



Facultad de Medicina y Odontología
Programa de doctorado
3143 Odontología

BIOCOMPATIBILIDAD DE NUEVOS MATERIALES BIOCERÁMICOS DESTINADOS A LA TERAPIA VITAL PULPAR

Doctoranda:

Ana Lozano Guillén

Dirección

Leopoldo Forner Navarro
Adrián Lozano Alcañiz
Sergio López García

MAYO 2024

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

- 1.- Apellidos y nombre: Forner Navarro, Leopoldo N.I.F. 19832258W, Departamento/Instituto: Estomatología
Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València
- 2.- Apellidos y nombre: Lozano Alcañiz, Adrián Jerónimo N.I.F. 19849996F, Departamento/Instituto: Estomatología
Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València
- 3.- Apellidos y nombre: López García, Sergio N.I.F. 48503731C, Departamento/Instituto: Dermatología,
Estomatología, Radiología y Medicina Física Centro: Facultad de Medicina. Universidad de Murcia

Tutor o tutora

Apellidos y nombre: Forner Navarro, Leopoldo. N.I.F. 19832258W, Departamento/Instituto: Estomatología Centro:
Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Biocompatibilidad de nuevos materiales
biocerámicos destinados a la terapia vital pulpar"

de D/Dña. Ana Lozano Guillén,

estudiante del Programa de Doctorado 3143 Odontología (RD 99/2011) de la Universitat de València, emiten
informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 05 de febrero de 2024

Fdo.: 

LEOPOLDO
FORNER|
NAVARRO

Firmado digitalmente
por LEOPOLDO
FORNER|NAVARRO
Fecha: 2024.02.05
20:47:24 +01'00'

Director/a

Fdo.: 

ADRIAN
JERONIMO
LOZANO
ALCAÑIZ -

Firmado digitalmente
por ADRIAN JERONIMO
LOZANO ALCAÑIZ -
NIF:19849996F
Fecha: 2024.02.05
22:05:49 +01'00'

Director/a

Fdo.: 

Firmado por
LOPEZ GARCIA
SERGIO -
***0373** el
día 05/02/2024

Director/a

Fdo.: 

LEOPOLDO|
FORNER|
NAVARRO

Firmado digitalmente por
LEOPOLDO|FORNER|
NAVARRO
Fecha: 2024.02.05
20:47:53 +01'00'

Tutor/a

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Forner que además de ser uno de los directores y tutor de esta tesis, ha sido mi tutor de TFG y TFM. Por acompañarme durante toda mi etapa formativa.

A Sergio López, también director de esta tesis, por su paciencia ante mis dudas a cualquier hora y cualquier día de la semana

A mi tercer director, Adrián Lozano, mi modelo a seguir y sobre todo mi papi. Por sus consejos, su apoyo incondicional y por mostrarme su pasión por la endodoncia, que contagia.

A mis compañeros y profesores del máster de Endodoncia que se han convertido en mi segunda familia y han vivido este proceso a mi lado.

Y, por último, a mi familia. Mar, Mamá, Lala y Marc, creéis en mi más de lo que creo yo, y eso me impulsa a seguir esforzándome y mejorando cada día.

INDICE

PREÁMBULO	13
INTRODUCCIÓN.....	15
1. MATERIALES BIOCERÁMICOS.	16
1.1 PROPIEDADES DE LOS MATERIALES BIOCERÁMICOS.....	18
1.2 TIPOS DE MATERIALES BIOCERÁMICOS	19
1.3 REACCIÓN DE FRAGUADO.....	20
1.4 USOS DE LOS MATERIALES BIOCERÁMICOS.....	21
2. TRATAMIENTO DE LA PULPA VITAL	21
2.1 MATERIALES EN LA TVP.....	23
3. ESTUDIOS DE BIOCAMPATIBILIDAD DE MATERIALES	24
3.1 <i>IN VITRO</i>	24
3.2 <i>IN VIVO</i>	27
4. ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN CIENTIFICA.....	28
OBJETIVOS	33
Objetivo general:.....	34
Objetivos específicos:.....	34
HIPÓTESIS.....	35
1. Hipótesis de investigación (H_i).....	36
2. Hipótesis nula (H_0).....	36
MATERIAL Y MÉTODO	37
1. Comité de ética.....	38
2. Revisión bibliográfica.....	38
3. Obtención de las HDPSC.....	39
4. Materiales estudiados y preparación de la muestra	42
5. Metodología.....	44
5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DIFRACCIÓN DE RAYOS X (SEM-EDX)	44
5.2 ENSAYO MTT	45
5.3 EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR (CURACIÓN DE LA HERIDA)	48
5.4 MORFOLOGÍA CELULAR.....	50
5.5 ADHESION CELULAR	52
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
RESULTADOS	55
1. Resultado de la búsqueda bibliográfica	56
2. Análisis SEM-EDX.....	57
3. Ensayo MTT.....	58
5. Morfología celular	60

6. Adhesión celular.....	61
DISCUSIÓN.....	63
1. DISCUSIÓN SOBRE METODOLOGÍA.....	65
2. RESULTADOS	66
2.1 ANÁLISIS SEM-EDX	66
2.2 MTT.....	67
2.3 MIGRACIÓN CELULAR	69
2.4 MORFOLOGÍA Y ADHESIÓN CELULAR.....	70
2.5 MATERIALES.....	71
3. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	73
4. DISCOLORACIÓN	74
5. LIMITACIONES	75
CONCLUSIONES	77
FUTURAS INVESTIGACIONES.....	79
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Composición resumida de NeoMTA Plus, NeoPutty y MTA Angelus, número de lote de cada material utilizado y fabricante.....	p.44
Figura 1: Esquema de la reacción de fraguado de los materiales biocerámicos.....	p.20
Figura 2: Representación gráfica de la localización y clasificación de las células madre dentales, basada en el diagrama de Sanz (2022).....	p.27
Figura 3: Antibióticos -100U/ml penicilina y 100ug/ml de estreptomicina.....	p.40
Figura 4: Suero fetal bovino.....	p.41
Figura 5: Frascos de cultivo celular.....	p.41
Figura 6: Jeringa para la realización de los discos de cada material.....	p.43
Figura 7: Reactivo MTT.....	p.46
Figura 8: Dimetilsulfóxido.....	p.46
Figura 9: Placa de 96 pocillos introduciéndose en el espectrofotómetro.....	p.47
Figura 10: Micropipetas.....	p.49
Figura 11: Ejemplo de cómo se ven los dos extremos de la herida a las 0 horas.....	p.49
Figura 12: Faloidina.....	p.51
Figura 13: DAPI.....	p.51
Figura 14: Discos cubiertos de oro.....	p.52
Figura 15: Diagrama de flujo representando la elección de los artículos.....	p.55
Figura 16: SEM-EDX.....	p.56
Figura 17: Ensayo MTT.....	p.57
Figura 18: migración celular.....	p.58
Figura 19: morfología celular.....	p.59
Figura 20: adhesión celular.....	p.60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

TVP – Terapia Vital Pulpar

HDPSC – Human dental pulp stem cells

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MTA: *Mineral Tioxide Aggregate*

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenidildol

ANOVA: *Analysis of Variance*

AAE: American Association of Endodontics

ESE: European Society of Endodontics

SHED: *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*

PDLSC: Periodontal Ligament Stem Cells

SCAP: stem cells from apical papilla

DFPC: *dental follicle progenitor cells*

ABMSC: *alveolar bone mesenchymal stem cells*

GMSC: *gum mesenchymal stem cells*

TGPC: *tooth germ progenitor cells*

ISCT: *International Society for Cellular therapy*

EDX: espectrometría de dispersión de rayos X

SEM: Microscopio electrónico de barrido

PBS: Tampón fosfato alcalino

PREÁMBULO

La situación actual en Odontología va enfocada hacia las actuaciones mínimamente invasivas, por lo tanto, cada vez se le está dando más importancia a la terapia vital pulpar, donde en los casos en los que es posible, se puede evitar el tratamiento de conductos manteniendo la vitalidad pulpar.

Para que estos tratamientos sean efectivos y eficaces es muy importante la elección del material que se va a colocar en contacto con la pulpa dental. El material adecuado ha de ser aquel que no sea citotóxico para las células de la pulpa dental y que sea capaz de formar una barrera entre el material y la pulpa dental.

Actualmente existen materiales que cumplen con estas características, pero el avance en la investigación conlleva la aparición de nuevos materiales que requieren de los estudios y análisis pertinentes para establecer sus características terapéuticas y aportar la necesaria evidencia científica que apoye su uso.

INTRODUCCIÓN

El campo de la Endodoncia está en constante cambio debido a la aparición de nuevos materiales y técnicas que ayudan en la terapéutica específica, facilitándola o permitiendo que ésta sea menos invasiva.

1. MATERIALES BIOCERÁMICOS.

Los materiales biocerámicos son cementos hidráulicos basados en silicato de calcio. Su precursor es el MTA (*mineral tiroxide aggregate*), que fue introducido por Mahmoud Torabinejad en la universidad de Loma Linda en California, EE.UU.; y su primera aparición en la literatura científica fue en 1993 (Rao *et al.*, 2011), primordialmente como material de obturación de las retro-preparaciones en tratamientos endodónticos periapicales (Camilleri, 2008).

El MTA está compuesto por silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato y óxido de bismuto (Rao *et al.*, 2011). Según la ficha de datos de ProRoot MTA (Dentsply Sirona, EE. UU.), que salió al mercado en 1999 (Kunert y Lukomska-Szymanska, 2020), está compuesto principalmente por cemento Portland (75%), un 20% de óxido de bismuto y un 5% de sulfato cálcico dihidrato o yeso, además de otros elementos minoritarios. El cemento de portland es una mezcla de silicato dicálcico, silicato tricálcico, aluminato tricálcico, yeso y aluminoferrita tetracálcica (Srinivasan *et al.*, 2009).

El MTA es similar al cemento Portland, la diferencia entre ambos materiales radica en la presencia de óxido de bismuto en la composición del MTA (Camilleri, 2008; Jitaru *et al.*, 2016). Existen dos tipos de MTA, el blanco y el gris. Se diferencian en el contenido de óxido de hierro, óxido de aluminio y óxido de magnesio. Además el MTA blanco presenta partículas más pequeñas (Komabayashi y Spångberg, 2008).

Entre la amplia variedad de usos que presenta el MTA se encuentran: recubrimientos pulpares directos e indirectos, pulpotomías, raíces incompletamente formadas, perforaciones, obturaciones de conductos radiculares, cirugía endodóntica (Viana Viola *et al.*, 2012), pulpotomías (Barrieshi-Nusair y Qudeimat, 2006), resorciones radiculares

internas y externas (Hsien *et al.*, 2003) y en técnicas de revascularización (Bose *et al.*, 2009).

Ha sido demostrado que el MTA promueve una variedad de respuestas celulares positivas al aplicarlo directamente en la pulpa. Además, es capaz de producir un efecto en la mitosis de las células madre, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en células similares a los odontoblastos, después de una lesión o daño en los odontoblastos primarios (Damaschke *et al.*, 2010).

Por otra parte, el MTA forma hidróxido de calcio, que libera iones de calcio, los cuales son esenciales para la adhesión y proliferación. También crea un ambiente antibacteriano aumentando el pH (Parirokh y Torabinejad, 2010), induce la diferenciación y migración de células que son capaces de formar dentina o tejido óseo, y forma hidroxiapatita o apatita carbonatada, induciendo un sellado biológico y una barrera dentinaria que presenta una calidad histológicamente mayor que la barrera creada por el hidróxido de calcio (Nair *et al.*, 2007), además de presentar buena biocompatibilidad (Pedano *et al.*, 2020).

A pesar de ello, el MTA presenta desventajas, como la dificultad en su manipulación debido a la consistencia que presenta, su elevado precio, la discoloración dental que produce y su largo tiempo de fraguado (Kuru *et al.*, 2021).

Debido a la efectividad del MTA en multitud de usos, se ha intentado crear materiales parecidos a éste, pero con un coste menor, además de intentar reducir en ellos los inconvenientes que presenta. En ese sentido, los nuevos materiales intentan mejorar las características de manejo, prevenir la discoloración dental y aumentar su radioopacidad. La gran mayoría de estos materiales están compuestos por calcio y silicato. El silicato tricálcico produce la diferenciación celular de igual manera que el hidróxido de calcio (Paula *et al.*, 2019).

Los materiales biocerámicos presentan una serie de ventajas, como su biocompatibilidad, la ausencia de tóxicos, la estabilidad dimensional y la bioactividad (Surya Raghavendra *et al.*, 2017).

1.1 PROPIEDADES DE LOS MATERIALES BIOCERÁMICOS

Los materiales biocerámicos presentan propiedades biológicas y fisicoquímicas convenientes para los fines de un tratamiento endodóntico. Sus propiedades biológicas son: biocompatibilidad, bioactividad, biomineralización y acción antibacteriana (Espinoza *et al.*, 2020).

Una de sus propiedades más característica es la biocompatibilidad, que hace referencia a la ausencia de efectos negativos del material sobre los tejidos, es decir, el material es capaz de realizar su función, sin dañar el funcionamiento ni las condiciones de los tejidos sobre los que se ha colocado (Wataha, 2012). Se debe a la similitud que presentan con materiales biológicos como la hidroxiapatita y por eso son capaces de inducir una respuesta de regeneración en el organismo. Cuando estos materiales entran en contacto con el hueso, la hidroxiapatita produce un efecto osteoconductor, llevando a la formación de hueso en la interfase (Jitaru *et al.*, 2016).

La biocompatibilidad o citocompatibilidad es esperada en materiales utilizados en la terapia vital pulpar (TVP) donde van a entrar en contacto con tejidos y células sobre los cuales han de ser inocuos (Espinoza *et al.*, 2020; Sanz *et al.*, 2020).

La bioactividad, por su parte, implica la capacidad para formar hidroxiapatita (Vallittu *et al.*, 2018) y es muy importante a la hora de la regeneración y curación de un tejido. Son capaces de liberar iones de calcio y producir precipitados similares a la hidroxiapatita (Talabani *et al.*, 2020), lo que se conoce como biomineralización (Espinoza *et al.*, 2020), a través de la diferenciación de células madre presentes en el tejido pulpar, favoreciendo la creación de una barrera similar a dentina.

En la TVP las características esenciales que precisa tener un material son: la capacidad de crear una protección inmediata para la pulpa, la formación de una barrera mineralizada entre el material y la pulpa y, por último, que este material sea inocuo para el complejo dentino-pulpar (Witherspoon, 2008).

Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas de los materiales biocerámicos son las siguientes: radiopacidad, solubilidad, pH alcalino, (Rabello *et al.*, 2022) fuerza de unión, estabilidad dimensional y resistencia a la fractura (Espinoza *et al.*, 2020) dentro de los rangos adecuados.

1.2 TIPOS DE MATERIALES BIO CERÁMICOS

Los materiales biocerámicos se pueden clasificar en 5 tipos (Camilleri, 2020):

El tipo 1 está constituido por materiales basados en cemento de Portland sin aditivos, que pueden tener o no radioopacificante y que se mezclan con agua, por ejemplo, ProRoot MTA (Dentply, Tulsa, EE. UU.).

Si el material basado en cemento de Portland y mezclado con agua incluye aditivos, se considera tipo 2. Un ejemplo del tipo 2 sería el MTA Angelus (Angelus, Londrina, Brasil).

Cuando se sustituye el agua para el mezclado por vehículos diferentes, en cementos de Portland, pasan a ser tipo 3, como por ejemplo el Endoseal (Maruchi, Gangwon-do, Corea del Sur).

Al tipo 4 pertenecen materiales basados en silicato tricálcico o dicálcico, con aditivos y mezclados con agua, como el Biodentine (Septodont, Maur-des-Fosses, Francia) o el BioAggregate (Bioceramix inc., Vancouver, Canadá).

Por último, el tipo 5 es similar al grupo 4, pero cambiando el vehículo, es decir, sin mezclar el material con agua, se refiere a materiales premezclados, como el TotalFill (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suiza).

Otra forma de clasificar los materiales biocerámicos es según la localización en la que se utiliza. Ya sea intracoronal, intrarradicular o extrarradicular. Los intracoronales incluirían los usados en la TVP y en la Endodoncia regenerativa. Los intrarradiculares están indicados para el tratamiento de perforaciones, como cementos de sellado radicular y para la realización de tapones apicales. Por último, los de uso extrarradicular son los que se

utilizan en la retroobtención radicular en microcirugía periapical, el tratamiento de perforaciones y el sellado de resorciones (Camilleri, 2020).

Los materiales biocerámicos se presentan premezclados o en formato polvo-líquido. Esta última presentación se ofrece en cápsulas que necesitan agitación o mezclado manual. En cambio, el formato premezclado viene presentado en jeringas que permiten la colocación del material directamente. Los materiales polvo-líquido comienzan su fraguado una vez mezclados, mientras que los premezclados comienzan la reacción de fraguado al entrar en contacto con los fluidos tisulares (Kharouf *et al.*, 2020).

1.3 REACCIÓN DE FRAGUADO

Al contrario que la mayoría de los materiales dentales, los materiales biocerámicos necesitan humedad para fraguar. La humedad la adquieren del tejido donde se coloca, túbulos dentinarios, pulpa, ligamento periodontal...

Es el silicato de calcio el que, junto con el agua presente en los tejidos, forma gel de silicato de calcio hidratado e hidróxido de calcio. Seguidamente el hidróxido de calcio formado reacciona con iones fosfato, formando hidroxiapatita y agua. Esa agua es la que sigue interactuando con el silicato de calcio hasta llegar a una saturación adecuada en la que la hidroxiapatita se precipita (Debelian y Trope, 2016; Koch *et al.*, 2010).

