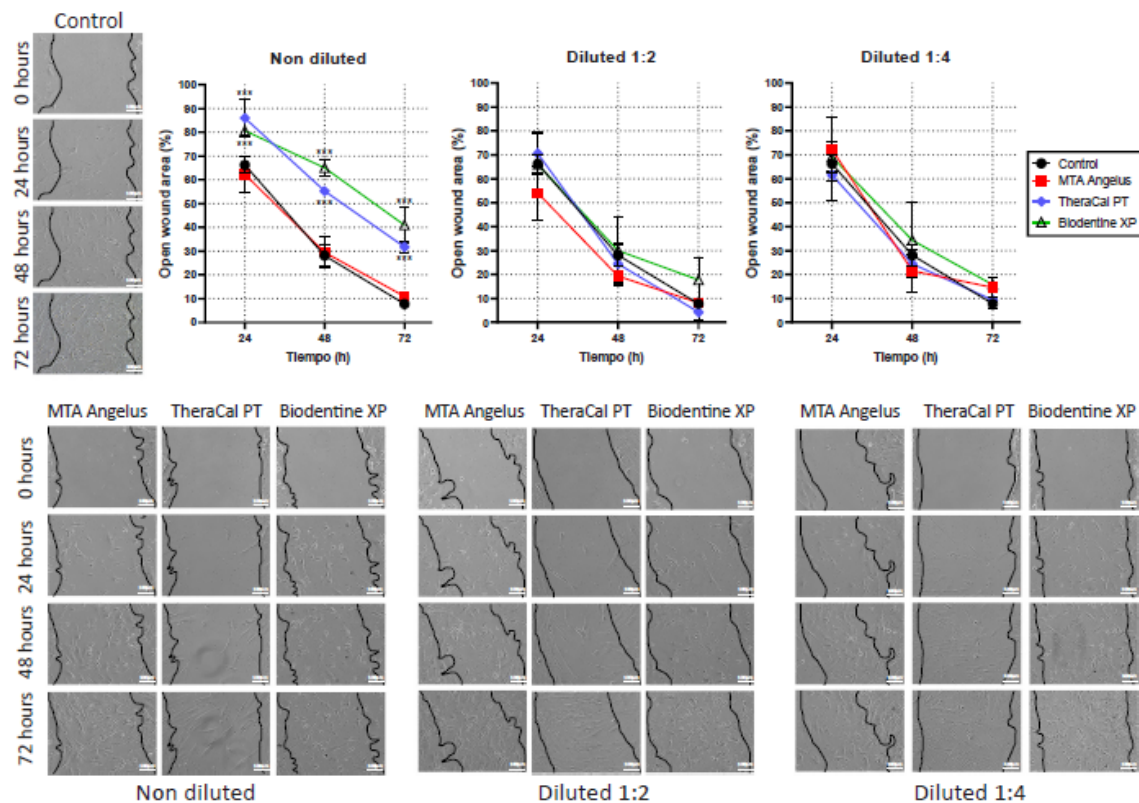


Fig. 2. Results of wound healing assays for the 1:1, 1:2 and 1:4 eluates of the tested materials (BD-XP, MTA-Ang, and Ther-PT) cultured with hDPSCs (time points: after 24, 48, and 72 hours). Graphical results are presented as percentage of open wound areas compared to the negative control group. BD-XP-treated cells exhibited enhanced migration, supporting the hypothesis that this material promotes tissue healing and regeneration. Wound closure percentages are compared to the control. * ** $p < 0.001$ (one-way ANOVA analysis). Scale bar for the images: 100 μm .

propidium iodide and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase for DNA content analysis. Finally, stained cells were immediately analyzed with a FACSCanto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) applying an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 617 nm. The percentage of cells in G0/G1, S, and G2/M phases was analyzed using CellQuest and ModFit LT programs (Becton Dickinson). Each experimental condition was performed in triplicate for each group and analyzed in three independent experiments.

2.4. Cell migration

The migratory capacity of human dental pulp stem cells (hDPSCs) in response to vital pulp materials was evaluated using in vitro wound healing assays. hDPSCs were seeded in 12-well plates, with each well containing 2×10^4 cells. An artificial wound was created in each well using a sterile 100 μL pipette tip. Wound closure was monitored and recorded at 0, 24, 48, and 72 hours for both experimental and control groups. Images captured at these time points were analyzed quantitatively using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). These assays were performed in triplicate for each material to ensure reproducibility.

2.5. F-actin cytoskeleton staining

The cytoskeletal structure of hDPSCs, specifically the F-actin

filaments, was examined using a phalloidin-based assay to detect changes following exposure to a pure (1:1) bioceramic material, as described in previous research [20]. After 72 hours of treatment, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for 10 min. After fixation, the cells underwent a 30-minute blocking step with 5 % bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were then incubated with TRITC-conjugated phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 hour, while the control group received phosphate-buffered saline. Cell nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fluorescence images of the stained cells were captured using an advanced confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Each experimental condition was performed in triplicate for each material and analysed in three independent experiments.

2.6. Scanning electronic microscopy and calcium release analysis

Human dental pulp stem cells (hDPSCs) were seeded at a density of 5×10^3 cells per well onto disc surfaces ($n = 9$) placed in 48-well plates. The plates were incubated at 37°C in a 5 % CO_2 environment for 72 hours to allow for cell attachment. After incubation, the discs with attached hDPSCs were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then fixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. After fixation, samples underwent

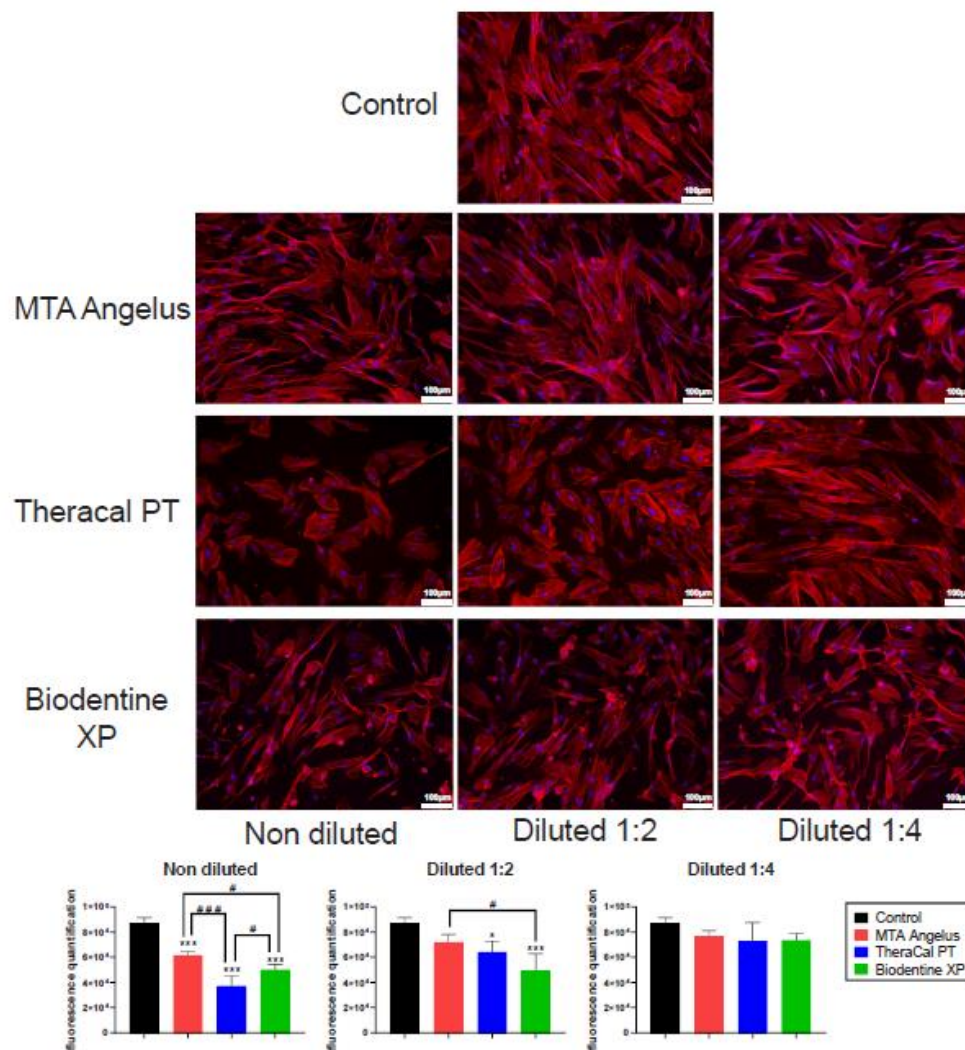


Fig. 3. Results of the hDPSC cytoskeleton staining after 72 h of culture with the undiluted tested materials (BD-XP, MTA-Ang, and Ther-PT). Scale bar: 100 μm. The images show variations in cell morphology and F-actin filament organization, which are crucial for cell adhesion, proliferation, and migration. BD-XP-treated cells maintained a well-organized cytoskeleton, supporting its biocompatibility. Asterisks denote significant differences compared to the control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), and pound signs indicate significant differences between groups (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$). Two-way ANOVA analysis: asterisks above the bars indicate a significant difference with the negative control group; pound sign above the lines indicates a significant difference between the groups connected by the line.

dehydration through a graded ethanol series and dried with hexamethyldisilazane (HMDS). The fully dried samples were sputter coated with a gold-palladium alloy to enhance conductivity. These samples were then examined using a scanning electron microscope (Jeol 6100 EDAX; Jeol Inc., Tokyo, Japan). Analyses were performed on three different regions of each sample at magnifications of 100x, 300x, and 1500x to ensure thorough observation. In addition, the chemical composition and morphological properties of the vital pulp materials were determined by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Samples of the above dimensions ($n = 3$) were prepared and stored at 37°C in 100 % humidity for 24 h. After, each sample was suspended in 5 mL deionised water for 24 h and the collected solution was analysed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-MS; Agilent 7900, Stockport,

United Kingdom). The proportion of calcium (Ca^{2+}) released from each material was calibrated against pure deionised water. Analyses were performed independently in triplicate ($n = 3$).

2.7. Analysis of cell apoptosis and necrosis and reactive oxygen species production

To assess the cytotoxic effect of different concentrations of the tested materials on human DPSCs, cells were treated with 25 %, 50 % and 100 % of tested materials for 3 days at 37°C, or with cell culture medium as a negative control, then stained with Annexin-V and 7-AAD (BD Biosciences, San Jose, CA, United States) and analyzed by flow cytometry. A dot plot was generated for each condition, with viable cells

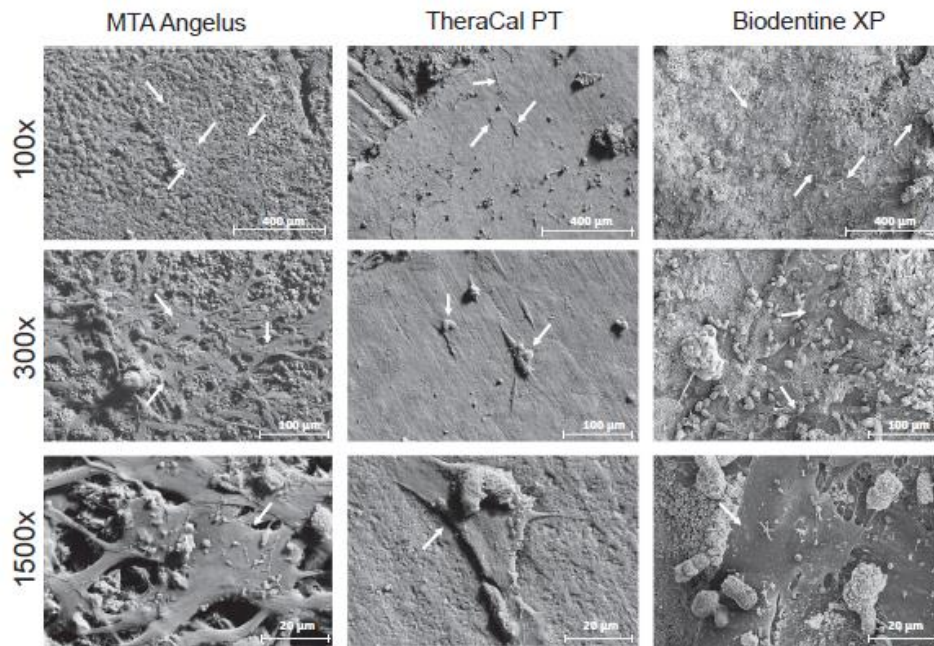


Fig. 4. Results of SEM visualization after 72 h of culture of hDPSCs seeded on the surface of the tested cement samples (BD-XP, MTA-Ang, and Ther-PT). these findings suggest that BD-XP provides a favorable surface for cell adhesion, a critical factor in regenerative applications. Magnifications: 100X, 300X, and 1500X. Scale bars: 400 μ m, 100 μ m, and 20 μ m.

appearing in the lower left quadrant (Annexin-V negative, 7-AAD negative), early apoptotic cells in the lower right quadrant (Annexin-V positive, 7-AAD negative), and late apoptotic and/or necrotic cells in the upper left and upper right quadrants (Annexin V negative, 7-AAD positive, and Annexin-V positive, 7-AAD positive), respectively. Data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, United States). For analysis of intracellular reactive oxygen species (ROS) production, DPSCs were treated with the same concentrations of the tested materials as above, then stained with the general oxidative stress probe 5-(and-6)-chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Invitrogen) at a final concentration of 10 μ M for 30 min at 37°C and analyzed by flow cytometry. All flow cytometry conditions were analyzed in $n = 3$ independent experiments using $n = 3$ human DPSC samples from different donors.

2.8. Gene expression profiling

After 3 and 7 days of incubation with the specified materials ($n = 3$), total RNA was extracted from both experimental and control groups using TRIzol reagent (Invitrogen). The extracted RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the PrimeScript RT reagent kit (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. The expression levels of key genes associated with bone and dentin formation, including alkaline phosphatase (ALP), osteonectin (ON), dentin sialophosphoprotein (DSPP), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and collagen type I alpha 1 (Col1A1), were measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Expression levels were normalized to the housekeeping gene GAPDH using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Untreated hPDLSCs were used as a negative control, while cells incubated in StemMACS OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec), a standard osteogenic differentiation medium, were used as a positive control. To ensure the reliability of the results, these experiments were performed in triplicate.