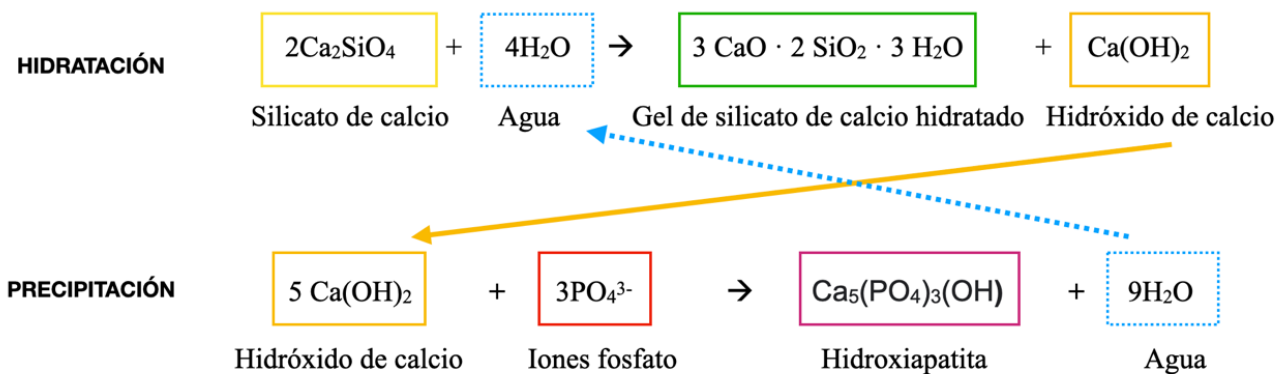


Figura 1: Esquema de la reacción de fraguado de los materiales biocerámicos.

1.4 USOS DE LOS MATERIALES BIOCERÁMICOS

Los materiales biocerámicos pueden ser usados básicamente como selladores o como reparadores.

Los primeros son los que se introducen en el interior del conducto, es decir, como cemento sellador en la obturación en los tratamientos de conductos. Esto es posible gracias a la reducción del tamaño de partícula, de forma que se consigue que sean más fluidos para este uso y permitiendo su difusión por los túbulos dentinarios (Muedra *et al.*, 2021). Las ventajas de usar estos cementos en los tratamientos de conductos residen por un lado en su biocompatibilidad, ya que así se previene la inflamación o rechazo por parte de los tejidos circundantes; y, por otro lado, debido a su contenido en fosfato cálcico, que ayuda a mejorar el fraguado del material y crea una estructura similar a la apatita, favoreciendo la unión del cemento con la dentina (AL-Haddad y Che Ab Aziz, 2016).

Por otro lado, otros materiales se usan como reparadores. En este caso se utilizan para perforaciones radiculares, resorciones, apicoformación, retro-obturaciones y para la TVP.

La TVP incluye el recubrimiento pulpar indirecto, el recubrimiento directo y la pulpotomía. En el caso de la pulpotomía y del recubrimiento pulpar directo el material va a entrar en contacto con la pulpa dental, de ahí la importancia de la biocompatibilidad del material y de su capacidad de formar una barrera mineralizada para proteger a la pulpa.

2. TRATAMIENTO DE LA PULPA VITAL

La terapia vital pulpar es una alternativa al tratamiento de conductos en los casos en los que sea posible evitar éste. Es un procedimiento que consiste en tratar el diente que presenta la pulpa afectada sin eliminarla de forma total o parcial (Song *et al.*, 2020). Se intenta mantener el tejido pulpar que ha sido comprometido pero no destruido, debido a caries dentales profundas, traumatismo dental o tratamientos restauradores iatrogénicos (Hanna *et al.*, 2020).

Este tratamiento se efectúa sobre todo en la dentición permanente joven, cuyos dientes aún presentan el ápice con una formación incompleta (Song *et al.*, 2020).

La TVP incluye cualquier terapia que minimice la lesión pulpar mediante la protección de ésta, ante efectos tóxicos, bacterianos, químicos, daños térmicos o mecánicos. Este tratamiento también se puede realizar en la dentición permanente con ápice ya formado.

La pulpotomía consiste en la remoción de una porción de la pulpa, manteniendo la vitalidad del resto de esta (Song *et al.*, 2020). Se elimina tejido pulpar afectado irreversiblemente y se protege aquel que está sano. La pulpotomía puede ser parcial, eliminando una pequeña porción de pulpa o cameral, en la que se elimina la mayor parte o la totalidad de la pulpa presente en la cámara pulpar (Hanna *et al.*, 2020).

El recubrimiento pulpar es uno de los tratamientos más relevantes en este aspecto. Su objetivo es mantener la vitalidad del diente en el que se ha expuesto la pulpa (Paula *et al.*, 2019). La exposición pulpar puede ocurrir debido a la remoción de caries, por un traumatismo, debido a anomalías anatómicas o por procedimientos restauradores.

En la práctica clínica, no se puede crear un ambiente estéril para la pulpa expuesta, con lo cual se crea una barrera artificial entre la pulpa vital y el ambiente, para así proteger la pulpa durante el periodo de curación. Estas barreras son los materiales de recubrimiento pulpar, cuya función principal es la inducción a la formación de tejido mineralizado por parte de las células pulpares restantes y conseguir sellar la exposición pulpar, contribuyendo así al mantenimiento de la vitalidad pulpar (Dammaschke *et al.*, 2010).

Por otro lado, el recubrimiento pulpar indirecto es una técnica que sirve para evitar la exposición de la pulpa en tratamientos con lesiones de caries muy profundas, cuando no hay evidencia clínica de degeneración pulpar o lesión periapical (Kunert y Lukomska-Szymanska, 2020) con la posterior colocación de un material biocompatible (Boutsiouki, Frankenberger y Krämer, 2018).

Existen múltiples factores que pueden afectar al éxito de la TVP: el estado de la pulpa, el tiempo desde la exposición pulpar hasta la realización del tratamiento, la presencia de

dolor espontáneo previo, una exposición mecánica o cariosa, el tamaño de la exposición y la edad del paciente (Hanna *et al.*, 2020).

2.1 MATERIALES EN LA TVP

Aunque los materiales de elección en los tratamientos de TVP, son los materiales biocerámicos, estando de acuerdo tanto la AAE -*American Association of Endodontics*- ('AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy', 2021) como la ESE -*European Society of Endodontics* - (Duncan *et al.*, 2019), existen otros materiales con los que se han realizado los tratamientos de TVP antes de la aparición de los nuevos materiales biocerámicos con resultados aceptables y son los siguientes:

2.1.1 HIDRÓXIDO DE CALCIO

Este material es capaz de promover la formación de dentina reparativa en la unión entre la zona cáustica y el tejido vital (Goldberg *et al.*, 1984; Kunert y Lukomska-Szymanska, 2020).

Este material presenta propiedades antibacterianas potentes, razón principal por la que se utilizaba (Hanna *et al.*, 2020).

Aunque su aplicación en una exposición pulpar lleva a la formación de una barrera protectora, esta no es uniforme y puede no estar adherida a la pared dentinaria. Además, el hidróxido de calcio se disuelve con el tiempo, dejando la zona como si no se hubiera colocado ningún material de protección pulpar (Goldberg *et al.*, 1984; Kunert y Lukomska-Szymanska, 2020).

2.1.2 IONÓMERO DE VIDRIO

Son materiales que promueven la mineralización y también presenta propiedades adhesivas. Liberan flúor y pueden formar sales insolubles junto con el calcio del tejido dentinario (Cedillo, 2011).

Son materiales eficaces para su uso como agente protector de capas de dentina finas en caries profundas para recubrimientos pulpaes indirectos, pero los resultados en

recubrimientos pulpaes directos son peores, ya que crean inflamación y necrosis pulpar, con ausencia de formación de puentes de dentina (Hanna *et al.*, 2020).

2.1.3 ADHESIVOS DENTINARIOS

Entre 1998 y 2008 se vio aumentado el uso de adhesivos como material de recubrimiento pulpar, sobre todo para recubrimiento pulpaes indirectos (da Rosa *et al.*, 2018). Aunque se sugirió su uso en recubrimientos pulpaes directos, los adhesivos dentinarios producen una respuesta inflamatoria inicial, seguida de reparación pulpar mediante la formación de un puente de dentina. Pero se vio que no presentaban aspectos que indicaran un pronóstico positivo, ya que son tóxicos para la pulpa, hay microfiltración debido a la contracción de polimerización, aumento de temperatura durante el fraguado y aumenta la sensibilidad, todo lo cual puede ser perjudicial para la pulpa (Silva *et al.*, 2006). No obstante, producen un sellado eficaz de la porción externa de la dentina.

3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES

3.1 *IN VITRO*

Habitualmente la biocompatibilidad de materiales es evaluada *in vitro*, analizando la capacidad del material de afectar la viabilidad, la migración, la adhesión y la morfología celular. En el caso de afectar alguno de estos aspectos de forma negativa, el material se consideraría citotóxico (de Souza-Costa *et al.*, 2014). Este tipo de pruebas se suele realizar sobre células madre dentales.

Cuando ocurre una exposición pulpar, los odontoblastos se afectan, necesitando la formación de neo-odontoblastos para la creación de una barrera protectora de la pulpa. Estos neo-odontoblastos se obtienen de células progenitoras, por lo que se diferencian a partir de células madre precursoras.

Por eso, para estudiar los materiales biocerámicos, en cuanto a su biocompatibilidad y bioactividad, se pueden utilizar células madre de la pulpa dental humana, para asemejar el estudio *in vitro* a la situación clínica. Las células madre pulpaes humanas -human

dental pulp stem cells- (HDPSC) son multipotenciales, capaces de formar dentina ectópica (Takeda *et al.*, 2008). Estas células se suelen obtener de dientes extraídos por razones quirúrgicas u ortodónticas, previo consentimiento informado de los pacientes, que deben estar sanos (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b). Es decir, se deben elegir las células de estudio en función del lugar donde va a actuar el biocerámico. En el caso de la TVP las células adecuadas para estudiar los materiales reparadores son las HDPSC.

Por el momento se han caracterizado 5 tipos de células madre dentales diferentes (Figura 2):

- HDPSC descritas anteriormente
- Células madre de dientes deciduos -*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*- (SHED)
- Células madre del ligamento periodontal -*periodontal ligament stem cells*- (PDLSC)
- Células madre de la papila apical - *stem cells from apical papilla* - (SCAP)
- Células madre del folículo dental -*dental follicle progenitor cells*- (DFPC) (Huang *et al.*, 2009).

Además, existen otras células madre (Liu *et al.*, 2015a) cercanas al diente (Figura 2) como son las células madre del hueso alveolar -*alveolar bone mesenchymal stem cells*- (ABMSC), las de la encía -*gum mesenchymal stem cells*- (GMSC) y las células madre del germen del diente progenitor -*tooth germ progenitor cells*- (TGPC).

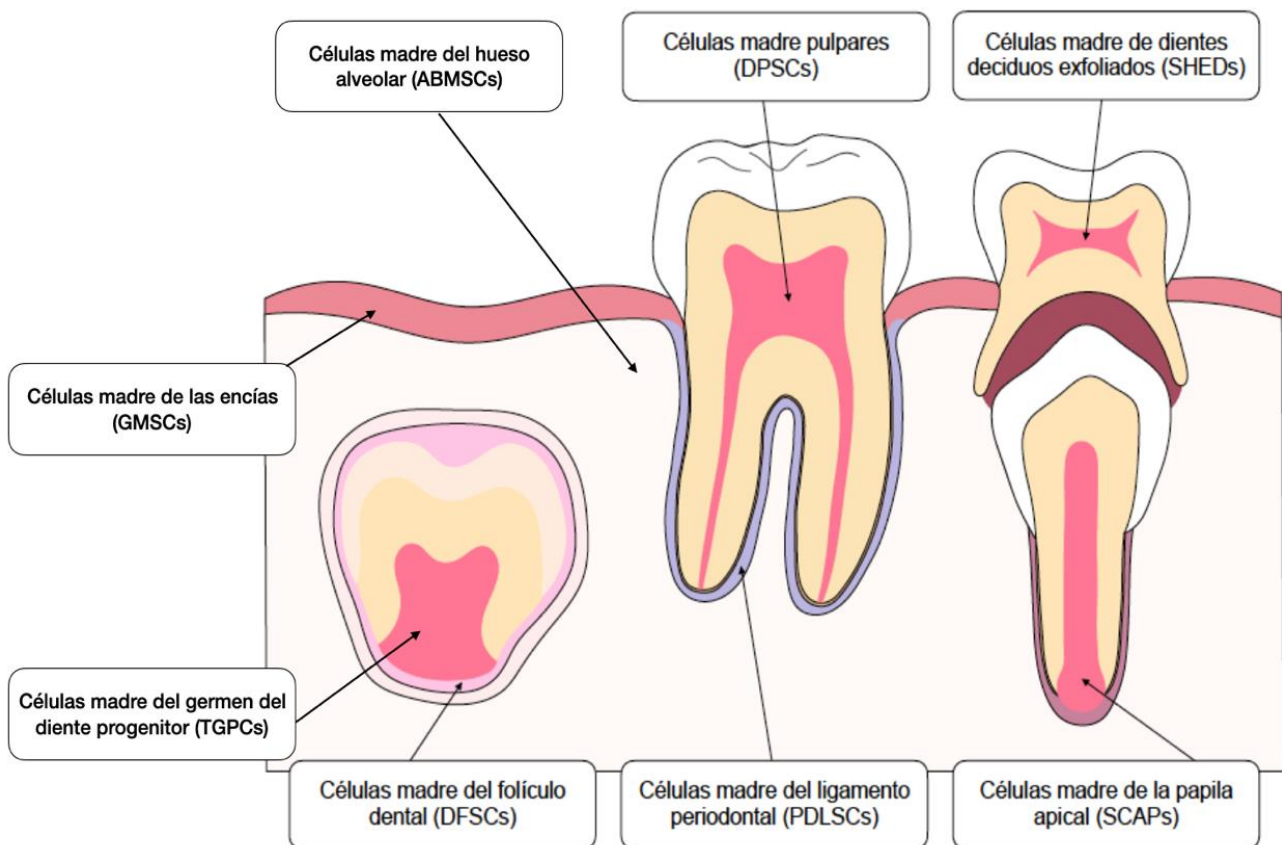


Figura 2 : Representación gráfica de la localización y clasificación de las células madre dentales, basada en el diagrama de Sanz (2022).

Para la TVP las células que interesan son las HDPSC. Estas tienen capacidad de diferenciación osteogénica, odontogénica, adipogénica, miogénica y neurogénica (Armiñán *et al.*, 2009).

Pero los materiales biocerámicos reparadores tienen otros usos para los cuales se deben utilizar otro tipo de células en la investigación, como es el caso de los tratamientos de las perforaciones radiculares, donde las células madre cercanas serán las procedentes del ligamento periodontal. Se ha visto que las PDLSC son capaces de diferenciarse en cementoblastos (Techawattanawisal *et al.*, 2007), lo que explicaría la reparación de las perforaciones.

Los materiales biocerámicos, también se pueden usar en TVP pediátrica. En este caso las células que interesan son otras, las SHED, son las que se encuentran en los pacientes pediátricos en dentición temporal. La expresión genética de las SHED es diferente a la de las HDPSC. Así, las SHED tienen genes para la formación de la matriz extracelular (Nakamura *et al.*, 2009).

Para saber que las células son verdaderamente células madre pulpaes humanas, es necesario caracterizarlas, pero antes de su caracterización se tienen que aislar las células y cultivarlas. Para ello, primero se extrae la pulpa dental de los dientes mediante una lima endodóntica. Tras la extracción se irriga con solución salina equilibrada de Hank (HBBS; Gibco BRL, Burlingame, EE. UU.) y se aplican 3mg/ml de colagenasa-A (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.) para digerirla.

Más tarde, las células obtenidas se cultivan en medios de cultivo celular con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco BRL, Burlingame, EE. UU.) y se suplementan con antibióticos -100U/ml penicilina y 100ug/ml de estreptomycin (Gibco), 1% de glutamina y suero fetal bovino al 10% (Cytvia, Massachusetts, EE. UU.). Por último, las preparaciones han de ser incubadas en condiciones específicas: a 37°C, 5% CO₂ y atmosfera húmeda (Sanz *et al.*, 2021).

3.2 IN VIVO

La forma de estudiar la biocompatibilidad de los materiales biocerámicos *in vivo* se hacen sobre animales, normalmente en ratas. Las ventajas de utilizar estos animales son el coste reducido y la facilidad de manejo, aunque animales más grandes se asemejaran más al ser humano por el tamaño de sus dientes (Song *et al.*, 2020).

Se les realizan los tratamientos de terapia vital pulpar en sus dientes, exponiendo la pulpa intencionadamente y sellando con materiales biocerámicos. Posteriormente, se espera entre 1 y 4 semanas tras el tratamiento realizado y tras este tiempo se lleva a cabo la anestesia y el sacrificio de las ratas para la realización de un análisis histológico de los dientes con los tratamientos de TVP realizados (Liu *et al.*, 2015b).

En los análisis histológicos se evalúa la biocompatibilidad del material a través de la cantidad de respuesta celular inflamatoria (ausente, leve, moderada o severa), siguiendo diferentes criterios. A mayor respuesta inflamatoria celular, más citotóxico es el material (Liu *et al.*, 2015b; Haji *et al.*, 2022).

También se suele evaluar *in vivo* la formación de tejido duro en la zona de la exposición pulpar para el análisis de la bioactividad del material (Liu *et al.*, 2015b; K. Abboud *et al.*, 2021).

4. ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

El desarrollo de nuevos materiales llamados “biocerámicos” hace necesario su conocimiento en profundidad. Aunque se use esa denominación, no todos son cementos hidráulicos de silicato de calcio que es lo que convierte a un material en biocerámico, de ahí la importancia de estudiarlos, no dando por hecho que cumplen las propiedades que caracterizan a este tipo de materiales, sobre todo cuando se indican para tratamientos de TVP, en los que se requiere que esas propiedades funcionen adecuadamente para que el tratamiento sea exitoso y se logre mantener la vitalidad pulpar sin llegar a realizar el tratamiento de conductos.

Cuando los materiales llevan más tiempo en el mercado, suele existir mayor evidencia científica acerca de ellos, pero cuando un material es nuevo no ocurre lo mismo. Este es el caso del NeoPutty (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, EE. UU.) un material reparador del cual solo había un artículo publicado hasta el momento de la decisión de estudiar el material (según nuestro conocimiento), el cual comparó este material con el Endosequence BC RRM Putty (Braseler USA dental instrumentation, Savannah, EE.UU.), mostrando que el primero era menos citotóxico (Sun *et al.*, 2021). Aunque recientemente, sí se han publicado otros artículos acerca de este material, pero ninguno sobre sus efectos biológicos en la pulpa dental, donde se usa.