2.9. Evaluation of calcified nodule formation

The effect of vital pulp materials on the calcified nodule formation by hDPSCs was assessed using Alizarin Red S staining. This study replicated the cell seeding procedure and experimental group design used in the gene expression analyses, including both a negative control (cells cultured in basal growth media) and a positive control (cells cultured in OsteoDiff media). After a 21-day cultivation period, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. The fixed cells were then stained with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) to identify calcified nodules. The stained samples were documented using an Olympus CKX41 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Quantitative analysis of mineralization was performed by measuring the absorbance at 577 nm using a microplate reader. Each treatment condition and time point were performed in triplicate to ensure the reproducibility and validity of the results.

2.10. Statistical methodology

Data were analyzed using GraphPad Prism software, version 8.1.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments. The data distribution was first assessed for normality using a quantile-quantile (Q-Q) plot. Depending on the results of the normality and homogeneity of variance tests, statistical significance was assessed using either one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test or the Mann-Whitney U test. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

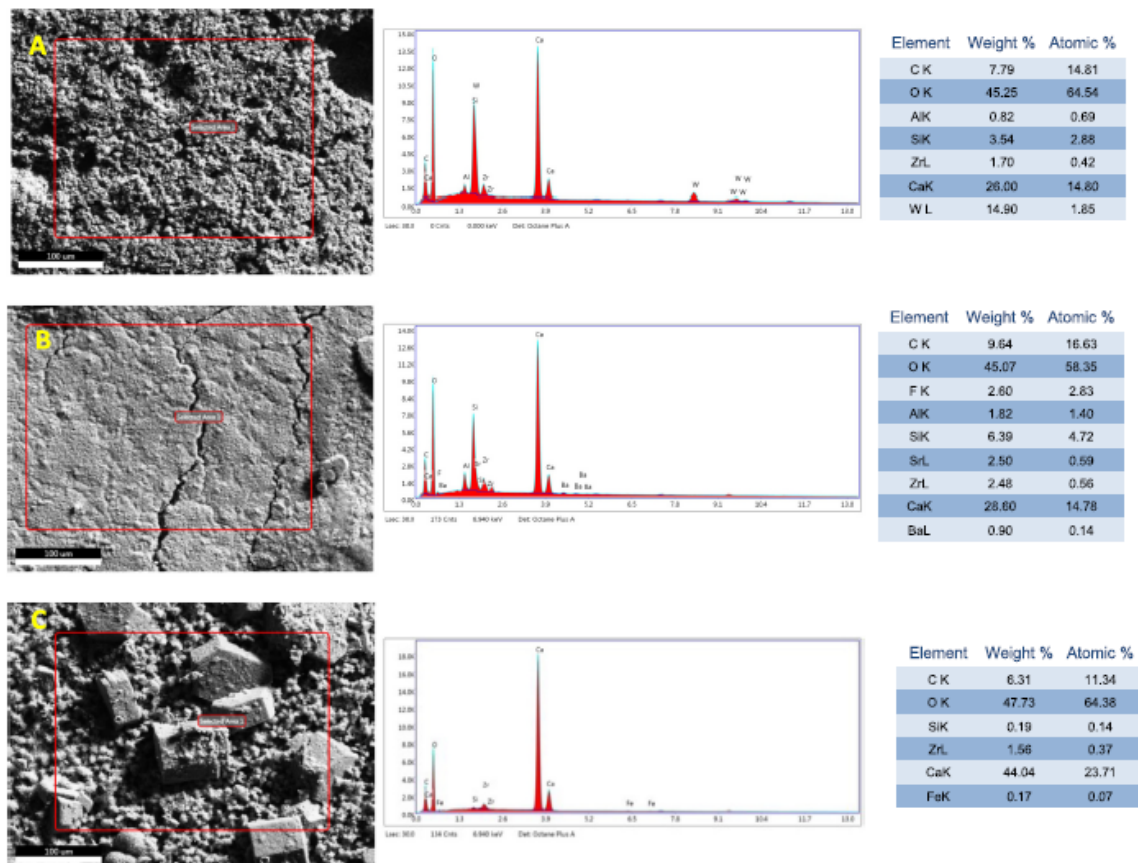


Fig. 5. Results of the SEM-EDS analysis for the cements tested (MTA-Ang (row A), Ther-PT (row B), BD-XP (row C)). The first column shows SEM images of each material (scale bar: 50 μ m). The second column shows each EDS elemental spectrum. The third column lists the elements present per material by weight and atomic weight. BD-XP exhibited a high calcium content, which is associated with enhanced bioactivity and mineralization potential.

3. Results

3.1. Cell characterisation, metabolic activity and cell cycle analysis

Flow cytometry was used to identify cell surface antigen molecules on the isolated cells. The results showed that the cells were positive for CD73, CD90, and CD105, which are specific markers for mesenchymal stem cells (MSCs), and negative for hematopoietic stem cell markers, consistent with the MSC immunophenotype (Fig. 1A). Metabolic activity, assessed by the MTT assay (Fig. 1B), demonstrated that undiluted Ther-PT significantly reduced metabolic activity compared to the control, with only a slight difference observed at 72 hours ($p < 0.001$). In contrast, 1:4 BD-XP showed no significant differences in metabolic activity compared to the control, with only a slight difference observed at 72 hours ($p < 0.05$). Overall, both MTA-Ang and BD-XP exhibited a trend towards increasing cell viability over time. Cell cycle analysis showed that Biodentine XP induces a higher accumulation of cells in the G2/M phase compared to MTA Angelus and TheraCal PT, particularly at higher concentrations, indicating potential effects on cell-cycle arrest. Conversely, TheraCal PT-treated cells predominantly remained in the G0/G1 phase across all tested concentrations, suggesting minimal interference with cell-cycle progression (Supplementary Figure 1).

3.2. Cell migration and cytoskeleton staining

Results from the wound healing assay revealed that MTA-Ang did not significantly alter cell migratory behaviour compared to the control group at any observed time point. However, cells treated with non-diluted Ther-PT and BD-XP showed a reduced rate of wound closure at 48 and 72 hours, with statistically significant differences ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) compared to the control according to two-way ANOVA (Table 2). Overall, the materials evaluated contributed to wound closure as depicted in Fig. 2. Phalloidin staining showed differential cellular confluence and F-actin stress fibers and focal adhesion complexes in the samples treated with the control, MTA-Ang, Ther-PT, and BD-XP. As shown in Fig. 3, quantification of phalloidin staining revealed that exposure to the different materials affects the cellular cytoskeleton architecture in a concentration-dependent manner. Less diluted materials displayed a stronger effect, mainly with Ther-PT and BD-XP, while the impact decreases significantly with dilution.