Este material es la nueva versión del NeoMTA Plus (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, EE. UU.), pero premezclado. Acerca del NeoMTA Plus sí que hay más publicaciones que presentan estudios sobre él, ya que es un material que lleva varios años en el mercado. La mayoría de las publicaciones al respecto están de acuerdo en que el

NeoMTA Plus es un material citocompatible con buenas propiedades biológicas sobre las HDPSC (Birant *et al.*, 2021; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b; Tomas-Catala *et al.*, 2018; Tomás-Catalá *et al.*, 2017). Pero antes de aparecer el NeoPutty, se intentó mejorar el NeoMTA Plus, ofreciendo una versión intermedia llamada NeoMTA 2, que también se presentó en formato polvo-líquido y que pretendía mejorar algunas características y propiedades de su versión anterior (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b).

A la hora de estudiar materiales nuevos es importante compararlos con materiales que se han utilizado mucho a lo largo de los años para ese mismo tratamiento. Es el caso de MTA Angelus (Angelus, Londrina, Brasil), el cual es una variedad que intentó mejorar el tiempo de fraguado del primer MTA (Loma Linda *University*, Loma Linda, EE. UU.) que salió al mercado. Este material apareció en 2001, por lo tanto, presenta mayor cantidad de literatura publicada, pero esa evidencia publicada no está realizada sobre HDPSC.

Según la literatura publicada el MTA Angelus es biocompatible (Bortoluzzi *et al.*, 2015; Khedmat *et al.*, 2021; Öncel Torun *et al.*, 2015; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021a). Pero, aun así, existen discrepancias entre los diferentes estudios acerca del grado de citocompatibilidad del MTA Angelus, al compararlo con otros materiales, por eso su estudio sigue siendo pertinente.

JUSTIFICACIÓN

Existen situaciones en las que se necesitan materiales que sean capaces de entrar en contacto con la pulpa dental y, para ello, es necesario que sean inocuos a la salud de ésta, siendo biocompatibles.

Es muy común en la práctica clínica diaria que, accidentalmente, se exponga la pulpa, ya sea por algún traumatismo, durante el tratamiento de una lesión cariosa o por cualquier otro tratamiento dental. También suele ocurrir que, tras la eliminación del tejido cariado, quede poco tejido dentinario y la pulpa se encuentre cerca. Cuando estas mismas situaciones ocurren en un diente con ápices inmaduros, para que el diente siga formándose correctamente tanto en longitud como en grosor, se debe conservar la pulpa y tratar que ésta, se encuentre en un estado de salud.

Por otro lado, en casos de dientes inmaduros con ápices cerrados, siempre va a ser más conservador intentar mantener la vitalidad pulpar en los casos en los que sea posible, y no realizar directamente el tratamiento de conductos.

Para realizar todo este tipo de tratamientos pulpares vitales existe una variedad de materiales destinados a esa función. En general los cementos biocerámicos han demostrado características biológicas apropiadas, pero, debido a la aparición de materiales nuevos, es interesante estudiarlos para ver en qué aspectos mejoran a los comúnmente usados (o a su versión anterior) y es importante saber qué material es el más indicado en cada una de estas situaciones, para conseguir un mejor resultado en el tratamiento.

En este sentido, los nuevos materiales biocerámicos muestran características muy atractivas, pero, por su novedad y reciente desarrollo, existe poca información y evidencia científica sobre sus propiedades y su comportamiento clínico.

Es posible que los materiales nuevos mejoren en ciertos aspectos a los anteriores, pero empeoren otros. Para saber esto con certeza es necesario estudiarlos y tener claras las ventajas e inconvenientes que presentan cada uno de ellos en función de las indicaciones y, así, ser conscientes de ello a la hora de utilizarlos. Estas diferencias suelen deberse a la

presencia de aditivos o modificaciones en la composición del material, que pueden llevar a cambios en sus propiedades y en su comportamiento clínico. Por ello es necesario el estudio independiente de cada material que aparece nuevo en el mercado.

Los ensayos *in vitro* son pruebas preliminares por las que ha de pasar un material antes de realizar análisis sobre animales o en estudios clínicos en humanos

OBJETIVOS

Debido a lo anteriormente expuesto, los objetivos de la presente tesis doctoral son los que se describen a continuación.

Objetivo general:

Determinar *in vitro* la biocompatibilidad de un nuevo material biocerámico (NeoPutty) en contacto con la pulpa dental y compararlo con otros materiales del mismo grupo (NeoMTA Plus y MTA Angelus)

Objetivos específicos:

- Caracterizar la ultraestructura y la composición de los materiales estudiados.
- Establecer las características biológicas de los materiales biocerámicos analizados cuando se relacionan con células madre de la pulpa dental humana.
- Comparar la biocompatibilidad de los de los materiales investigados.

HIPÓTESIS

1. Hipótesis de investigación (H_i)

Los materiales biocerámicos estudiados son biocompatibles para la pulpa dental humana.

2. Hipótesis nula (H_0)

Los materiales de uso endodóntico basados en silicatos hidráulicos, indicados para la TVP, entre ellos el NeoPutty, son materiales citotóxicos para las HDPSC.

MATERIAL Y MÉTODO

En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica para saber el estado actual de la literatura científica y más tarde se realizaron una serie de pruebas de biocompatibilidad sobre los 3 materiales biocerámicos seleccionados sobre HDPSC.

1. Comité de ética

Las pruebas realizadas en esta tesis doctoral fueron aprobadas previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (ID: 2199/2019), donde radica el laboratorio donde se han realizado las pruebas de biocompatibilidad.

2. Revisión bibliográfica

Para saber el estado actual en la evidencia científica de los 3 materiales objeto de esta investigación, se siguió el siguiente protocolo:

2.1 Se realizaron búsquedas avanzadas individuales en las siguientes bases de datos: Embase, Pubmed, Scopus y Web of Science.

2.2 La última actualización en diciembre de 2023.

2.3 Dicha búsqueda incluyo los siguientes términos: `silicate`, `bioceramic`, `human dental pulp cell`, `HDPC`, `cytocompatibility`, `biocompatibility`, `NeoPutty`, `NeoMTA Plus`, `MTA Angelus`, `White MTA` combinados con los conectores booleanos AND y OR.

2.4 Los resultados de la búsqueda en cada base de datos se exportaron a un *software* de gestión de referencias (Mendeley; Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos) y se eliminaron los resultados duplicados manualmente.

2.5 Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Estudios *in vitro* que utilizaran células madre pulpaes humanas
- Que el MTA utilizado fuera MTA Angelus.

2.6 Los criterios de exclusión fueron:

- Artículos que utilizaron como MTA el ProRoot MTA

- Revisiones sistemáticas
- Artículos sobre la bioactividad de los materiales únicamente.

Los artículos seleccionados en esta fase fueron elegidos para la posterior lectura del artículo completo.

3. Obtención de las HDPSC

Las HDPSC se aislaron de terceros molares impactados extraídos (edad 15-25; n=10) obtenidos de pacientes, previo consentimiento informado, a través de la Facultad de Odontología de la Universidad de Murcia, y también se obtuvieron consentimientos informados de cada donante para el uso del tejido pulpar dental.

Para la caracterización de las células madre se sigue la *guía Mesenchymal and Stem Cell Comitte de la International Society for Cellular therapy* (ISCT), que indica que las células madre deben de presentar expresión de los siguientes antígenos de superficie específicos: CD105, CD73 y CD90 y no presentar los siguientes: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA class II (Dominici et al., 2006).

Para ello, primero se extrajo la pulpa dental de los dientes mediante una lima endodóntica. Tras la extracción se irrigó con solución salina equilibrada de Hank (HBBS; Gibco, Burlingame, EE. UU.) y se aplicaron 3mg/ml de colagenasa-A (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.) para digerirla. Más tarde, las células obtenidas se cultivaron en medios de cultivo celular con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco BRL, Burlingame, EE. UU.) y se suplementaron (Figura 3) con antibióticos -100U/ml penicilina y 100ug/ml de estreptomina- (Gibco), 1% de glutamina y suero fetal bovino (Figura 4) al 10% (Cytiva, Massachusetts, EE. UU.). Por último, las preparaciones fueron incubadas en condiciones específicas: a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda (Sanz *et al.*, 2021) en frascos de cultivo (Figura 5).

Los cultivos se utilizaron para las pruebas cuando se llegó al 80% de confluencia, y las células de los pasajes 2 hasta el 4 se utilizaron en este estudio. Los pasajes son el número de veces que se han cambiado de recipiente las células para posibilitarles su crecimiento, cambiándolas a un frasco más grande o diluyéndolas para que quepan en otro del mismo

tamaño. Por lo tanto, las células seleccionadas en este estudio habían sido cambiadas de frasco entre 2 y 4 veces.

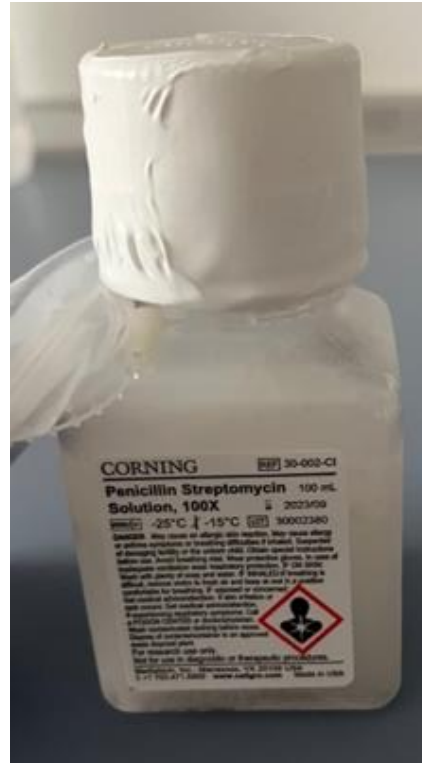


Figura 3: Antibióticos -100U/ml penicilina y 100ug/ml de estreptomicina-



Figura 4: Suero Fetal Bovino

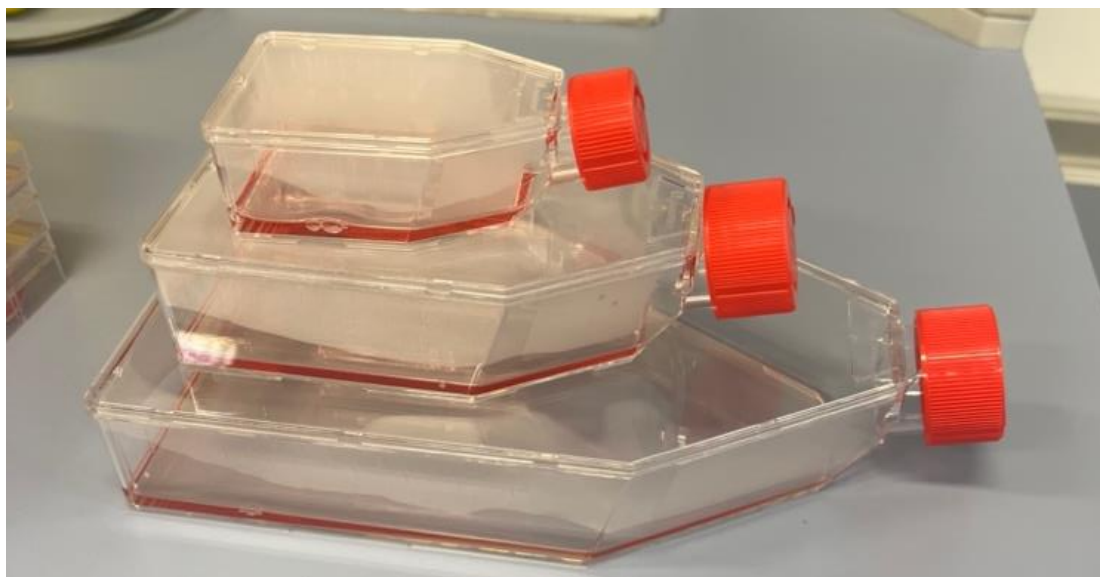


Figura 5: frascos de cultivo celular

4. Materiales estudiados y preparación de la muestra

MTA (Angelus, Londrina, Brasil), NeoMTA Plus (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, EE. UU.), y NeoPutty (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, EE. UU.) fueron los materiales estudiados.

Se prepararon muestras de los materiales con un diámetro de 5 mm y un grosor de 2 mm (Figura 6) usando como molde una jeringa de 5 mL. Se dejaron reposar para su fraguado a 37 °C en un ambiente de un 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 48 horas.

Una vez fraguado el material, las superficies de las muestras se esterilizaron durante 20 minutos con luz ultravioleta.

Los datos de los materiales se representan en la tabla 1.

Las concentraciones finales fueron 1/1, 1/2 y 1/4.



Figura 6: Jeringa para la realización de los discos de cada material

Materiales	Fabricante	Composición	Número de Lote
NEO MTA Plus	NuSmile Ltd (Avalon Biomed). Bradenton, EE. UU.	Polvo: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de tantalio y menor cantidad de sulfato de calcio y aluminato tricálcico. Líquido: Agua y polímeros propios	2019091001
NEO PUTTY	NuSmile Ltd (Avalon Biomed). Bradenton, EE. UU.	Tantalita, silicato tricálcico, aluminato cálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, sulfato cálcico, liquido orgánico propio y estabilizadores	2020071501
MTA Angelus	Angelus. Londrina, Brasil.	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de calcio, tungstato de calcio.	101752

Tabla 1: Composición resumida de NeoMTA Plus, NeoPutty y MTA Angelus, número de lote de cada material utilizado y fabricante

5. Metodología

5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DIFRACCIÓN DE RAYOS X (SEM-EDX)

Los discos de los materiales que se iban a estudiar median 2 mm de alto y 5 mm de diámetro.

Se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos ($n_i=6$ muestras/grupo). Cada muestra de material se colocó sobre platinas de latón y se revistieron con una pulverización de 5 mm de oro, que es más conductivo y permite obtener imágenes de mayor resolución.

Por último, se tomaron imágenes de la ultraestructura de cada material.

Se seleccionaron 3 muestras que fueron recubiertas con carbono, a diferencia del oro es menos excitable evitando el enmascaramiento de otros elementos. Las superficies se analizaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM Jeol 6100 EDAX, Tokio, Japón), que tiene acoplado un sistema de espectrometría de dispersión de rayos X (EDX; Oxford INCA 350 EDX, Abingdon, UK) a 20 kV.

5.2 ENSAYO MTT

La evaluación de la actividad metabólica de las HDPSC tratadas con eluidos de los materiales (1:1; 1:2; 1:4), se realizó usando un ensayo colorimétrico (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2013) con bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich, Burlington, EE. UU.) (Figura 7).

Por un lado, se prepara el MTT, el cual se diluye y añade a un medio de cultivo, se filtra esa disolución de MTT y se cubre con papel de aluminio para evitar el contacto del reactivo MTT con la luz.

Por otro lado, anteriormente se ha sembrado HDPSC en pocillos con medio de cultivo, donde encontramos entre 1500 y 4000 células por pocillo. Estas células se siembran de forma similar en cada pocillo, mediante una pipeta multicanal que recoge las células con el medio de cultivo y coloca la misma cantidad en todos los pocillos. Seguidamente se deja 24h para permitir el crecimiento celular y la adhesión de estas al pocillo.

El procedimiento consiste en retirar el medio de cultivo de las células que se encuentran en los pocillos y añadir la disolución obtenida previamente de MTT con medio de cultivo. Se vuelve a tapar con papel de aluminio y se deja incubar entre 2 y 4 horas a 37° C. Una vez incubado se retira el sobrenadante de MTT, se añade 100 µL de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Burlington, EE. UU.) (Figura 8) y se agita durante 1 minuto con un agitador orbital.

Más tarde, para evaluar la producción de formazán se transfirieron los pocillos al espectrofotómetro (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, EE. UU.) (Figura 9). La

actividad metabólica se examinó a las 24, 48 y 72 horas de cultivo a una longitud de onda de 570 nm.



Figura 7: Reactivo MTT

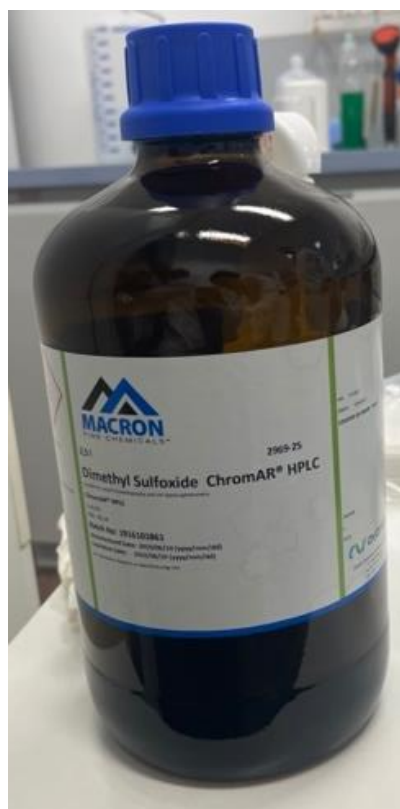


Figura 8: Dimetilsulfóxido

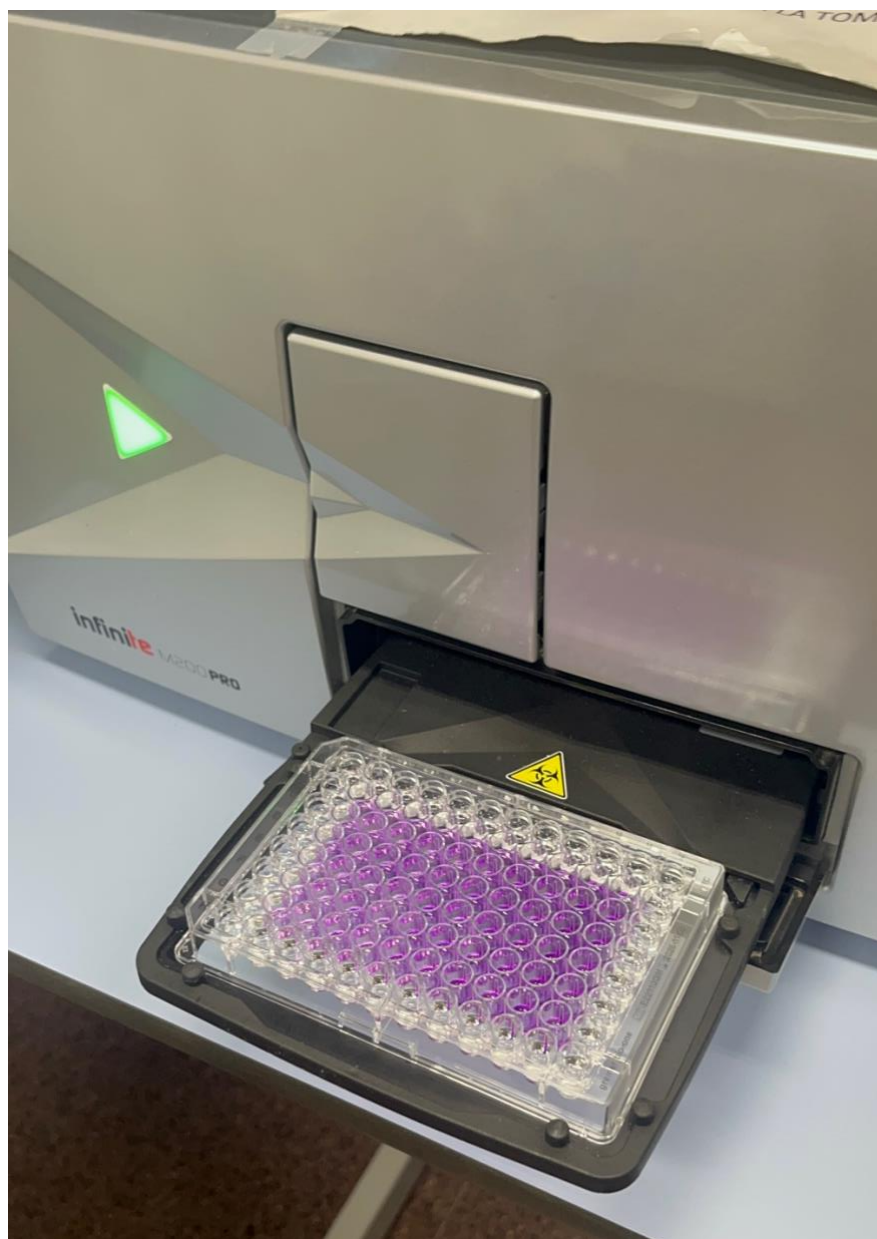


Figura 9: Placa de 96 pocillos introduciéndose en el espectrofotómetro

5.3 EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR (CURACIÓN DE LA HERIDA)

El objetivo de esta prueba es ver la velocidad en la que las células son capaces de moverse hacia una zona en la que se ha creado una herida para cerrarla, creando contactos célula-célula.