3.3. SEM assay and calcium ion release

Scanning electron microscopy (SEM) at 1500x magnification revealed that the experimental groups exhibited cellular filopodia that promoted attachment to the calcium silicate cement surface. In addition, these groups exhibited enhanced cell adhesion, as indicated by

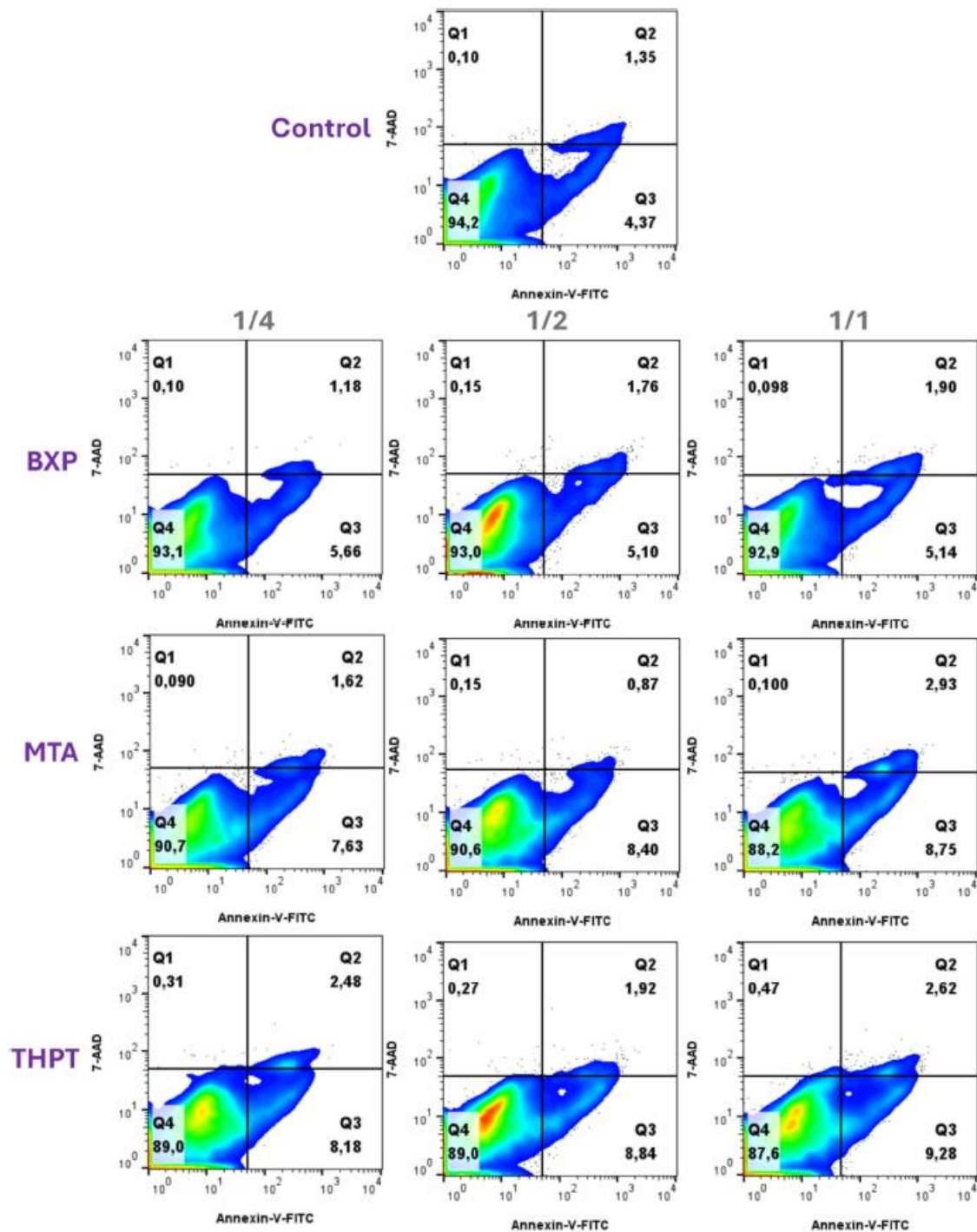


Fig. 6. Results of cell apoptosis assays. Numbers within dot plots represent percentages of live (Q4 quadrants), early apoptotic (Q3 quadrants), and late apoptotic and necrotic cells (Q1 and Q2 quadrants). The dot plots shown are representative of $n = 3$ separate experiments. BD-XP exhibited the highest percentage of viable cells ($> 90\%$), while Ther-PT showed a significant reduction in viability, indicating higher cytotoxicity. These findings suggest BD-XP as a more biocompatible material for vital pulp therapy.

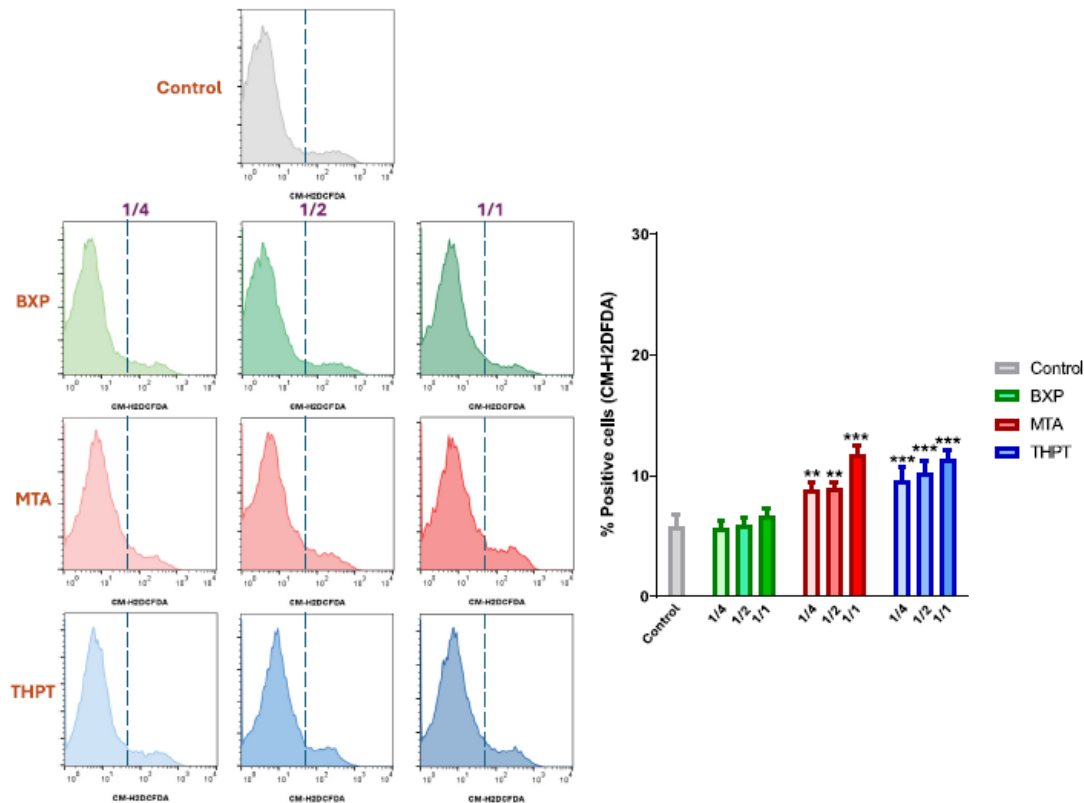


Fig. 7. Reactive oxygen species (ROS) production assays. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production in hDPSCs after 72 hours of exposure to BD-XP, MTA-Ang, and Ther-PT. BD-XP maintained ROS levels similar to the control, whereas MTA-Ang and Ther-PT led to increased oxidative stress, which may contribute to cytotoxic effects. In the histograms, the y-axis indicates the number of cells, and the x-axis shows the mean fluorescence intensity (MFI) on a logarithmic scale. Asterisks denote significant differences compared to the control group: * $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

improved substrate attachment, cell spreading, and cytoskeletal development within the niche-like structures of the cement (Fig. 4). Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) results indicated that MTA-Ang, Ther-PT, and BD-XP contained high percentages of calcium, carbon, and oxygen. Minor elements detected included silicon in BD-XP, aluminium and silicon in MTA-Ang and Ther-PT, and zirconium as a radiopacifier in all materials (Fig. 5). Biodentine XP exhibited significantly higher Ca^{2+} release (109.94 ± 5.68 ppm) compared to MTA Angelus (26.49 ± 2.51 ppm) and TheraCal PT (40.61 ± 2.08 ppm) ($p < 0.0001$). No significant difference was found between MTA Angelus and TheraCal PT ($p = 0.519$). These findings suggest that Biodentine XP may have greater mineralization potential due to its enhanced calcium release (Table 2).