Para ello las HDPSC de los pases 2-4 se cultivaron a una concentración de 2×10^5 células en una placa de 12 pocillos. Cuando se alcanzó la confluencia celular, se realizó la herida en las placas de cultivo con la punta de una pipeta estéril (Figura 10) realizando una forma de cruz. Tras la realización de la herida, se retira el medio de cultivo, se lavó con PBS (Tampón fosfato alcalino) para retirar cualquier fragmento celular que haya quedado tras la realización de la herida y se colocaron los extractos de los materiales, en las diferentes diluciones (1:1, 1:2, 1:4). Excepto en el caso del grupo control que se añade medio de cultivo (células sin material biocerámico). Todos los casos se realizan por triplicado.

Más tarde se tomaron imágenes (Figura 11), buscando una zona representativa de la herida, desde el momento de realización de la brecha (0 horas), cada 24 horas, durante 72 horas usando un microscopio de contraste de fases. Se utilizó el *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, EE. UU.) para medir el porcentaje de área de herida abierta en cada intervalo de tiempo, en comparación con el área en el momento de realizar la herida del mismo pocillo. Intentando seleccionar la misma zona de la herida en los diferentes intervalos de tiempo, para que la medida sea más exacta. Se evaluaron 4 puntos estandarizados.



Figura 10: Micropipetas

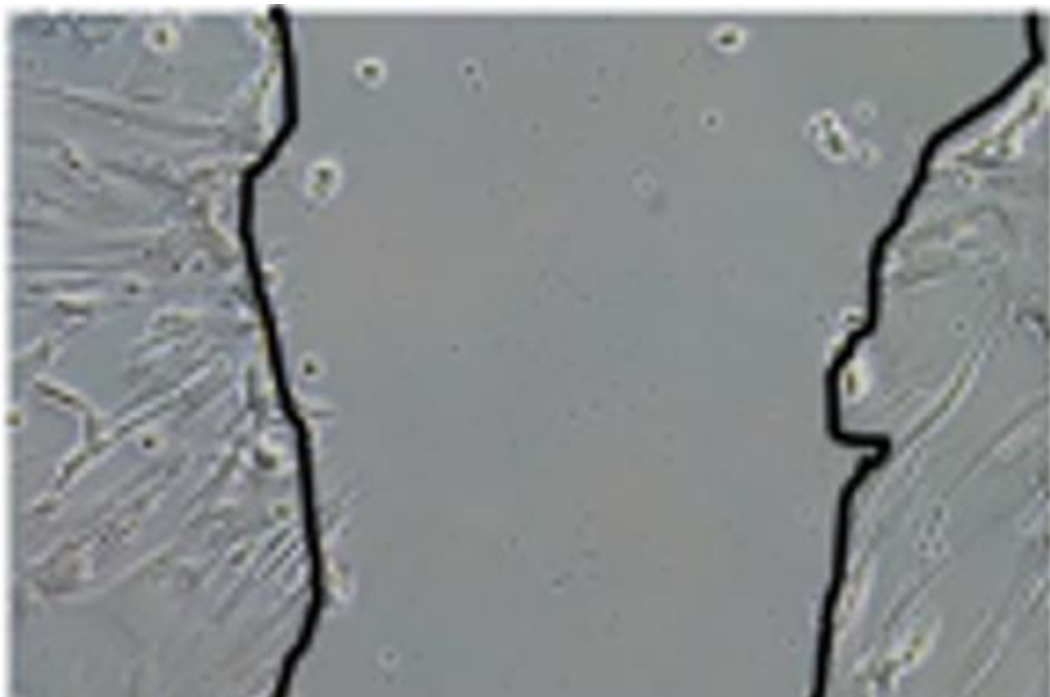


Figura 11: Ejemplo de cómo se ven los dos extremos de la herida a las 0 horas

5.4 MORFOLOGÍA CELULAR

Se sembraron células en cubreobjetos de vidrio que permitían que estas se adhirieran y extendieran, después de 24 horas se aplicaron las diferentes diluciones de los materiales a estudiar cultivándose materiales durante 72h a 37°C. En el estudio se incluyó un grupo control sin material. Se retiró el medio de cultivo y lavó con PBS.

Posteriormente se fijaron las células mediante la aplicación de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, y se lavaron 3 veces con PBS.

Seguidamente se permeabiliza la membrana celular con 0,25% de Triton X100 (Sigma–Aldrich, St. Louis, EE. UU.) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se repite el lavado con PBS por triplicado.

A continuación, los filamentos de actina del citoesqueleto se tiñeron con faloidina (Invitrogen™ AlexaFluor™594-labeled phalloidin) (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE. UU.) (Figura 12) durante unos 30 minutos, en agitación, se repite el lavado con PBS 3 veces y los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenidildol (DAPI) (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE. UU.) (Figura 13) a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Por último, se capturaron imágenes representativas con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica, Wetzlar, Alemania).

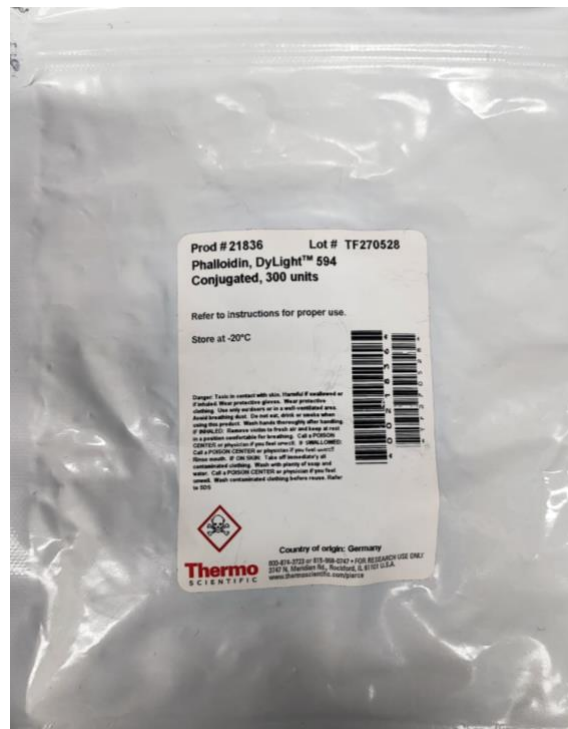


Figura 12: Faloidina

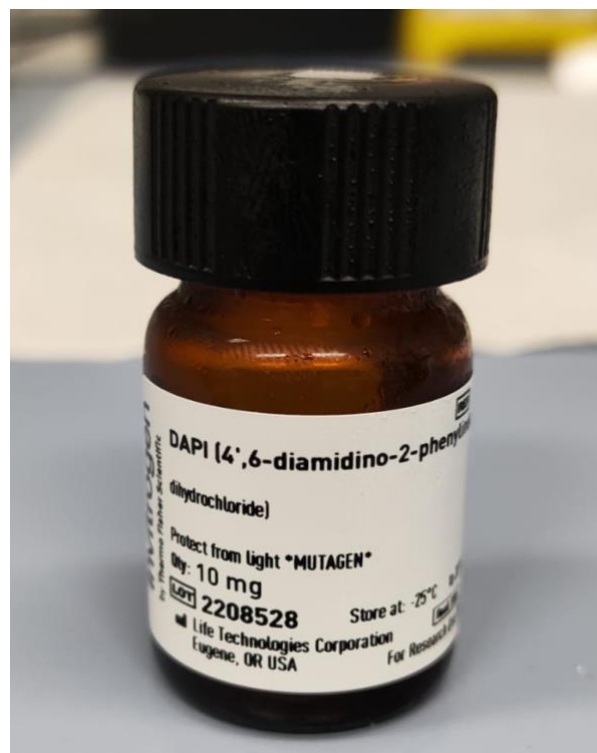


Figura 13: DAPI

5.5 ADHESION CELULAR

Se cultivaron HDPSC en la superficie de los materiales durante 72h, entre 70000 y 100000 células. Más tarde el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con una solución de PBS. Después las células adheridas a las muestras se fijaron con 3% de glutaraldehído durante 30 minutos a 4 ° C.

Seguidamente se trataron con soluciones de alcohol, aumentando la concentración 30%, 50%, 70%, 90%, y 100% para deshidratar las muestras.

Tras cubrir las muestras con oro (Figura 14), las células se observaron bajo un microscopio electrónico de barrido (SEM) y se tomaron imágenes de forma aleatoria en diferentes áreas de cada muestra a 100, 300, y 1500 aumentos.

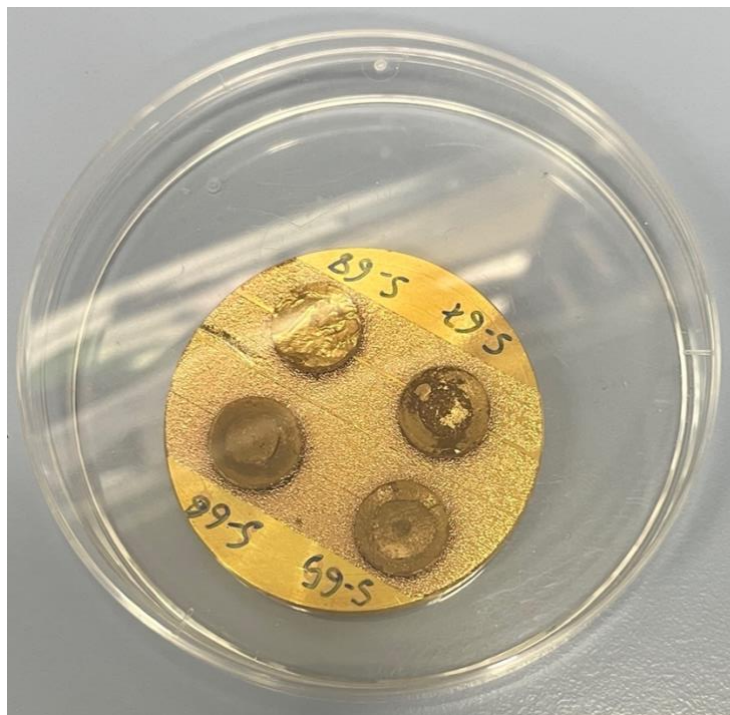


Figura 14: Discos recubiertos de oro

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las pruebas se realizaron al menos por triplicado.

Los datos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. Los datos cuantitativos se analizaron estadísticamente con tests ANOVA de múltiple comparación con modificación Turkey usando el programa SPSS (IBM Analytics, versión 21, Chicago, EE. UU.).

Las diferencias fueron identificadas de la siguiente manera: no significativas (NS) $P > 0.05$; significativas $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$, y $***P \leq 0.001$.

RESULTADOS

1. Resultado de la búsqueda bibliográfica

Tras realizar la búsqueda bibliográfica y la selección de los artículos siguiendo nuestros criterios de inclusión y exclusión, se obtuvieron, inicialmente, 17 artículos (Figura 15), aunque esta búsqueda se ha ido actualizando durante la realización de la tesis doctoral.

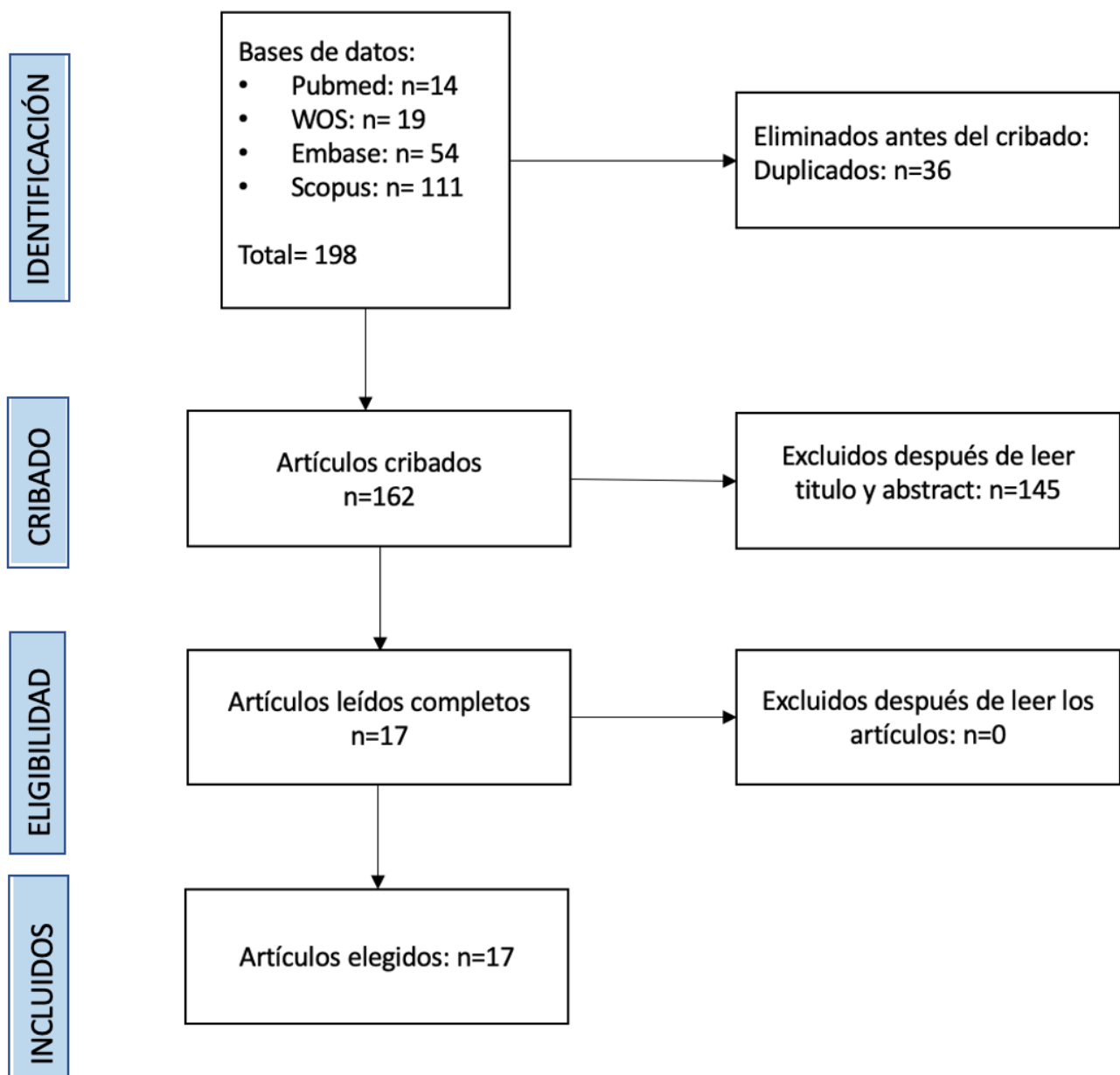


Figura 15: Diagrama de flujo representando la elección de los artículos.

2. Análisis SEM-EDX

Con esta prueba se evidencian los elementos químicos que presentan los materiales (Figura 16). Se obtuvieron valores mayores de Ca^{2+} en NeoMTA Plus que en NeoPutty o MTA Angelus, mientras que NeoPutty fue el que mayor cantidad de Tantalio (Ta^{5+}) presentaba; NeoMTA Plus también presentaba Ta^{5+} , pero de forma moderada. Por otro lado, las concentraciones de C, O y Si fueron similares en todos los grupos.