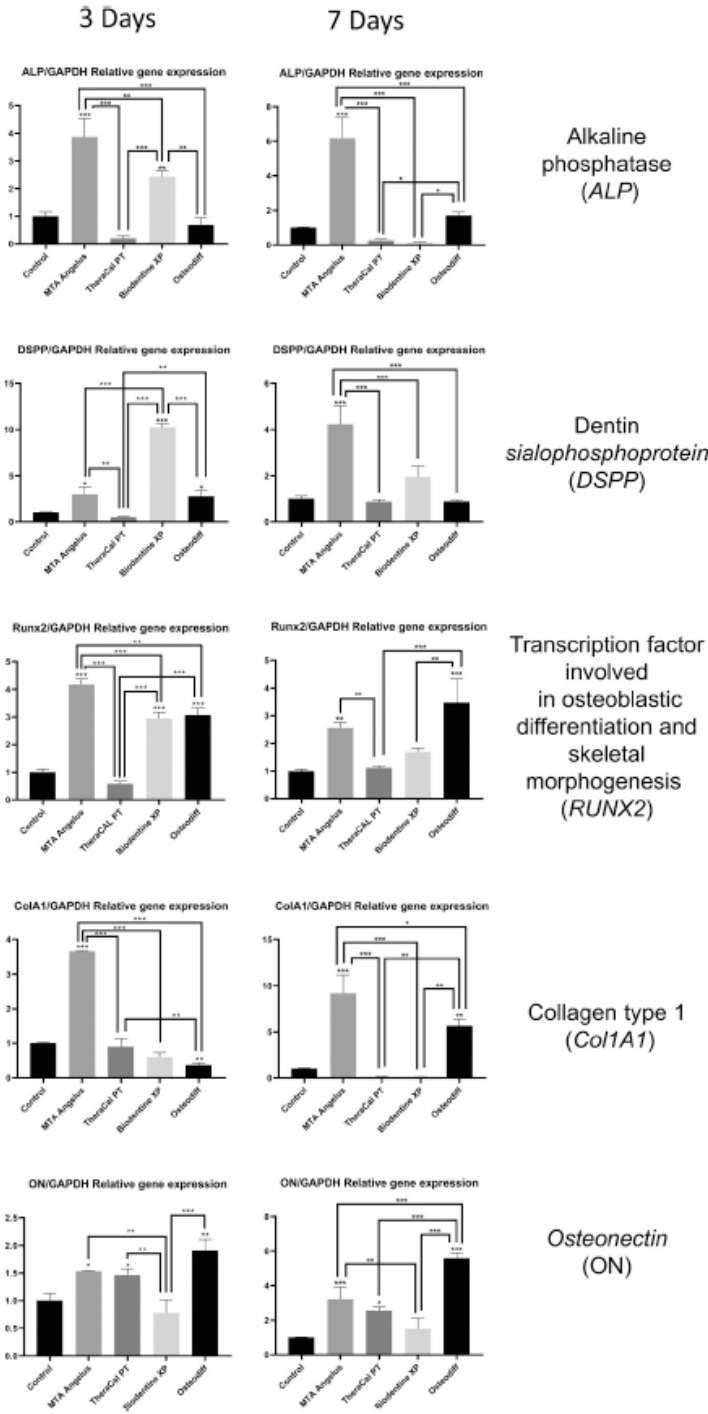
3.4. Analysis of cell apoptosis and necrosis and reactive oxygen species production

The apoptosis/necrosis assay measures in real time the exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of cell membranes during the apoptotic process, allowing discrimination of cells at different stages. The numbers within the density plots represent the percentage of live (Q4), early apoptotic (Q3) and late apoptotic/necrotic (Q1 and Q2) cells at different concentrations (1/1, 1/2, and 1/4) and are representative of

three independent experiments performed in triplicate for each material. As shown in Fig. 6, BD-XP showed a percentage of live cells higher than 90 %. Conversely, Ther-PT showed a percentage of live cells lower than 90 %. The MTA samples showed similar percentages of live cells (88–90 %), early apoptotic cells, late apoptotic and necrotic cells at all concentrations. On the other hand, the percentages of human DPSCs stained with the general oxidative stress indicator CM-H2DCFDA were analyzed by flow cytometry (Fig. 7). Although the increases in intracellular ROS levels were not substantial, a significant increase in ROS production was observed when DPSCs were treated with increasing concentrations of MTA and Ther-PT for 72 hours, but not with BD-XP (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.5. Gene expression and Alizarin red staining

The effect of vital pulp materials on gene expression profiles associated with osteogenic and odontogenic differentiation and mineralization was investigated in detail using quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and Alizarin red staining. The qRT-PCR analysis revealed a significant upregulation of ALP and DSPP expression levels in the BD-XP and MTA-Ang groups compared to the other groups on day 3. Furthermore, the MTA-Ang group demonstrated a significant upregulation of ALP, DSPP, and COL-1 expression compared to the control



(caption on next page)

Fig. 8. Quantitative RT-qPCR analysis of osteo/odontogenic marker expression in hDPSCs treated with BD-XP, MTA-Ang, and Ther-PT at 3 and 7 days. BD-XP significantly upregulated ALP, DSPP, and COL1A1, along with key osteogenic regulators RUNX2, osteonectin (ON/SPARC), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and osteix (SP7), indicating enhanced mineralization and extracellular matrix formation. * $p < 0.05$; * $p < 0.01$; * $p < 0.001$. Two-way ANOVA analysis: asterisks above the bars indicate a significant difference with the negative control group; asterisks above the lines indicate a significant difference between the groups connected by the line.

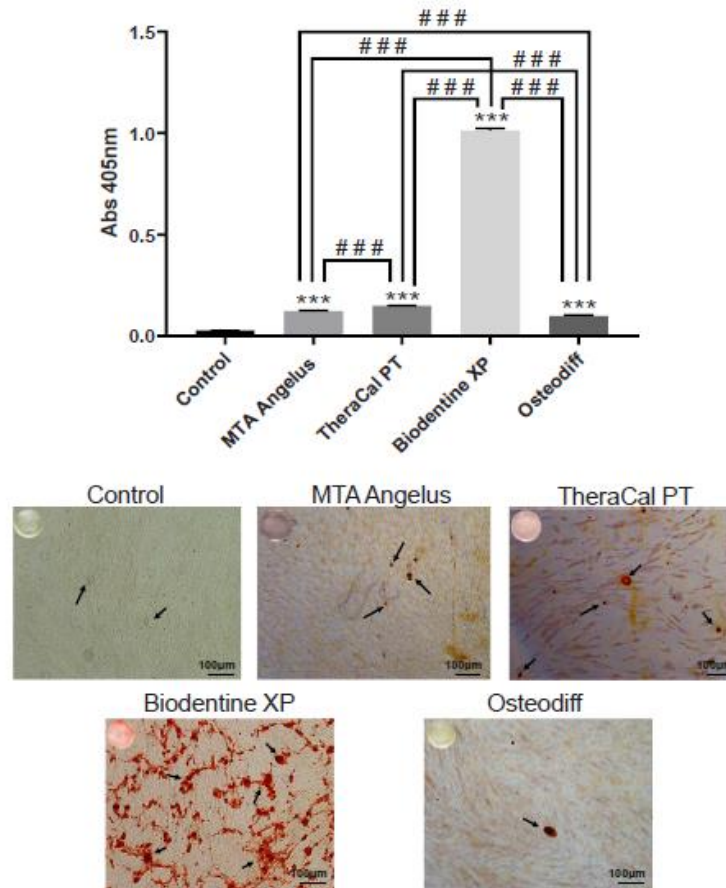


Fig. 9. Results of the Alizarin Red S staining assay of hDPSCs after 21 days of culture with the tested vital pulp materials, DMEM (negative control), or Osteodiff (positive control). BD-XP-treated cells formed the highest number of calcified nodules, suggesting its superior osteogenic potential. * $p < 0.05$; * $p < 0.01$; * $p < 0.001$. Two-way ANOVA analysis: asterisks above the bars indicate a significant difference with the negative control group; asterisks above the lines indicate a significant difference between the groups connected by the line. Representative images: areas stained red indicate mineralization.

group on day 7 ($p < 0.01$) (Fig. 8). Alizarin red staining results indicated that all vital pulp materials tested induced varying degrees of calcium deposition. At day 21, the BD-XP-treated group exhibited significantly higher levels of calcium deposition, along with more pronounced colour and size of calcified nodules, compared to the other materials and the control group (* $p < 0.001$), as shown in Fig. 9. These findings collectively indicate that BD-XP and MTA-Ang are robust inducers of osteogenic and odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells (hDPSCs).

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the hypothesis that the biological properties and differentiation potential of human dental pulp stem cells (hDPSCs) are enhanced in the presence of bioactive materials,

specifically Biodentine XP. Experimental groups exposed to Biodentine XP showed changes in cellular behaviour and gene expression compared to the control groups. In particular, our results revealed that Biodentine XP significantly upregulated the expression of key osteo/odontogenic markers, including alkaline phosphatase (ALP) and dentin sialophosphoprotein (DSPP), which are closely associated with the mineralization process. These findings suggest that Biodentine XP plays a pivotal role in promoting the osteo/odontogenic differentiation of hDPSCs. Therefore, the data obtained in this study provide strong evidence to partially reject the null hypothesis, indicating that the presence of Biodentine XP enhances the differentiation capacity and mineralization potential of hDPSCs.

Assessment of the cytocompatibility of a material through in vitro evaluation provides an important preliminary indication of its potential suitability for clinical applications [21]. In this study, human dental

pulp stem cells (hDPSCs) were used due to their accessibility, low morbidity associated with their extraction, high harvesting efficiency and significant differentiation capacity. Moreover, hDPSCs have demonstrated favourable interactions with biomaterials, making them particularly suitable for applications in regenerative tissue therapies. Given these attributes, the biocompatibility of materials selected for vital pulp therapy requires careful evaluation. Such materials must support the survival and proliferation of hDPSCs within pulp tissues, which are believed to possess inherent reparative capabilities [22].

Recent advances in this field have focused on the development of calcium silicate-based cements, which are designed to exhibit bioactive properties [21,23]. These materials promote the release of calcium and hydroxide ions, contributing to the formation of hydroxyapatite and subsequently facilitating the formation of dentin bridges [24]. Despite these advances, there is still a paucity of data on the biological and bioactive potential of newer materials such as Biodentine XP. This knowledge gap highlights the need for further research to comprehensively evaluate the effects of Biodentine XP on the biological functions and differentiation potential of hDPSCs, with implications for its use in clinical applications.

The ISO 10993-5 standard, as established by the International Organization for Standardization in 2009, provides comprehensive guidelines for the evaluation of the cytotoxicity of materials used in medical applications [15]. In this study, we followed the protocols outlined in ISO 10993-5 and used the MTT assay as a reliable method for evaluating the cytotoxicity of dental materials. The MTT assay is widely recognized as a standard approach for the cytotoxic evaluation of biomaterials, particularly in the dental field. Our findings are consistent with previous research showing that bioactive materials have an increased tendency to increase cell viability over time. This observation is consistent with existing literature and further supports the biocompatibility of bioceramic-based materials in dental applications [20,25].

In relation to cellular migration, the literature suggests that the mechanisms responsible for wound closure in the scratch assay involve both cellular proliferation and migratory ability [26]. The interaction between biomaterials and cellular structures can lead to cellular degeneration, which may hinder the wound healing process [27]. Within the scope of this study, cells treated with bioceramic materials displayed responses similar to those observed in the untreated control group throughout the wound healing assay [26,28]. In addition, an initial evaluation of cytotoxicity was made by morphological analysis using immunofluorescence techniques. As noted by Rohr et al. [29], cytotoxic components in dental materials can disrupt cell integrity, leading to pyknotic nuclei and alterations in cytoskeletal organization. However, despite the potential for such adverse effects, cytological changes indicative of cytotoxic responses, particularly those involving the cytoskeleton, were not observed in the materials tested in this study. This lack of cytological damage is consistent with the findings of both the MTT assay and migration assays, supporting the conclusion that the materials tested are biocompatible under the conditions investigated.

Consistent with the aforementioned findings, our scanning electron microscopy (SEM) analysis provided additional insight into the cellular interactions with the tested materials, revealing the presence of cellular filopodia that facilitate the anchoring of cells to the material surfaces. This morphological evidence is indicative of active cell-material interactions, with calcium playing a critical role in mediating these biological processes, particularly in the context of fibroblast adhesion. The observed improvement in cell attachment is strongly associated with the release of Ca^{2+} from the vital pulp materials used in this study [30,31].

As documented in Table 1, the inclusion of Ca^{2+} in the composition of these materials is likely responsible for the observed increased cell attachment. This correlation emphasizes the critical role of calcium as a key element in promoting cell adhesion, thereby enhancing the biocompatibility and therapeutic efficacy of the materials [32]. The importance of calcium in these interactions is further supported by Energy Dispersive X-Ray (EDX) analysis, which revealed a higher peak of

Ca^{2+} in Biodentine XP (BD-XP) compared to other materials, such as MTA-Ang and Ther-PT. However, it is important to acknowledge the limitations of EDX analysis, particularly its inability to distinguish between calcium hydroxide peaks and other crystalline phases in post-setting hydraulic cements [33]. To overcome this limitation and gain a more comprehensive understanding of the material composition and its interactions, other complementary analytical techniques, such as attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy or X-ray diffraction (XRD) analysis, could be employed [34]. These techniques would provide additional information on the chemical and crystalline structure of the materials, giving further insight into the mechanisms underlying their biocompatibility.