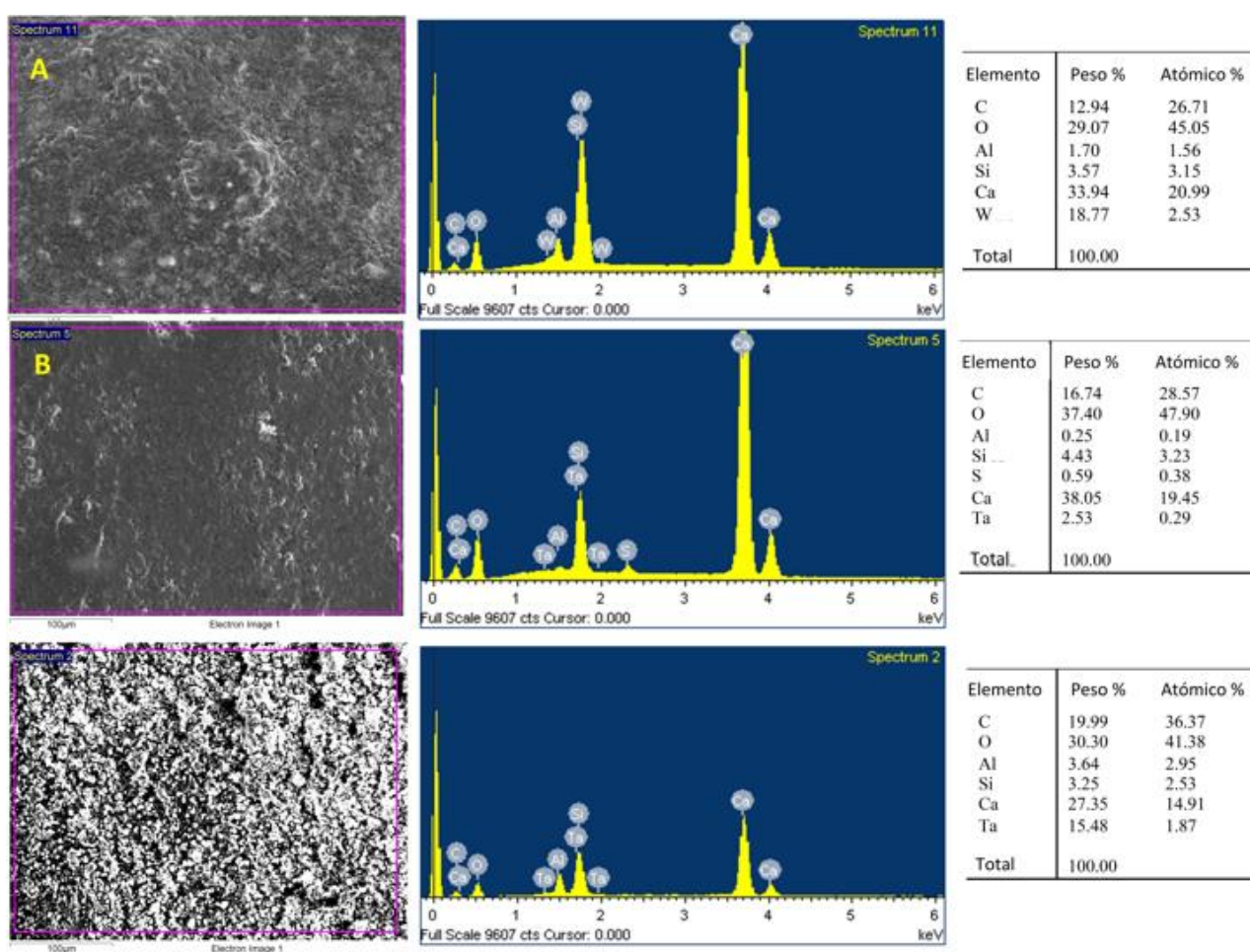


Figura 16: Propiedades superficiales y composición de MTA Angelus (A), NeoMTA Plus (B) y NeoPutty (C). La primera columna muestra micrografías de cada material bajo un microscopio electrónico de barrido (SEM), la segunda columna se representa los gráficos del EDX con los picos detectados. La tercera columna clasifica la lista de los elementos detectados en cada material y su representación porcentual, así como el porcentaje de su peso en el conjunto del material.

3. Ensayo MTT

En el ensayo MTT, como podemos ver en la figura 17, la viabilidad celular del grupo control se mantuvo en todas las condiciones. En cambio, a las 24 horas, NeoMTA Plus en dilución 1:1 y 1:2 presentó una disminución significativa de viabilidad celular, respecto al grupo control ($p < 0,001$; $p < 0,05$, respectivamente). A las 48 horas, NeoMTA Plus no diluido presentó un ligero descenso significativo de la viabilidad celular ($p < 0,05$). Por último, a las 72 horas, en presencia de NeoPutty sin diluir, las células madre pulpares humanas presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular ($p < 0,001$), mientras que tanto en presencia de dilución 1:2 como en la de 1:4 de NeoPutty la viabilidad celular es similar a la del grupo control.

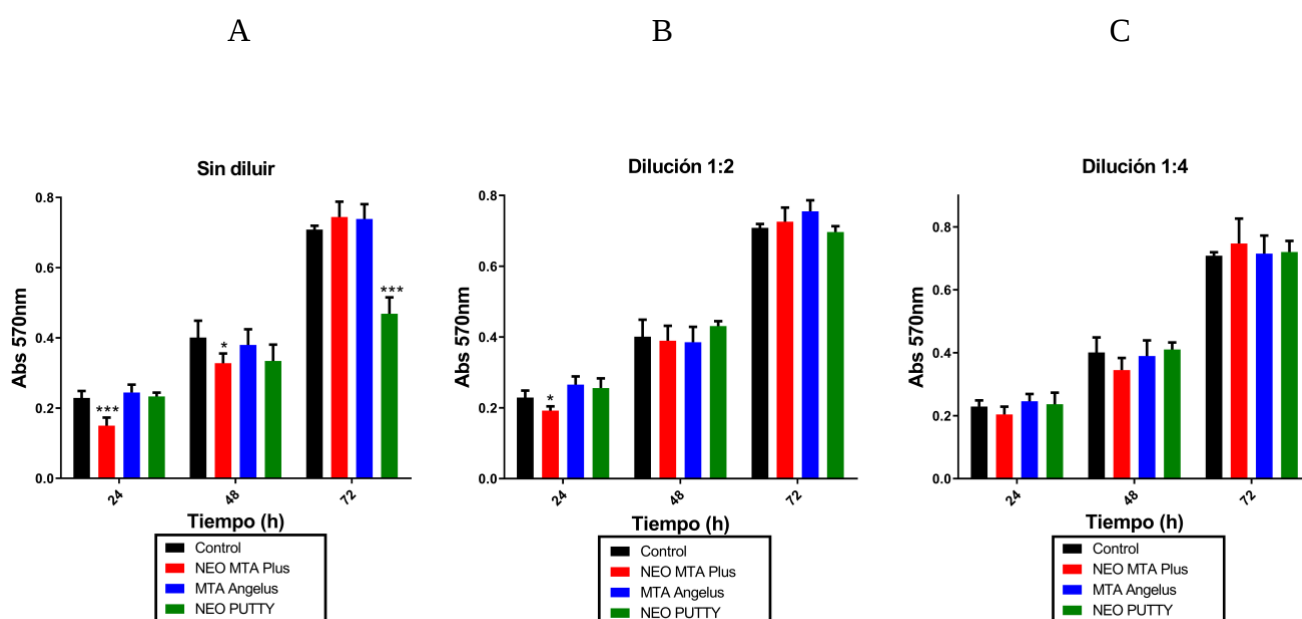


Figura 17: Formación relativa de formazán de células madre pulpares humanas expuestas a distintas diluciones de NeoMTA plus, MTA Angelus y NeoPutty, además del medio de cultivo (control) durante 24, 48 y 72 horas. (a): no diluido, (b) diluido 1:2, (c) diluido 1:4. (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$, y *** $P \leq 0,001$.)

4. Migración celular

En cuanto a la migración celular (Figura 18) los 3 materiales llevaron a la curación de la herida a las 72 horas, sin diferencias significativas en comparación con el grupo control, ya que se observa la herida completamente cubierta por células.

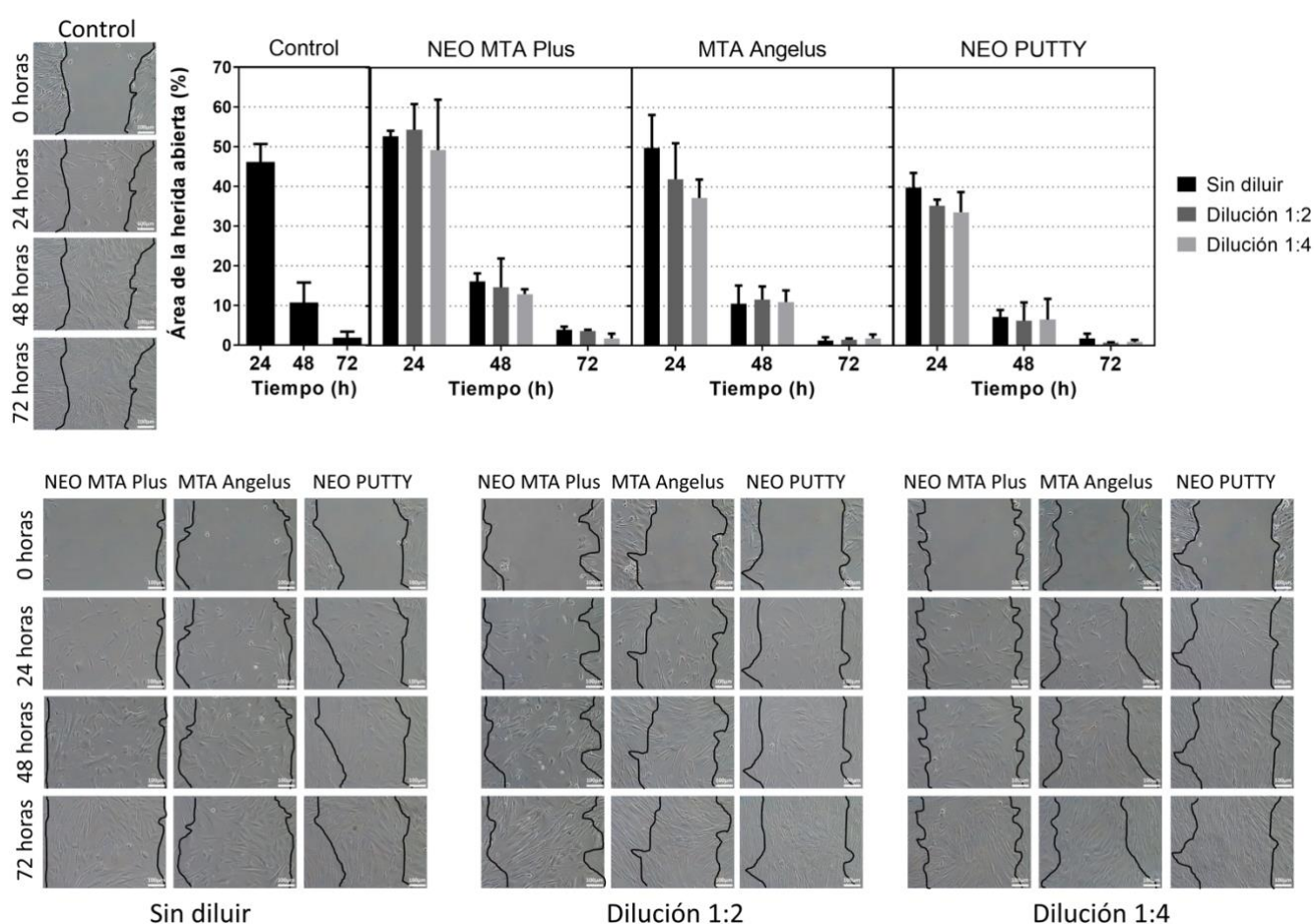


Figura 18: Para evaluar la capacidad de migración celular en la simulación de un cierre de herida in vitro, se realizó un ensayo de curación de la herida. Las imágenes muestran fotografías tomadas a diferentes horas del arañazo realizado y del área recubierta por células. El área no cubierta por células, después de la exposición a diferentes diluciones de los materiales está representada en el gráfico de barras a las 24h, 48h y 72h. (*p < 0,05; **p < 0,01.)

5. Morfología celular

La tinción con faloidina mostró que, en presencia de los materiales estudiados, las HDPSC presentaban una buena morfología celular, similar a la del grupo control, manifestando una disposición regular de filamentos de actina demostrando buenas propiedades contráctiles de estas (Figura 19).

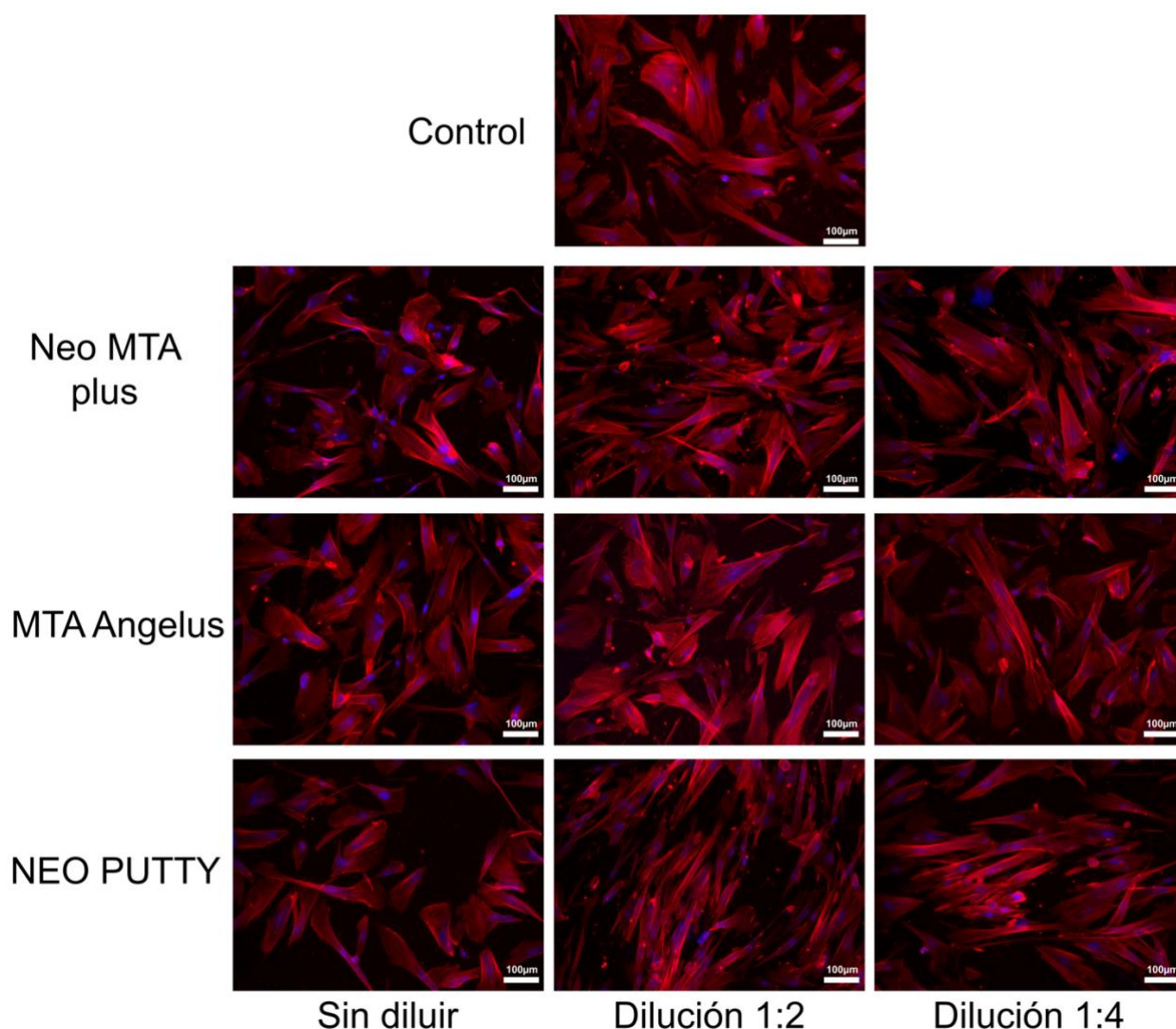


Figura 19: Se utilizó la microscopía confocal para analizar los cambios en el citoesqueleto de actina de las células madre pulpareas humanas expuestas a los materiales en diferentes diluciones. Las imágenes muestran actina-F con Faloidina CruzFLuor 594-conjugado y los núcleos con DAPI (azul). Escala 100 μm y magnificación x100

6. Adhesión celular

Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido mostraron que los materiales estudiados no presentaban efectos citotóxicos, ya que se vio como las células se adherían correctamente a la superficie de los materiales, interconectando entre si (Figura 20).

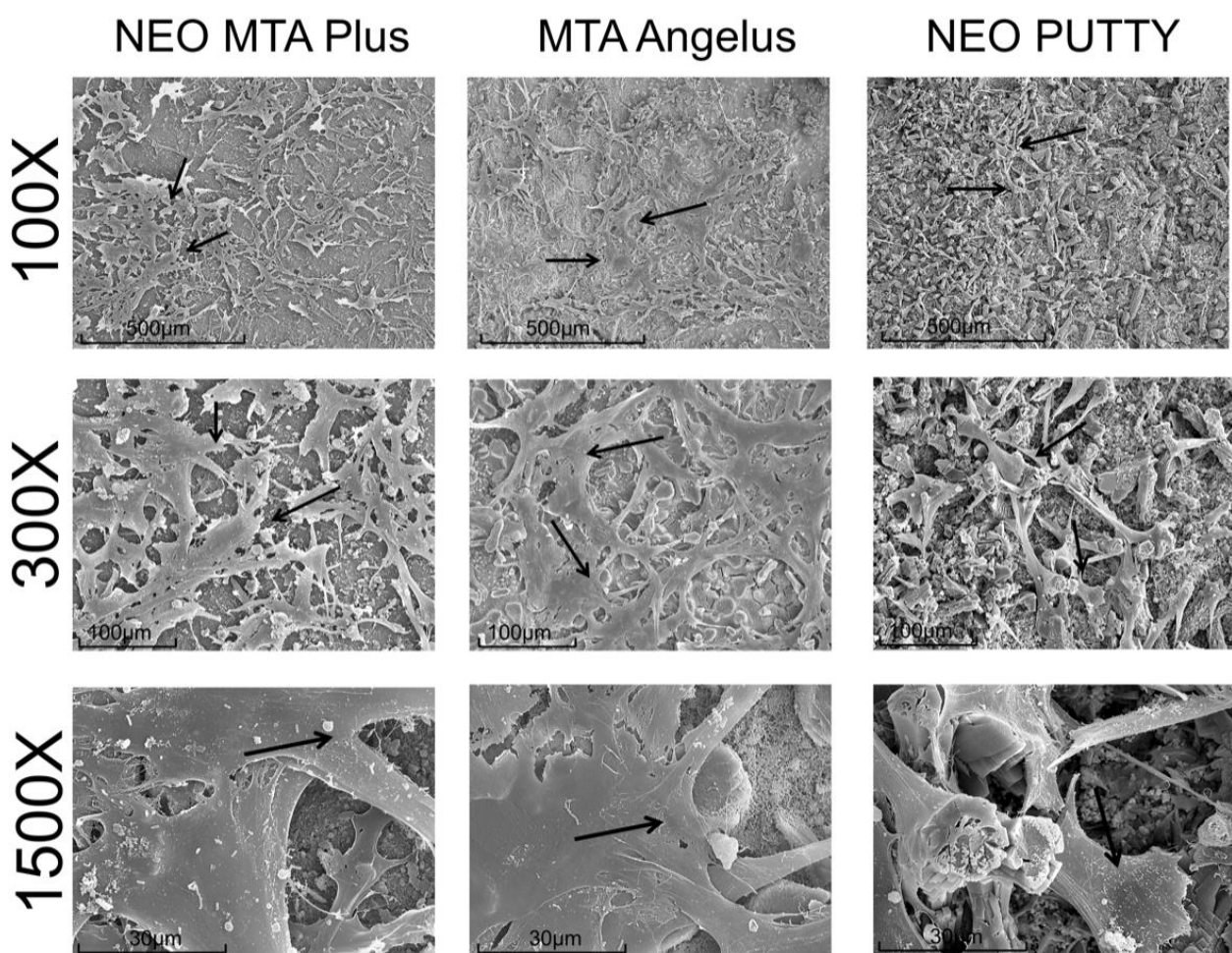


Figura 20: Imágenes de HDPSC cultivadas junto a los materiales estudiados durante 72h. Magnificaciones de 100x, 300x y 1500x. Las barras de escala a 500 μm, 100 μm, and 30 μm.