The apoptosis/necrosis assay revealed a reduced number of viable cells in samples treated with Ther-PT, as compared to BD-XP, which maintained over 90 % cell viability at all concentrations tested. The lower viability observed with Ther-PT may be related with its biochemical properties, potentially leading to membrane deterioration and cell death [35]. The comparable performance of MTA and BD-XP in terms of cell viability suggests that the underlying mechanisms of cytotoxicity may differ between different bioactive materials. The role of oxidative stress in this context is critical, as materials that induce higher levels of reactive oxygen species (ROS) are often associated with increased cytotoxicity and genotoxicity [36]. The results showed that MTA and Ther-PT significantly increased ROS production in human dental pulp stem cells (hDPSCs) over 72 hours, whereas BD-XP did not induce such an increase. This suggests that BD-XP is associated with reduced oxidative stress, which is beneficial for maintaining cell viability and function. Excessive ROS production is known to cause DNA damage, telomere shortening, and accelerated cell senescence, ultimately leading to cell death [37].

Osteo/odontoblastic differentiation of hDPSCs was assessed by quantifying key differentiation-related gene expressions using RT-qPCR, as well as through mineralization assays [19]. Alkaline phosphatase (ALP) is widely recognized as a key marker of early osteoblast and odontogenic differentiation. This enzyme plays a pivotal role in promoting dentin matrix formation within the pulp tissue, which is essential for the repair processes and recovery after pulpal injury [38]. In the current study, a significant overexpression of ALP was observed in the BD-XP group at the 3-day time point. This early upregulation of osteogenic-related markers appears to be a consistent finding in studies where pulp cells are treated with calcium silicate-based cements [39]. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is a major non-collagenous matrix protein that is initially expressed in pre-odontoblasts and dental pulp cells during tooth development and remains highly expressed in mature odontoblasts [23]. According to our findings, DSPP expression was upregulated on day 3 after treatment with both MTA-Ang and BD-XP. By day 7, MTA-Ang maintained a higher level of DSPP expression compared to the control group. This early upregulation of DSPP may be due to the use of a 2D experimental model [23]. Conversely, in a separate study using 3D cultured cells in direct contact with MTA and Biodentine™, no significant difference was observed between the materials and the control at day 7. However, at days 14 and 21, both cements were found to promote the upregulation of DSPP in a similar pattern [40].

Mineralization of the extracellular matrix is the ultimate indicator of bone regeneration in vitro, and Alizarin red staining is a reliable technique for assessing the formation of calcified nodules [41]. In this study, hDPSCs treated with BD-XP exhibited a more intense Alizarin red staining, indicating a greater presence of mineralized nodules compared to untreated cells or those treated with MTA-Ang, Ther-PT, and Osteo-Diff over the same time period. Previous studies have documented the ability of MTA Angelus to induce calcium deposition, highlighting its bioactivity and potential to promote osteogenic differentiation [42]. However, the lack of research investigating the bioactivity of Biodentine XP on hDPSCs hinders a direct comparison with the findings of this study.

However, this study has certain limitations. Although these findings

may not be directly applicable to clinical situations in humans, they are scientifically valuable as they provide a suitable model for assessing early properties of dental materials. Therefore, further research using in vivo animal models is needed to validate these results.

5. Conclusion

In conclusion, the findings of this study demonstrate that Biodentine XP significantly enhances the biological properties and mineralization potential of hDPSCs due to its high calcium ion content. The biocompatibility of the material and its ability to promote cellular adhesion highlight its potential in regenerative dental therapies. Further studies using complementary analytical techniques are recommended to deepen the understanding of its bioactive properties.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the Universidad de Murcia (ID: 3686/2021). Likewise, permission was obtained from the Health Department authorities to use the information contained in the CDHs, which had previously been anonymized by one of the investigators belonging to the medical staff of the Health Department in order to protect patient confidentiality. All the information was processed in accordance with the confidentiality regulations defined under Act 15/1999 referred to personal data protection.

Ethics and consent to participate

Written informed consent was obtained from the parents of all individual participants included in the study.

Conflicts of interest

A. Mora declares that he has no conflict of interest. D. García-Bernal declares that he has no conflict of interest. F.J. Rodríguez-Lozano declares that he has no conflict of interest. J. Ghilotti declares that he has no conflict of interest. A. Lozano declares that he has no conflict of interest. S. López-García declares that he has no conflict of interest.

Funding

This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant-PID2020-115887GB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), the Spanish Network of Advanced Therapies (TERAV), RICORS project "RD21/0001/0022" funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-funded by the European Union-NextGeneration EU. Recovery, Transformation and Resilience Plan.

CRediT authorship contribution statement

Investigation and methodology: Sergio López-García, Francisco Javier Rodríguez Lozano, Alejandro Mora; supervision, visualization, conceptualization, and data curation: Adrián Lozano, James Ghilotti; investigation, methodology, and writing - original draft: Francisco Javier Rodríguez-Lozano; conceptualization, formal analysis, project administration, supervision, validation, and writing - review and editing: Adrián Lozano, David García Bernal; investigation, methodology, project administration, resources, writing - original draft, and writing - review and editing: Alejandro Mora, Francisco Javier Rodríguez-Lozano. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.dental.2025.03.011.

References

- [1] American Association of Endodontists. AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy. *J Endod* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.07.015>.
- [2] Rosa V, Cavalcanti BN, Nor JE, Tesvergill-Mutluay A, Silikas N, Bottino MC, et al. Guidance for evaluating biomaterials' properties and biological potential for dental pulp tissue engineering and regeneration research. *Dent Mater* 2024. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2024.12.003>.
- [3] Cushtley S, Duncan HP, Lappin MJ, Chua P, Eblamin AD, Clarke M, et al. Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2021;54:556–71.
- [4] Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S, García-Bernal D, Sans JL, Guerrero-Girones J, et al. Biomimetic potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta2O5)-containing calcium silicate cement. *Clin Oral Invest* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04117-x>.
- [5] Sabeti M, Huang Y, Chung YJ, Azarpazhooh A. Prognosis of vital pulp therapy on permanent dentition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Endod* 2021;47:1633–95.
- [6] Kunert M, Lukomskaya-Szymanska M. Bio-inductive materials in direct and indirect pulp capping: a review article. *Materials* 2020;13.
- [7] González-Pita LG, Vargas-Sánchez PK, Bombonato-Prado KP, Delgado-Mejía E, Torres-Rodríguez C. Response of non-differentiated pulp cells (OD-21) to a novel bioceramic for dental pulp capping. *G Ital di Endod* 2023;37:28–36.
- [8] Spagnuolo G. Bioactive dental materials: the current status. *Mater (Basel)* 2022;15.
- [9] Spagnuolo G, De Luca I, Iaculli F, Barbato E, Valletta A, Calarco A, et al. Regeneration of dentin-pulp complex: effect of calcium-based materials on hDPSCs differentiation and gene expression. *Dent Mater* 2023;39:405–91.
- [10] Badr MM, Abu-Geida AM, Hashem AA, El Ashry GH. Immunohistochemical analysis of Biodentine versus MTA in repair of furcation perforation: an animal study. *G Ital di Endod* 2023;37:62–71.
- [11] Pedrosa MDS, Vilela HDG, Rahhal JG, Bueno NP, Lima FS, Nogueira PN, et al. Exposure to lipopolysaccharide and calcium silicate-based materials affects the behavior of dental pulp cells. *Bras Dent J* 2022;33:9–17.
- [12] Neves VCM, Yianni V, Sharpe PT. Macrophage modulation of dental pulp stem cell activity during tertiary dentinogenesis. *Sci Rep* 2020;10:20216.
- [13] Osorio R, Rodríguez-Lozano FJ, Toledano M, Toledano-Osorio M, García-Bernal D, Murcia L, et al. Mitigating lipopolysaccharide-induced impairment in human dental pulp stem cells with tildelugluc-doped nanoparticles: Enhancing osteogenic differentiation and mineralization. *Dent Mater* 2024;40:1591–601.
- [14] Bhandari SS, Palin W, Kuehne SA, Camilleri J. Investigating best practice for specimen preparation for biological testing of root canal sealers. *Dent Mater* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.12.001>.
- [15] ISO - Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for in vitro cytotoxicity. 2009.
- [16] López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Sans JL, Forner L, Pecci-Lloret MP, Lozano A, et al. Biological properties of Ceraputty as a retrograde filling material: an in vitro study on hPDLSCs. *Clin Oral Invest* 2023;27:4233–43.
- [17] Pedano MS, Li X, Li S, Sun Z, Cokic SM, Putzeys E, et al. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells. *Dent Mater* 2018;34:797–808.
- [18] Pedano MS, Li X, Yoshihara K, Landuyt KV, Van Meerbeek B. Cytotoxicity and bioactivity of dental pulp-capping agents towards human tooth-pulp cells: a systematic review of in-vitro studies and meta-analysis of randomized and controlled clinical trials. *Materials* 2020;13.
- [19] López-García S, Aznar-Cervantes SD, Pagán A, Llana C, Forner L, Sans JL, et al. 3D Graphene/silk fibroin scaffolds enhance dental pulp stem cell osteo/odontogenic differentiation. *Dent Mater* 2024;40:431–40.
- [20] Lozano-Guillen A, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Sans JL, Lozano A, Llana C, et al. Comparative cytocompatibility of the new calcium silicate-based cement NeoPutty versus NeomTA Plus and MTA on human dental pulp cells: an in vitro study. *Clin Oral Invest* 2022;26:7219–28.
- [21] Lin CY, Chen RS, Hsu SH, Chen MH. A tricalcium phosphate (TCP) and hydroxyapatite (HA) based light-cured biomaterial for vital pulp therapy. *Dent Mater* 2024. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2024.06.009>.
- [22] Een M, Ouyen Y, Seyhan MP, Ersev H, Tuna-Ince EB. Evaluation of the genotoxicity, cytotoxicity, and bioactivity of calcium silicate-based cements. *BMC Oral Health* 2024;24:119.
- [23] Koutrouli A, Machla P, Arapostathis K, Kokoti M, Bakopoulou A. "Biological responses of two calcium-silicate-based cements on a tissue-engineered 3D organotypic deciduous pulp analogue". *Dent Mater* 2024;40:e14–25.
- [24] De Rossi A, Silva LA, Gaton-Hernandes P, Souza-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RA, et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 2014;40(9):1362.

- [25] Huang X, Ge X, Fu W, Zhang Z, Xiao K, Lv H. Effects of novel nanoparticulate bioceramic endodontic material on human dental pulp stem cells in vitro. *Int Dent J* 2024;74:482–91.
- [26] Nguyen LCH, Pham LNG, Van Pham K, Nguyen MD, Ngo LTQ. Cytocompatibility and cell migration evaluation of calcium silicate-based root canal sealer compared to epoxide-amine resin sealer in stem cells from human apical papilla: an in-vitro study. *Aust Endod J* 2023. <https://doi.org/10.1111/aej.12706>.
- [27] Sanz JL, Soler-Doria A, Lopez-Garcia S, Garcia-Bernal D, Rodriguez-Lozano FJ, Lozano A, et al. Comparative biological properties and mineralization potential of three endodontic materials for vital pulp therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on human dental pulp stem cells (hDPSCs). *J Endod* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.08.001>.
- [28] Lopez-Garcia S, Myong-Hyun B, Lozano A, Garcia-Bernal D, Forner L, Llana C, et al. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clin Oral Invest* 2020;24:1749–59.
- [29] Rohr N, Bergemann C, Nebe JB, Fischer J. Crystal structure of zirconia affects osteoblast behavior. *Dent Mater* 2020;36:905–13.
- [30] Zamparini P, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-Physical Properties and Bioactivity of New Premixed Calcium Silicate-Bioceramic Root Canal Sealers. *Int J Mol Sci* 2022;23.
- [31] Zamparini P, Spinelli A, Cardinali P, Ausiello P, Gandolfi MG, Prati C. The use of premixed calcium silicate bioceramic sealer with warm carrier-based technique: a 2-year study for patients treated in a master program. *J Funct Biomater* 2023;14.
- [32] Li X, Pedano MS, Li S, Sun Z, Jeanneau C, About I, et al. Preclinical effectiveness of an experimental tricalcium silicate cement on pulpal repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;116:111167.
- [33] Janini ACP, Pelepenko LE, Boldieri JM, Doe Santos VAB, da Silva NA, Raimundo Jr IM, et al. Biocompatibility analysis in subcutaneous tissue and physico-chemical analysis of pre-mixed calcium silicate-based sealers. *Clin Oral Invest* 2023;27:2221–34.
- [34] Pelepenko LE, Saavedra F, Antunes TBM, Bombarda GP, Gomes B, Zaia AA, et al. Physicochemical, antimicrobial, and biological properties of White-MTAFlow. *Clin Oral Invest* 2021;25:663–72.
- [35] Saber SM, Gomaa SM, Elashiry MM, El-Banna A, Schafer E. Comparative biological properties of resin-free and resin-based calcium silicate-based endodontic repair materials on human periodontal ligament stem cells. *Clin Oral Invest* 2023;27: 6757–68.
- [36] Lima-Candeiro CL, Paranhos LR, de Oliveira Neto NP, Ribeiro RAO, de-Souza-Costa CA, Guedes FR, et al. Viability and oxidative stress of dental pulp cells after indirect application of chemomechanical agents: An in vitro study. *Int Endod J* 2024;57:315–27.
- [37] Pires CW, Botton G, Cadoni FC, Machado AK, Anzolin VP, da Cruz IB, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J* 2016;49:737–45.
- [38] Kim Y, Lee D, Song D, Kim HM, Kim SY. Biocompatibility and Bioactivity of Set Direct Pulp Capping Materials on Human Dental Pulp Stem Cells. *Mater (Basel)* 2020;13.
- [39] Khedmat S, Sarraf P, Seyedjafari E, Sanaei-Rad P, Noori P. Comparative evaluation of the effect of cold ceramic and MTA-Angelus on cell viability, attachment and differentiation of dental pulp stem cells and periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *BMC Oral Health* 2021;21:628.
- [40] Widbiller M, Lindner SR, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Schmalz G, et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Invest* 2016;20:237–46.
- [41] Abou ElReash A, Hamama H, Grawish M, Saeed M, Zaen El-Din AM, Shahin MA, et al. A laboratory study to test the responses of human dental pulp stem cells to extracts from three dental pulp capping biomaterials. *Int Endod J* 2021. <https://doi.org/10.1111/iej.13495>.
- [42] Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011;37: 1691–5.