DISCUSIÓN

Los materiales biocerámicos se utilizan actualmente en TVP, reparaciones de perforaciones, apicoformación y otros tratamientos (Pedano *et al.*, 2020). Sin embargo, la literatura presenta variabilidad en la manera de comprobar el comportamiento biológico de dichos materiales (Widbiller *et al.*, 2016).

El propósito de esta tesis doctoral fue analizar la citocompatibilidad, de un nuevo material a base de silicato de calcio, que contiene óxido de tantalio (Ta_2O_5), conocido como NeoPutty y comparar sus propiedades biológicas con las que presentan MTA Angelus y NeoMTA Plus.

Los materiales utilizados en la TVP precisan presentar biocompatibilidad, sin afectar la viabilidad celular de las células pulpares. El estudio de la biocompatibilidad de materiales, cuya función es la terapia vital pulpar, es fundamental, ya que entran en contacto con tejidos vivos (Collado-González, *et al.*, 2017c), además del interés del análisis de su eficacia. Por esa razón se seleccionaron HDPSC para las pruebas *in vitro*. Se descartó el uso de células inmortalizadas porque están modificadas genéticamente y podrían presentar respuestas tóxicas clínicamente inapropiadas a los compuestos, no simulando la realidad (Anson *et al.*, 2011).

Existen algunos estudios previos sobre la citotoxicidad de materiales liberadores de iones en células humanas diferentes a las que se han utilizado en esta tesis doctoral, por ejemplo, células de la papila apical (Sequeira *et al.*, 2021) y células endoteliales (De Deus *et al.*, 2005), mientras que otros materiales se han probado en células animales (Silva *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2018; Hoshino *et al.*, 2021), incluso en dientes animales extraídos tras la colocación del material estudiado en contacto con la pulpa dental del animal (Abboud *et al.*, 2021). Pero utilizar HDPSC permite evaluar a los nuevos materiales biocerámicos con células de estirpe pulpar humana, y donde van a estar en contacto estos materiales cuando sean empleados en la actividad clínica (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2019).

Sin embargo, hasta donde sabemos, los efectos potencialmente tóxicos de NeoPutty en las células madre humanas presentan muy poca evidencia científica ya que solo hay un

estudio publicado sobre ello, el cual solo realiza una prueba de citotoxicidad sobre este material (Sun *et al.*, 2021).

1. DISCUSIÓN SOBRE METODOLOGÍA

En esta investigación, los materiales se utilizaron tras su completo fraguado para crear una situación más controlada y basándose en estudios anteriores de biocompatibilidad sobre otros materiales biocerámicos (Collado-González *et al.*, 2017a; Tomas-Catala *et al.*, 2018; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2022), pero el estudio de estos mismos materiales sin fraguar sería interesante a la hora de predecir la respuesta inicial tras la colocación del material en contacto con el tejido pulpar, donde el material no ha fraguado todavía (Oh *et al.*, 2020). Khedmat *et al.*, (2021), comparó MTA Angelus en fresco y fraguado y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la citotoxicidad de ambos grupos. Este estudio se realizó sobre HDPSC y sobre PDLSC. Con lo cual, según este estudio, MTA Angelus no varía su biocompatibilidad este fraguado o no.

Se utilizaron diferentes diluciones de los materiales, siguiendo lo realizado por otros autores anteriores (Collado-González *et al.*, 2017a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b). Esto ofrece una simulación más auténtica de la realidad ya que puede ocurrir que haya diferentes espesores de dentina o diferentes tamaños de exposiciones pulpares (Benetti *et al.*, 2019).

Las células madre pulpares se obtuvieron de terceros molares impactados, extraídos por razones quirúrgicas en pacientes sanos de entre 15-25 años, tras firmar un consentimiento informado, para estandarizar las muestras. Pudimos controlar factores condicionantes como son la edad (Kellner *et al.*, 2014), y el método de cultivo celular (Huang *et al.*, 2006). Pero existen diversos factores que pueden condicionar a las células pulpares aun intentando controlar los factores posibles. Los factores externos que pueden afectar los resultados son la afectación periodontal del diente (Sun *et al.*, 2014) y el método de extracción (Huang *et al.*, 2006).

Como grupo control se decidió utilizar las mismas células madre que se iban a utilizar en contacto con los materiales, pero en este caso sin ningún material. Ya que así se facilitaría la comparación de los cambios producidos por los materiales sobre las células, pudiendo ver cuál es la situación de normalidad de esas células. En artículos anteriores se ha realizado de la misma manera (Collado-González *et al.*, 2017a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b).

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1 ANÁLISIS SEM-EDX

En estudios previos se ha visto que los cambios (aun siendo pequeños) en la composición de los materiales, ya sea en la incorporación de compuestos diferentes, el cambio de aditivos o el tipo de radioopacificante, pueden llevar a un cambio en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del material (Pedano *et al.*, 2018).

En el análisis de elementos se vio que el material que mayor cantidad de calcio contenía fue el NeoMTA Plus, exactamente un 38,05% y además era el material que mayor cantidad de oxígeno presentó, siendo esta un 37,4% del total. Un estudio anterior que realizó la misma prueba en NeoMTA Plus, comparándolo con una versión nueva de este material, obtuvo resultados similares (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b). Se observó que el porcentaje de calcio en el NeoMTA Plus fue del 34,96%, pero su nueva versión, NeoMTA 2, aun contenía más cantidad de calcio, un 46,25%. Con respecto al oxígeno, el porcentaje obtenido en NeoMTA Plus también fue similar (36,64%) y su nueva versión presentó una cantidad inferior, 24,04% (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b).

Es interesante saber la composición del material, entre otras cosas para saber la cantidad de calcio que presenta el material en su composición ya que esto nos va a indicar su capacidad de liberar hidróxido de calcio. Que un material libere hidróxido de calcio va a influir en la actividad antimicrobiana del biomaterial y en la diferenciación de los cementoblastos con la consecuente formación de un puente de dentina (López-García *et al.*, 2019). Mostrando, por lo tanto, que NeoMTA Plus sería el que mayor liberación de hidróxido de calcio presentaría.

Como se ha visto en estudios anteriores, el NeoMTA Plus contiene tantalio como radiopacificador y este no afecta a la biocompatibilidad del material (Tomás-Catalá *et al.*, 2017) siendo el mismo radiopacificador que contiene el nuevo material NeoPutty, en cambio MTA Angelus contiene tungstato de calcio, que ha sustituido al óxido de bismuto que contiene el MTA gris como radioopacificante, el cual se ha visto que produce discoloración dental (Marciano *et al.*, 2014).

Se detectaron picos de aluminio y azufre en el NeoMTA Plus, pero no picos de azufre para el NeoPutty, a diferencia de lo informado por el fabricante. Además del silicato de calcio, NeoPutty tiene aluminato de calcio, tantalita (óxido de tantalio -Ta₂O₆-), sulfato de calcio, un líquido orgánico patentado y estabilizadores. Se ha demostrado que el aluminato de calcio favorece la adquisición de fenotipos de células osteogénicas *in vitro* (Castro-Raucci *et al.*, 2017). Los materiales de aluminato de calcio muestran una buena biocompatibilidad al ser probados en el tejido subcutáneo de ratas (Da Fonseca *et al.*, 2014). Estas pequeñas diferencias pueden deberse a que el mapeo elemental de EDX solo muestra la distribución de los elementos en la superficie de la muestra.

2.2 MTT

Se utilizó el ensayo MTT, ya que es un procedimiento sencillo, simple y preciso (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2017) y es una forma adecuada de evaluar la viabilidad celular (Collado-González *et al.*, 2017b), aunque no mide solamente ésta sino también la actividad metabólica, esto posibilita la presencia de células viables aun teniendo baja actividad metabólica, siendo una limitación el guiarse solamente por esta prueba y por esa razón se realizan otras para verificar que el resultado obtenido es el correcto. A pesar de ello, es la prueba más realizada en la literatura científica para evaluar la biocompatibilidad *in vitro*.

NeoMTA Plus sin diluir a las 24h y 48h y NeoPutty sin diluir a las 72h presentaron tasas de viabilidad celular significativamente menores a las del grupo control. Además, NeoMTA Plus en dilución 1:2 a las 24h también presentó menor viabilidad celular en comparación al grupo control. Mientras que MTA Angelus mostró buena viabilidad celular en todas las diluciones y tiempos, aunque estas diferencias se pueden deber a que

al material le lleve más tiempo transformar el reactivo MTT en esas condiciones particulares, indicando igualmente que los materiales estudiados presentan buena viabilidad celular, como se describió en estudios anteriores (Rodrigues *et al.*, 2017b; Tomas-Catala *et al.*, 2017, 2018; Omid *et al.*, 2020). A pesar de ello, un trabajo anterior obtuvo en sus resultados que la viabilidad celular del NeoMTA Plus variaba según el pH del medio, aumentando la viabilidad celular en pH ácidos y disminuyendo en pH alcalinos (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2019).

En cuanto la bibliografía anterior acerca de MTA Angelus y su viabilidad celular, esta confirma el resultado obtenido en el presente estudio acerca de la buena viabilidad celular del material (Chang *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017a; Khedmat *et al.*, 2021; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021a), siendo ésta mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición (Jaberiansari *et al.*, 2014).

En cambio, según otro estudio donde se analizaba la viabilidad celular del MTA Angelus en células estrómicas de la pulpa dental humana, aquella se ve disminuida a los 7 días (Ali *et al.*, 2021), indicando la posible necesidad de analizar la viabilidad celular de los materiales pasadas las 72 horas, ya que esta puede no verse afectada en los primeros 3 días.

El ensayo MTT no solo evalúa la viabilidad celular, sino también la proliferación celular. Lo que puede llevar a confusión a la hora de interpretar los resultados, puesto que una inferior viabilidad celular, representada en los resultados, puede significar simplemente una proliferación celular más lenta. Como podría ser el caso del NeoPutty en nuestros resultados. Aunque aparentemente vemos una disminución de la viabilidad celular en el grupo sin dilución a las 72h, si vemos que esta ha ido aumentando con el paso de las horas. Mostrando quizá, una proliferación celular más lenta en comparación al resto de materiales y del grupo control.

Sin duda, como se ha mencionado, el ensayo MTT es la prueba más utilizada *in vitro* para evaluar la viabilidad celular sobre las HDPSC, pero en la literatura científica publicada también existen artículos publicados donde la forma de evaluar la viabilidad celular es diferente y debemos de tenerla en cuenta.

Un ejemplo de ese tipo de pruebas es la citometría de flujo, donde se introducen una serie de anticuerpos en los cultivos (Birant *et al.*, 2021). Se ha visto, en artículos previamente publicados, que el NeoMTA Plus no produce apoptosis celular (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2019) y que su viabilidad celular era adecuada (Birant *et al.*, 2021; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b) aunque era mayor en otro material estudiado, el Biodentine (Birant *et al.*, 2021).

Al analizar el MTA Angelus sobre HDPSC de la misma manera, se vio que no creaba apoptosis celular, aunque sí aumentaba la cantidad de células necróticas en comparación con el grupo control (Bortoluzzi *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017a).

Sun *et al.*, 2021, realizó esta prueba también en NeoPutty viendo que su viabilidad era superior a la de Endosequence ES Putty, pero inferior al teflón que utilizaron como grupo control.

Otro tipo de prueba *in vitro* que evalúa la viabilidad celular es el ensayo XTT (*XML Tunneling Technology*), el cual es una prueba similar al MTT. Consiste en la proliferación celular en presencia de factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes, al transformar la sal de tetrazolio (amarillo) en formazán (naranja). Así se hizo en un estudio que realizó esta prueba en HDPSC para evaluar la viabilidad celular del MTA Angelus en comparación con iRoot BP, pero, en este caso, no encontraban diferencias significativas entre los grupos (Öncel Torun *et al.*, 2015).

Por otro lado, Kim *et al.* (2022) usaron el *cell counting kit*, en el cual se añade un reactivo llamado CCK-8 al cultivo celular y se evalúa bajo un espectrofotómetro. Evidenciaron que NeoMTA plus presentaba viabilidad celular, pero ésta no alcanzó el 100%.

2.3 MIGRACIÓN CELULAR

La curación de la herida se lleva a cabo entre mediadores y células inflamatorias teniendo un papel muy importante en este proceso (López-García *et al.*, 2019). Aunque la capacidad de los materiales usados en la TVP para estimular a las HDPSC a migrar se ha demostrado en cultivos 2D, los resultados de este estudio corroboran la capacidad de

migración celular de los materiales biocerámicos estudiados, ya que todos ellos llevan al cierre de la herida a las 72h sin diferencias significativas entre ellos, estando de acuerdo, pues, con artículos publicados anteriormente acerca de alguno de estos materiales (Tomás-Catalá *et al.*, 2017; Collado-González *et al.*, 2017a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021b).

Además, Rodríguez-Lozano *et al.* (2019) observaron que, que incluso en medios ácidos, la migración celular de NeoMTA Plus era buena. En cuanto al MTA Angelus hay investigaciones que presentan resultados totalmente contrarios. Mientras que hay autores que afirman que la migración celular es inferior a la del grupo control (Omidi *et al.*, 2020) otros constatan que la migración celular es similar (Sanz *et al.*, 2021).

Por otro lado, existen otros materiales ampliamente reconocidos y estudiados como es el caso de Biodentine, en el cual se ha observado en estudios anteriores, una migración celular mayor que la que presentan MTA Angelus o NeoMTA Plus (Araujo *et al.*, 2018; Tomas-Catala *et al.*, 2018).

2.4 MORFOLOGÍA Y ADHESIÓN CELULAR

En este estudio se comprobó que los tres materiales presentaban buena adhesión celular sobre ellos y que su morfología celular era similar a la del grupo control mostrando, por lo tanto, ausencia de citotoxicidad.

Rodríguez-Lozano *et al.* (2021b) estudiaron el NeoMTA Plus y encontró los mismos resultados, tanto en adhesión como en lo que se refiere a la morfología celular. Además, un estudio que utilizó 2 de los 3 materiales de este estudio, NeoMTA Plus y MTA Angelus, también encontró buena adhesión celular en ellos, destacando que el segundo presentó mayor estructura de células monocapa, pero difería de nuestros resultados en la morfología celular, describiendo encogimiento de las células al entrar en contacto con estos dos materiales, siendo éste mayor en las células que estaban en contacto con MTA Angelus (Tomás-Catalá *et al.*, 2017).

Por lo contrario, al comparar NeoMTA Plus con otro tipo de materiales, que no son considerados como biocerámicos, como pueden ser el IRM o el Theracal LC, las células en contacto con NeoMTA Plus presentan una mejor adhesión y crecimiento celular (Collado-González *et al.*, 2017a).

Es pertinente analizar cada material nuevo que aparece y compararlo con otros que ya se utilizan desde hace tiempo y están consolidados en el mercado, con el fin de aumentar el conocimiento sobre ellos para facilitar una elección terapéutica, así como para aportar evidencia científica sobre la que basar la actividad clínica.

2.5 MATERIALES

2.5.1 NEOMTA PLUS

En rasgos generales, respecto a los resultados obtenidos podemos afirmar que NeoMTA Plus es un material biocompatible, estando de acuerdo con Tomás-Catalá *et al.*, 2017, los cuales observaron que, en presencia de NeoMTA Plus las células presentaba menor encogimiento celular que con MTA angelus.

Del mismo modo Tomás-Catalá, *et al.*, 2018, obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la biocompatibilidad del NeoMTA Plus, pero en este caso Biodentine presentaba mayor migración celular y fijación celular, estando de acuerdo con los resultados obtenidos por Birant *et al.*, 2021. Igualmente, Rodríguez-Lozano *et al.* (2019) confirmaron que NeoMTA Plus no es un material citotóxico, viendo que esta biocompatibilidad aumentaba en medios ácidos. Aunque Rodríguez-Lozano *et al.* (2021b) vieron que NeoMTA Plus también era un material biocompatible. La nueva versión de este material NeoMTA 2, consiguió mejorar la migración celular de su versión anterior, a pesar de que esta ya era buena.

Según Kim *et al.* (2022) la viabilidad celular de este material aumenta si el material se encuentra diluido. En los resultados del presente estudio se vieron diferencias significativas al respecto.

2.5.2 NEOPUTTY

En cuanto al NeoPutty, los resultados obtenidos muestran que este material no es citotóxico. Es un material muy reciente del cual, hasta donde sabemos, solo hay un artículo publicado acerca de su biocompatibilidad sobre HDPSC, en el cual se llega a la conclusión de que el NeoPutty es menos citotóxico que el resto de materiales estudiados (Endosequence BC RMM Putty), en el que se afirma que se consigue reducir la citotoxicidad con el fraguado completo del material (Sun *et al.*, 2021). Aunque se ha publicado un artículo recientemente referente a la biocompatibilidad de NeoPutty sobre PDLSC, en el que se han realizado pruebas de biocompatibilidad similares a las de esta tesis y han obtenido los mismos resultados. Mostrando que NeoPutty es biocompatible (Saber *et al.*, 2023).

Recientemente, se han publicado investigaciones que evalúan diferentes características de este material, como la unión de este material a diferentes materiales restauradores (Alqahtani *et al.*, 2022; Özata *et al.*, 2023) y sobre su reacción de fraguado (Peters *et al.*, 2023). También sobre su éxito en tratamientos de pulpotomías en dientes permanentes jóvenes (Alqahtani *et al.*, 2023).

Lo que nos muestra que es un material que está causando interés clínico, para lo cual es fundamental confirmar que su uso no es tóxico para las células donde se va a colocar.

2.5.3 MTA ANGELUS

El otro material seleccionado para la comparación es el MTA Angelus, un material que ha sido muy estudiado y del que se conoce su biocompatibilidad, siendo esta confirmada con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que no presenta efectos citotóxicos, pero existe un estudio en el que vieron que su migración celular es inferior a la del grupo control (Omidi *et al.*, 2020), pero en este estudio analizaban la migración celular de un recipiente a otro y no con la prueba de la curación de la herida.

Por otro lado, Araujo *et al.* (2018) encontraron resultados diferentes; viendo que Biodentine y MTA Angelus presentaron mayor migración celular que el hidróxido de calcio. Además, Collado-González *et al.* (2017a) obtuvieron en sus resultados que tanto Biodentine como MTA Angelus presentaban buena migración celular.

3. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS *IN VIVO*

Para analizar la biocompatibilidad de estos materiales, pero *in vivo*, se realizan pruebas en diferentes tipos de animales. Al estudiar estos materiales en perros, se describió que NeoMTA Plus es un material más biocompatible que MTA Angelus, presentando menor cantidad de células inflamatorias después de una semana de la colocación del material en perforaciones en la furca de los dientes de los perros, pero sin diferencias significativas después de un mes (Abboud *et al.*, 2021). Aunque en este caso se utilizaron materiales indicados como reparadores de perforaciones y puede ser que las células pulpares respondieran de otra manera, ya que en nuestro caso no se observaron diferencias significativas entre ellos como para dictaminar que uno es más biocompatible que el otro.

En cambio en otros estudios con animales se coloca el material subcutáneamente y se evalúa histológicamente la inflamación alrededor del material, lo cual no representa tan fiablemente la realidad (Benetti *et al.*, 2018). A pesar de ello, es considerada una de las pruebas más fiables para valorar la biocompatibilidad de los materiales (Rady *et al.*, 2021). Cuando se coloca un material subcutáneamente y se forma una capsula de tejido fibroso, esto nos demuestra que el material está siendo tolerado por los tejidos (Pinheiro *et al.*, 2018).

En este tipo de estudios, MTA Angelus es considerado biocompatible, a pesar de presentar un aumento de células inflamatorias a los 7 días, lo cual se relaciona con el aumento del pH durante el fraguado completo del material, llevando a que se liberen citoquinas proinflamatorias (Rady *et al.*, 2021).

Otro estudio que realizó la misma prueba con MTA Angelus y NeoMTA Plus, estableció que ambos materiales son biocompatibles al colocarlos subcutáneamente en ratas (Pinheiro *et al.*, 2018), coincidiendo con nuestros resultados.

Hasta el momento y hasta donde conocemos, no existen estudios publicados que analicen la biocompatibilidad de NeoPutty *in vivo* sobre animales, debido, como hemos comentado con anterioridad, a su reciente aparición en el mercado.

4. DISCOLORACIÓN

Una desventaja que presentan los materiales biocerámicos es la discoloración que muchos de ellos provocan. Además, en la TVP estos materiales se colocan muchas veces en la cámara pulpar, siendo un lugar donde la discoloración va a ser más notable.

El MTA contiene óxido de bismuto, el cual es conocido por ser el causante de la discoloración que presentan los dientes donde se coloca (López-García *et al.*, 2019).

Una vez se supo el efecto discolorante del óxido de bismuto, se buscaron alternativas para evitar que ocurriera. En el caso de los materiales de este estudio, el MTA Angelus usa tungstato de calcio como radioopacificante y, por otro lado, NeoMTA Plus y NeoPutty presentan como radioopacificante el óxido de tantalio, el cual se ha visto que no afecta a la biocompatibilidad de los materiales en los que se coloca (Tomás-Catalá *et al.*, 2017).

Ambos agentes radioopacificantes utilizados en estos materiales son una buena alternativa al óxido de bismuto. Aunque siguen provocando discoloración dental, esta es muy inferior a la producida por el óxido de bismuto (Marques Junior *et al.*, 2021), ya que todos los cementos hidráulicos al entrar en contacto con la sangre, como es el caso en algunos tratamientos de TVP, causan un cierto grado de discoloración dental (Llena *et al.*, 2023).

A pesar de que el objetivo de esta tesis no es analizar la discoloración de los materiales estudiados, resulta interesante saber si se sabe algo sobre esto, ya que es relevante posteriormente en el aspecto del paciente.

Jesus *et al.* (2023) analiza la discoloración que producen NeoMTA Plus y MTA Angelus sobre dientes bovinos a los que se les ha realizado TVP y colocado una restauración de

composite posteriormente. Se vio que el óxido de bismuto que contiene el MTA original es el causante de una discoloración temprana, pero a los 2 años del tratamiento, los dientes a los que se les había colocado MTA Angelus o NeoMTA Plus, también presentaban cambios de color tanto en esmalte como en la restauración de composite.

En cambio, acerca de NeoPutty, todavía no hay nada publicado acerca de la discoloración que produce. Pero debido a que el radioopacificante es el óxido de tantalio, al igual que el de NeoMTA Plus, podemos esperar que los efectos en los dientes en los que se coloque este material sean los mismos que en los casos que se utiliza el NeoMTA Plus.

Tras discutir acerca del tema de esta tesis doctoral, vemos que es necesario seguir estudiando los nuevos materiales que van apareciendo ya que se desarrollan, de manera independiente de las empresas que los desarrollan y comercializan, con el fin de conocerlos mejor y tener más información ante la toma de decisiones terapéuticas en relación con la selección del biomaterial más adecuado en cada caso.

5. LIMITACIONES

La poca información existente acerca de NeoPutty, debido a ser un material muy reciente y, sobre todo, los pocos datos en cuanto a los efectos del NeoPutty sobre las HDPSC no permite comparar nuestros resultados con la evidencia científica existente.

Por otro lado, el hecho de ser un estudio *in vitro* limita el alcance de los resultados, ya que los mecanismos de defensa del cuerpo humano no pueden ser simulados, y esto se debe tener en cuenta a la hora de extrapolar los resultados a la práctica clínica.

CONCLUSIONES

Tras el estudio realizado y respondiendo a los objetivos previamente planteados, podemos concluir que:

NeoPutty puede indicarse en procedimientos pulpares vitales al igual que los materiales con los que se ha comparado, tanto NeoMTA Plus como MTA Angelus, debido a su biocompatibilidad

Los resultados revelan similitudes en la ultraestructura de MTA Angelus y NeoMTA Plus, mientras que la del NeoPutty exhibe una morfología más granulada. Sin embargo, en cuanto a su composición, NeoMTA Plus y NeoPutty comparten el mismo radioopacificante (tantalio), y NeoMTA Plus es el que mayor cantidad de oxígeno y de calcio contiene.

Ninguno de los materiales estudiados afecta a la morfología celular de las HDPSC y todos se adhieren correctamente a ellas.

En el presente estudio los resultados obtenidos nos demuestran que los 3 materiales estudiados son biocompatibles y podrían utilizarse por tanto en la TVP, donde el material puede entrar en contacto la pulpa dental, sin producir ningún efecto toxico sobre la misma.

FUTURAS INVESTIGACIONES

Además de la biocompatibilidad de estos materiales, también es importante saber si su función es eficaz. Para ello, es necesario saber si son capaces de formar el puente de dentina que protegerá la pulpa y evitará el futuro tratamiento de conductos. Por lo tanto, continuar esta investigación con pruebas de bioactividad sería interesante. En el caso que nos ocupa, y dentro de nuestro conocimiento, estas pruebas sí han sido estudiadas sobre NeoMTA Plus y sobre MTA Angelus, pero todavía no se ha analizado la bioactividad de NeoPutty.

Es obvio que se necesitan más estudios para verificar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los nuevos materiales de uso endodóntico para optimizar su uso clínico sobre una base de evidencia científica.

Asimismo, es imprescindible estudiar las propiedades físicas y químicas de los materiales. Así como estudiar la unión de estos materiales a los materiales restauradores que se colocan encima, para evaluar la filtración que podría llevar a fracaso del tratamiento de TVP.

También sería interesante evaluar la duración del material en el lugar de su colocación y ver si esto influye o no en el éxito o fracaso del tratamiento a largo plazo, debido a que, si el material se reabsorbe, pero esto ocurre una vez formado el puente de dentina, podría no afectar a la vitalidad pulpar en el tiempo.

Otro aspecto para estudiar acerca de biocerámicos en TVP, sería un análisis en el que se evalúe cuantos de los tratamientos de TVP acaban en tratamiento de conductos y en cuanto tiempo es necesario realizarlo, desde el tratamiento de TVP.

BIBLIOGRAFÍA

‘AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy’ (2021) *Journal of Endodontics*, 47(9), pp. 1340–1344. doi: 10.1016/j.joen.2021.07.015.

Abboud, K. M., Abu-Seida, A. M., Hassanien, E. E., Tawfik, H. M. (2021) ‘Biocompatibility of NeoMTA Plus® versus MTA Angelus as delayed furcation perforation repair materials in a dog model.’, *BMC oral health*, 21(1), p. 192. doi: 10.1186/s12903-021-01552-w.

AL-Haddad, A. and Che Ab Aziz, Z. A. (2016) ‘Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review’, *International Journal of Biomaterials*, 2016, pp. 1–10. doi: 10.1155/2016/9753210.

Ali, M. R., Mustafa, M., Bårdsen, A., Gharaei, M. A., Fristad, I., Bletsa, A. (2021) ‘Differential Responses of Human Dental Pulp Stromal Cells to Bioceramic Materials: A Comparative In Vitro Study.’, *The journal of contemporary dental practice*, 22(12), pp. 1386–1392.

Alqahtani, A. S., Sulimaniy, A. M., Alayad, A. S., Alqahtani, A., Bawazir, O. A. (2022) ‘Evaluation of the Shear Bond Strength of Four Bioceramic Materials with Different Restorative Materials and Timings’, *Materials*, 15(13), p. 1-11. doi: 10.3390/ma15134668.

Alqahtani, A. S., Alsuhaibani, N. N., Sulimany, A. M., Bawazir, O. A. (2023) ‘NeoPutty® Versus NeoMTA 2® as a Pulpotomy Medicament for Primary Molars: A Randomized Clinical Trial’, *Pediatr Dent*, 45(3), 240-244.

Anson, B. D., Kolaja, K. L. and Kamp, T. J. (2011) ‘Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology’, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(5), pp. 754–758. doi: 10.1038/clpt.2011.9.

Araujo, L. B., Cosme-Silva, L., Fernandes, P., de Oliveira, T. M., Cavalcanti, B. D., Gomez, J. E., Sakai, V. T. (2018) ‘Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine (TM)

and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth', *Journal of applied oral science*, 26. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0629.

Armiñán, A. , Gandia, C., Bartual, MC., García-Verdugo, JM. (2009) 'Cardiac Differentiation Is Driven by NKX2.5 and GATA4 Nuclear Translocation in Tissue-Specific Mesenchymal Stem Cells', *Stem Cells and Development*, 18(6), pp. 907–918. doi: 10.1089/scd.2008.0292.

Barrieshi-Nusair, K. M. and Qudeimat, M. A. (2006) 'A Prospective Clinical Study of Mineral Trioxide Aggregate for Partial Pulpotomy in Cariously Exposed Permanent Teeth', *Journal of Endodontics*, 32(8), pp. 731–735. doi: 10.1016/j.joen.2005.12.008.

Benetti, F. , Gomes-Filho, J., Araujo, J. M., Barbosa, J. G., Jacinto, R. C. (2018) 'In vivo biocompatibility and biomineralization of calcium silicate cements', *European Journal of Oral Sciences*, 126(4), pp. 326–333. doi: 10.1111/eos.12539.

Benetti, F., de Azevedo Queiroz, I., Oliveira, P., Conti, L., Azuma, M. (2019) 'Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide.', *Brazilian oral research*, 33, p. e042. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0042.

Birant, S., Gokalp, M., Duran, Y., Koroyucu, M., Akkoc T., Seymen, F. (2021) 'Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells', *Journal of Dental Sciences*, 16(3), pp. 971–979. doi: 10.1016/j.jds.2020.10.009.

Bortoluzzi, E. A. , Niu, L., Palani, C., El-Awady, A., Hammond, B., Pei, D., Tian, F., Cutler, C. (2015) 'Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization', *Dental Materials*, 31(12), pp. 1510–1522. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.020.

Bose, R., Nummikoski, P. and Hargreaves, K. (2009) 'A Retrospective Evaluation of Radiographic Outcomes in Immature Teeth With Necrotic Root Canal Systems Treated

With Regenerative Endodontic Procedures', *Journal of Endodontics*, 35(10), pp. 1343–1349. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.021.

Boutsiouki, C., Frankenberger, R. and Krämer, N. (2018) 'Relative effectiveness of direct and indirect pulp capping in the primary dentition', *European Archives of Paediatric Dentistry*, 19(5), pp. 297–309. doi: 10.1007/s40368-018-0360-x.

Camilleri, J. (2008) 'The chemical composition of mineral trioxide aggregate', *Journal of Conservative Dentistry*, 11(4), p. 141. doi: 10.4103/0972-0707.48834.

Camilleri, J. (2020) 'Classification of Hydraulic Cements Used in Dentistry', *Frontiers in Dental Medicine*, pp. 1–6. doi: 10.3389/fdmed.2020.00009.

Castro-Raucci, L. M. S, Teixeira, L. N., Oliveira, I. R., Raucci-Neto, W., Jacobovitz, M., Rosa, A. L., de Oliveira, P. T. (2017) 'Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement', *International Endodontic Journal*, 50(8), pp. 771–779. doi: 10.1111/iej.12682.

Cedillo, J. de J. (2011) 'Ionómeros de vidrio remineralizantes: una alternativa de tratamiento preventivo o terapéutico', *Rev ADM*, 68(5), pp. 258–265.

Chang, S., Lee, S., Ann, H., Kum, K., Kim, E. (2014) 'Effects of Calcium Silicate Endodontic Cements on Biocompatibility and Mineralization-inducing Potentials in Human Dental Pulp Cells', *Journal of Endodontics*, 40(8), pp. 1194–1200. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.001.

Collado-González, M., Garcia-Bernal, D., Onate-Sanchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Alvarez-Muro, T., Lozano, A., Forner, L., Llana, C., Moraleda, J., Rodríguez-Lozano, F. (2017a) 'Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth', *International Endodontic Journal*, 50, pp. E19–E30. doi: 10.1111/iej.12751.

Collado-González, M., Garcia-Bernal, D., Onate-Sanchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Lozano, A., Forner, L., Llana, C., Rodríguez-Lozano, F. (2017b) 'Biocompatibility

of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells', *International Endodontic Journal*, 50(9), pp. 875–884. doi: 10.1111/iej.12703.

Collado-González, M., Garcia-Bernal, D., Onate-Sanchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Alvarez-Muro, T., Lozano, A., Forner, L., Llena, C., Moraleda, J. M., Rodríguez-Lozano, F. J. (2017c) 'Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth', *International Endodontic journal*, 50, pp. E19–E30. doi: 10.1111/iej.12751.

Dammaschke, T., Stratmann, U., Wolff, P., Sagheri, D., Schäfer, E. (2010) 'Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate: An Immunohistologic Comparison with Calcium Hydroxide in Rodents', *Journal of Endodontics*, 36(5), pp. 814–819. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.001

Debelian, G. and Trope, M. (2016) 'The use of premixed bioceramic materials in endodontics', *Giornale Italiano di Endodonzia*, 30(2), pp. 70–80. doi: 10.1016/j.gien.2016.09.001.

De Deus, G., Ximenes, R., Gurgel-Filho, E., Plotkowski, M., Coutinho-Filho, T. (2005) 'Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells.', *International endodontic journal*, 38(9), pp. 604–609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00987.x.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Duncan, H. F., Galler, K., Tomson, P., Simon, S., El-Karim, I., Kundzina, R., Krastl, G., Dammaschke, T., Fransson, H., Markqvist, M., Zehnder, M., Bjørndal, L. (2019) 'European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp', *International Endodontic Journal*, 52(7), pp. 923–934. doi: 10.1111/iej.13080.

Espinoza, F., Lizana, A. and Muñoz, P. (2020) 'Biocerámicos En Odontología, Una Revisión De Literatura.', *Canal Abierto*, 41, pp. 14–21.

Da Fonseca R., Huck, C., de Oliveira, L., de Souza, P., de Souza, C. (2014) 'Biocompatibility of new calcium aluminate cement: Tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines', *Journal of Endodontics*, 40(12), pp. 2024–2029. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.015.

Goldberg, F., Massone, E. J. and Spielberg, C. (1984) 'Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing', *Journal of Endodontics*, 10(7), pp. 318–320. doi: 10.1016/S0099-2399(84)80186-7.

Haji, T. H., Selivany, B. J. and Suliman, A. A. (2022) 'Sealing ability in vitro study and biocompatibility in vivo animal study of different bioceramic based sealers.', *Clinical and experimental dental research*, 8(6), pp. 1582–1590. doi: 10.1002/cre2.652.

Hanna, S. N., Alfayate, R. P. and Prichard, J. (2020) 'Vital pulp therapy an insight over the available literature and future expectations', *European Endodontic Journal*, 5(3), pp. 46–53. doi: 10.14744/eej.2019.44154.

Hoshino, R. A., Delfino, M., da Silva, G., Guerreiro-Tanomaru, J., Tanomaru-Filho, M., Sasso-Cerri, M., Cerri, P. (2021) 'Biocompatibility and bioactive potential of the NeoMTA Plus endodontic bioceramic-based sealer.', *Restorative dentistry & endodontics*, 46(1), p. e4. doi: 10.5395/rde.2021.46.e4.

Hsien, H. Cheng, Y., Lee, Y., Lan, W., Lin, C. (2003) 'Repair of Perforating Internal Resorption with Mineral Trioxide Aggregate: A Case Report', *Journal of Endodontics*, 29(8), pp. 538–539. doi: 10.1097/00004770-200308000-00011.

Huang, G., Sonoyama, W., Chen, J., Park, S. (2006) 'In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments', *Cell and Tissue Research*, 324(2), pp. 225–236. doi: 10.1007/s00441-005-0117-9.

Huang, G., Gronthos, S. and Shi, S. (2009) 'Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine', *Journal of Dental Research*, 88(9), pp. 792–806. doi: 10.1177/0022034509340867.

Jaberiansari, Z., Naderi, S. and Tabatabaei, F. S. (2014) 'Cytotoxic effects of various mineral trioxide aggregate formulations, calcium-enriched mixture and a new cement on human pulp stem cells.', *Iranian endodontic journal*, 9(4), pp. 271–276.

Jesus, L., Reis, T., Machado, B., Costa, A., Savaris, J., Volpato, C., Bortoluzzi, E., Teixeira, C., Fernandes, P., Garcia, L (2023) 'Dental and composite resin discoloration induced by different hydraulic calcium silicate-based cements: two-year in vitro assessment', *Journal of Applied Oral Science*, 31. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0444.

Jitaru, S., Hodisan, I., Timis, L., Lucian, A., Bud, M. (2016) 'The use of bioceramis in endodontics - Literature review', *Medicine and Pharmacy Reports*, 89(4), pp. 470–473. doi: 10.15386/cjmed-612.

Kellner, M., Steindorff, M., Strempel, J., Winkel, A., Kühnel, M., Stiesch, M (2014) 'Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement', *Archives of Oral Biology*, 59(6), pp. 559–567. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.014.

Kharouf, N., Steindorff, M., Strempel, J., Winkel, A., Kühnel, M., Stiesch, M. (2020) 'Physicochemical and Antibacterial Properties of Novel, Premixed Calcium Silicate-Based Sealer Compared to Powder–Liquid Bioceramic Sealer', *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), p. 3096. doi: 10.3390/jcm9103096.

Khedmat, S., Sarraf, P., Seyedjafar, E., Sanaei-rad, P., Noori, F. (2021) '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*, 21(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12903-021-01979-1.

Kim, B., Lee, Y., Kim, I., Lee, K., Kang, C., Lee, H., Choi, H., Cheon, K., Song, J., Shin,

Y. (2022) 'Biocompatibility and mineralization potential of new calcium silicate cements', *Journal of Dental Sciences*. doi: 10.1016/j.jds.2022.10.004.

Koch, K. A., Brave, D. G. and Nasseh, A. A. (2010) 'Bioceramic technology: closing the endo-restorative circle, Part I.', *Dentistry today*, 29(2), pp. 100–105.

Komabayashi, T. and Spångberg, L. S. W. (2008) 'Comparative Analysis of the Particle Size and Shape of Commercially Available Mineral Trioxide Aggregates and Portland Cement: A Study with a Flow Particle Image Analyzer', *Journal of Endodontics*, 34(1), pp. 94–98. doi: 10.1016/j.joen.2007.10.013.

Kunert, M. and Lukomska-Szymanska, M. (2020) 'Bio-Inductive Materials in Direct and Indirect Pulp Capping-A Review Article.', *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(5). doi: 10.3390/ma13051204.

Kuru, S., Sepet, E., Irez, T., Aktaş, E., Yazır, Y., Duruksu, G. (2021) 'Effects of different pulp-capping materials on cell death signaling pathways of lipoteichoic acid-stimulated human dental pulp stem cells', *Odontology*, 109(2), pp. 547–559. doi: 10.1007/s10266-020-00571-3.

Liu, J., Yu, F., Sun, Y., Jiang, B., Zhang, W., Yang, J., Xu, G., Liang, A., Liu, S. (2015a) 'Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells', *Stem Cells*, 33(3), pp. 627–638. doi: 10.1002/stem.1909.

Liu, S., Wang, S. and Dong, Y. (2015b) 'Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent In Vitro and In Vivo', *Journal of Endodontics*, 41(5), pp. 652–657. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.009.

Llena, C., Herrero, A., Lloret, S., Barraza, M., Sanz, J. L. (2023) 'Effect of calcium silicate-based endodontic sealers on tooth color: A 3-year in vitro experimental study', *Heliyon*, 9(2), p. e13237. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13237.

López-García, S., Lozano, A., García- Bernal, D., Forner, L., Llena, C., Guerrero-

Girones, J., Moraleda J. M., Murcia, L., Rodríguez-Lozano, F. (2019) 'Biological effects of new hydraulic materials on human periodontal ligament stem cells', *Journal of Clinical Medicine*, 8(8). doi: 10.3390/jcm8081216.

Marciano, M. A., Costa, R. M., Camilleri, J., Mondelli, R., Guimarães, B., Duarte, M. (2014) 'Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure', *Journal of Endodontics*, 40(8), pp. 1235–1240. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.044

Marques Junior, R. B., Baroudi, K., Santos, A., Pontes, D., Amaral, M. (2021) 'Tooth discoloration using calcium silicate-based cements for simulated revascularization in vitro', *Brazilian Dental Journal*, 32(1), pp. 53–58. doi: 10.1590/0103-6440202103700.

Muedra, P., Forner, L., Lozano, A., Sanz, J. L., Rodríguez-Lozano, F. J., Guerrero-Girones, J., Riccitiello, F., Spagnuolo, G., Llena, C. (2021) 'Could the Calcium Silicate-Based Sealer Presentation Form Influence Dentinal Sealing? An In Vitro Confocal Laser Study on Tubular Penetration', *Materials*, 14(3), p. 659. doi: 10.3390/ma14030659.

Nair, P. N. R., Duncan, H. F., Pitt Ford, T. R., Luder, H. U. (2007) 'Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial', *International Endodontic Journal*, 41(2), pp. 128-150 doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01329.x.

Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K., Ueda, M. (2009) 'Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp', *Journal of Endodontics*, 35(11), pp. 1536–1542. doi: 10.1016/j.joen.2009.07.024.

Oh, H., Kim, E., Lee, S., Park, S., Chen, D., Shin, S., Kim, E., Kim, S. (2020) 'Comparison of Biocompatibility of Calcium Silicate-Based Sealers and Epoxy Resin-Based Sealer on Human Periodontal Ligament Stem Cells', *Materials*, 13(22), p. 5242. doi: 10.3390/ma13225242.

Omidi, S., Bagheri, M., Fazli, M., Ahmadiankia, N. (2020) 'The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells', *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(6), pp. 768–775. doi: 10.22038/ijbms.2020.41511.9814.

Öncel Torun, Z., Torun, D., Demirkaya, K., Yavuz, S. T., Elçi, M. P., Sarper, M., Avcu, F. (2015) 'Effects of iRoot BP and white mineral trioxide aggregate on cell viability and the expression of genes associated with mineralization', *International Endodontic Journal*, 48(10), pp. 986–993. doi: 10.1111/iej.12393.

Özata, M. Y., Falakaloğlu, S., Plotino, G., Adıgüzel, Ö. (2023) 'The micro-shear bond strength of new endodontic tricalcium silicate-based putty: An in vitro study', *Australian Endodontic Journal*, 49(1), pp. 124–129. doi: 10.1111/aej.12631.

Parirokh, M. and Torabinejad, M. (2010) 'Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties', *Journal of Endodontics*, 36(1), pp. 16–27. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.006.

Paula, A., Carrilho, E., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Casalta-Lopes, J., Botelho, M. F., Marto, C. M., Ferreira, M. M. (2019) 'Direct Pulp Capping: Which is the Most Effective Biomaterial? A Retrospective Clinical Study', *Materials*, 12(20), p. 3382. doi: 10.3390/ma12203382.

Pedano, M. S., Li, X., Li, S., Sun, Z., Cokic, S. M., Putzeys, E., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Chen, Z., Van Landuyt, K., Van Meerbeek, B. (2018) 'Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells', *Dental Materials*, 34(5), pp. 797–808. doi: 10.1016/j.dental.2018.02.005.

Pedano, M. S., Li, X., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Van Meerbeek, B. (2020) '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*, 13(12), p. 2670. doi: 10.3390/ma13122670.

Peters, E., Kratunova, E., Lamberghini, F., Alrayyes, S., Alapati, S. B. (2023) 'Premixed

Mineral Trioxide Aggregate Setting Reaction in Primary Molar Pulpotomies’, *Journal of dentistry for children (Chicago, Ill.)*, 90(1), pp. 11–16.

Pinheiro, L. S., Iglesias, J., Boijink, D., Mestieri, L. B., Poli Kopper, P. M., Figueiredo, J., Grecca, F. (2018) ‘Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study’, *Journal of Endodontics*, 44(7), pp. 1140–1145. doi: 10.1016/j.joen.2018.03.007.

Rabello, C. Z., Kopper, P., Ferri, L., Signor, B., Hashizumi, L., Fontanella, V., Grecca, F., Scarparo, R. (2022) ‘Physicochemical properties of three bioceramic cements’, *Brazilian Oral Research*, 36, p. e069. doi: 10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0069.

Rady, D., Abdel Rahman, M., El-Mallah, S., Khalil, M. (2021) ‘Biocompatibility assessment of different root-end filling materials implanted subcutaneously in rats: An in vivo study’, *Dental and Medical Problems*, 58(4), pp. 525–532. doi: 10.17219/dmp/132240.

Rao, A., Rao, A., and Shenoy, R. (2009) ‘Mineral Trioxide Aggregate—A Review’, *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 34(1), pp. 1–8. doi: 10.17796/jcpd.34.1.n1t0757815067g83.

Rodrigues, E. M., Gomes-Cornélio, A. L., Soares-Costa, A., Salles, L. P., Velayutham, M., Rossa-Junior, C., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M. (2017a) ‘An assessment of the overexpression of BMP-2 in transfected human osteoblast cells stimulated by mineral trioxide aggregate and Biodentine’, *International Endodontic Journal*, 50, pp. e9–e18. doi: 10.1111/iej.12745.

Rodrigues, E. M., Cornélio, A. L. G., Mestieri, L. B., Fuentes, A. S. C., Salles, L. P., Rossa-Junior, C., Faria, G., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M. (2017b) ‘Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis’, *International Endodontic Journal*, 50(8), pp. 780–789. doi: 10.1111/iej.12683.

Rodríguez-Lozano, F. J., López-García, S., García-Bernal, D., Sanz, J. L., Lozano, A.,

Pecci-Lloret, M. P., Melo, M., López-Ginés, C., Forner, L. (2021a) 'Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy', *Clinical Oral Investigations*, 25(8), pp. 5009–5024. doi: 10.1007/s00784-021-03811-0.

Rodríguez-Lozano, F. J. Serrano-Belmonte, I., Pérez Calvo, J. C., Coronado-Parra, M. T., Bernabeu-Esclapez, A., Moraleda, J. M. (2013) 'Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression)', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(4), pp. 979–988. doi: 10.1007/s10856-013-4849-x.

Rodríguez-Lozano, F. J. García-Bernal, D, Oñate-Sánchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Forner, L., Moraleda, J. M. (2017) 'Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells', *International Endodontic Journal*, 50(1), pp. 67–76. doi: 10.1111/iej.12596.

Rodríguez-Lozano, F. J., Lozano, A., López-García, S., García-Bernal, D., Sanz, J. L., Guerrero-Gironés, J., Llena, C., Forner, L., Melo, M. (2021b) 'Biom mineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)–containing calcium silicate cement', *Clinical Oral Investigations*, 14(1), pp. 276–279. doi: 10.1007/s00784-021-04117-x.

Rodríguez-Lozano, F. J., Collado-González, M., López-García, S., García-Bernal, D., Moraleda, J. M., Lozano, A., Forner, L., Murcia, L., Oñate-Sánchez, R. E. (2019) 'Evaluation of changes in ion release and biological properties of NeoMTA-Plus and Endocem-MTA exposed to an acidic environment', *International Endodontic Journal*, 52(8), p. iej.13107. doi: 10.1111/iej.13107.

da Rosa, W. L. O., Cocco, A. R., Silva, T., Mesquita, L., Galarça, A., Silva, A., Piva, E. (2018) 'Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(3), pp. 1358–1368. doi: 10.1002/jbm.b.33934.

Saber, S., Gomaa, S., Elashiry, M., El-Banna, A., Schäfer, E. (2023) 'Comparative biological properties of resin-free and resin-based calcium silicate-based endodontic repair materials on human periodontal ligament stem cells', *Clinical Oral Investigations*, 27 (11), pp. 6757-6768. doi: 10.1007/s00784-023-05288-5

Sanz, J. L., Forner, L., Llena, C., Guerrero-Gironés, J., Melo, M., Rengo, S., Spagnuolo, G., Rodríguez-Lozano, F. (2020) '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', *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), p. 3872. doi: 10.3390/jcm9123872.

Sanz, J. L., Soler-Doria, A., López-García, S., García-Bernal, D., Rodríguez-Lozano, F. J., Lozano, A., Llena, C., Forner, L., Guerrero-Gironés, J., Melo, M. (2021) '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)', *Journal of Endodontics*. doi: 10.1016/j.joen.2021.08.001.

Sanz, J. L. (2022) *Análisis de la citocompatibilidad, la bioactividad y la activación de vías de señalización celular inducida por nuevos biosilicatos hidráulicos de uso en Endodoncia Regenerativa*. Universitat de València.

Sequeira, D. B., Oliveira, A., Seabra, C., Palma, P., Ramos, C., Figueiredo, M., Santos, A., Cardoso, A., Peça, J., Santos, J. (2021) 'Regeneration of pulp-dentin complex using human stem cells of the apical papilla: in vivo interaction with two bioactive materials', *Clinical Oral Investigations*, 25(9), pp. 5317–5329. doi: 10.1007/s00784-021-03840-9.

Silva, E. J. N. L., Senna, P. M., De-Deus, G., Zaia, A. A. (2016) 'Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model', *International Endodontic Journal*, 49(6), pp. 574–580. doi: 10.1111/iej.12485.

Silva, G. A. B., Lanza, L. D., Lopes-Júnior, N., Moreira, A., Alves, J. B. (2006) 'Direct Pulp Capping with a Dentin Bonding System in Human Teeth: A Clinical and Histological Evaluation', *Operative Dentistry*, 31(3), pp. 297–307. doi: 10.2341/05-65.

Song, W., Sun, W., Chen, L., Yuan, Z. (2020) 'In vivo Biocompatibility and Bioactivity of Calcium Silicate-Based Bioceramics in Endodontics', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 31. doi: 10.3389/fbioe.2020.580954.

de Souza-Costa, C. A., Hebling, J., Scheffel, D. L. S., Soares, D. G.S., Basso, F. G., Ribeiro, A. P. D. (2014) 'Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques', *Dental Materials*, 30(7), pp. 769–784. doi: 10.1016/j.dental.2014.04.010.

Srinivasan, V., Waterhouse, P. and Whitworth, J. (2009) 'Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry', *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19(1), pp. 34–47. doi: 10.1111/j.1365-263X.2008.00959.x.

Sun, H.H., Chen, B., Zhu, Q., Kong, H., Li, Q., Gao, L., Xiao, M., Chen, F., Yu, Q. (2014) 'Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis', *Biomaterials*, 35(35), pp. 9459–9472. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.003.

Sun, Q., Meng, M., Steed, J. N., Sidow, S. J., Bergeron, B. E., Niu, L. N., Ma, J. Z., Tay, F. R. (2021) 'Manoeuvrability and biocompatibility of endodontic tricalcium silicate-based putties.', *Journal of dentistry*, 104, p. 103530. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103530.

Surya Raghavendra, S., Jadhav, G. R., Gathani, K. M., Kotadia, P. (2017) 'Bioceramics in Endodontics - A Review', *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 51(2), p. 59. doi: 10.17096/jiufd.63659.

Takeda, T., Tezuka, Y., Horiuchi, M., Hosono, K., Iida, K., Hatakeyama, D., Miyaki, S., Kunisada, T., Shibata, T., Tezuka, K. (2008) 'Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs', *Journal of Dental Research*, 87(7), pp. 676–681. doi: 10.1177/154405910808700716.

Talabani, R. M., Garib, B. T. and Masaeli, R. (2020) 'Bioactivity and Physicochemical Properties of Three Calcium Silicate-Based Cements: An In Vitro Study', *BioMed Research International*, 2020, pp. 1–10. doi: 10.1155/2020/9576930.

Techawattanawisal, W., Nakahama, K., Komaki, M., Abe, M., Takagi, Y., Morita, I. (2007) 'Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(4), pp. 917–923. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.031.

Tomas-Catala, C. J., Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Forner, L., Llena, C., Lozano, A., Castelo-Baz, P., Moraleda, J. M., Rodríguez-Lozano, F. J. (2017) '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.', *International endodontic journal*, 50 Suppl 2, pp. e63–e72. doi: 10.1111/iej.12859.

Tomas-Catala, C. J., Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Forner, L., Llena, C., Lozano, A., Castelo-Baz, P., Moraleda, J. M., Rodríguez-Lozano, F. J. (2018) 'Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells', *Journal of Endodontics*, 44(1), pp. 126–132. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.017.

Vallittu, P. K., Boccaccini, A. R., Hupa, L., Watts, D. C. (2018) 'Bioactive dental materials—Do they exist and what does bioactivity mean?', *Dental Materials*, 34(5), pp. 693–694. doi: 10.1016/j.dental.2018.03.001.

Viana Viola, N., Tanomaru Filho, M. and Sérgio Cerri, P. (2012) 'MTA versus Portland cement: review of literature', *RSBO*, 8(4), pp. 446–52. doi: 10.21726/rsbo.v8i4.1096.

Wataha, J. C. (2012) 'Predicting clinical biological responses to dental materials', *Dental Materials*, 28(1), pp. 23–40. doi: 10.1016/j.dental.2011.08.595.

Widbiller, M., Lindner, S. R., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K. A., Schmalz, G., Galler, K. M. (2016) 'Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements', *Clinical Oral Investigations*, 20(2), pp. 237–246. doi: 10.1007/s00784-015-1515-3.

Witherspoon, D. E. (2008) 'Vital Pulp Therapy with New Materials: New Directions and Treatment Perspectives—Permanent Teeth', *Journal of Endodontics*, 34(7), pp. S25–S28. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.030.