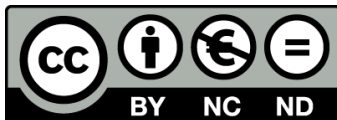

Tesis doctoral

*BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PATOLOGÍA PULPAR EN ENDODONCIA*

Claudia Brizuela Cordero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-
NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-
ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0
International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



**“BIOMARCADORES PARA EL
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PATOLOGÍA PULPAR EN ENDODONCIA”**

Departamento de Endodoncia

Facultad de Odontología

Programa de Doctorado: Doctorado en Odontología

Universitat Internacional de Catalunya

Tesis Doctoral

Candidato: Claudia Isabel Brizuela Cordero

Directora:

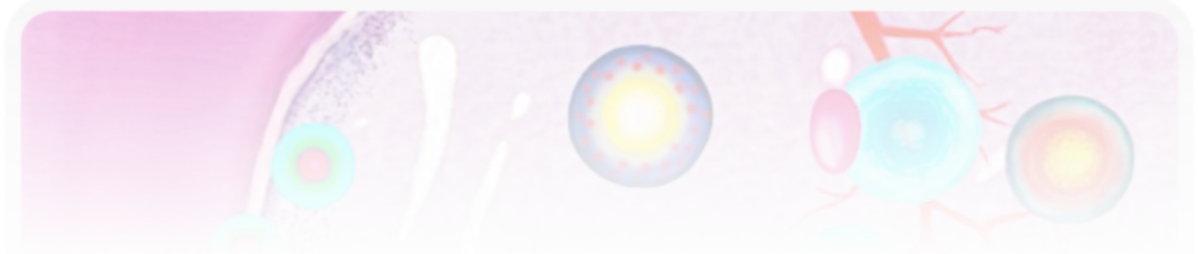
Dra. Montserrat Mercadé Bellido

Tutor:

Dr. Lluís Giner Tarrida

Barcelona 2018

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es el resultado del esfuerzo de múltiples personas, que desde distintos aspectos ya sea directa o indirectamente han contribuido al desarrollo de esta investigación. Algunos lo han hecho generando ideas, opiniones, correcciones, incluso palabras de ánimo en momentos difíciles, pero sobretodo mucha paciencia a lo largo de este proceso.

A mi directora, la Dra. Montserrat Mercadé, infinitas gracias por la confianza depositada en mí, primero por creer en este proyecto y hacer un gran esfuerzo para que fuera aceptado y en segundo lugar por guiarme durante todo este largo, pero enriquecedor proceso. Querida Montserrat gracias por tus palabras de aliento y observaciones.

A mi tutor el Dr. Lluís Giner, por la confianza en aceptar ser mi tutor en momentos de cambio. Gracias por facilitar este tránsito por este increíble centro de estudios como es la UIC. Es un orgullo haber formado parte de esta institución.

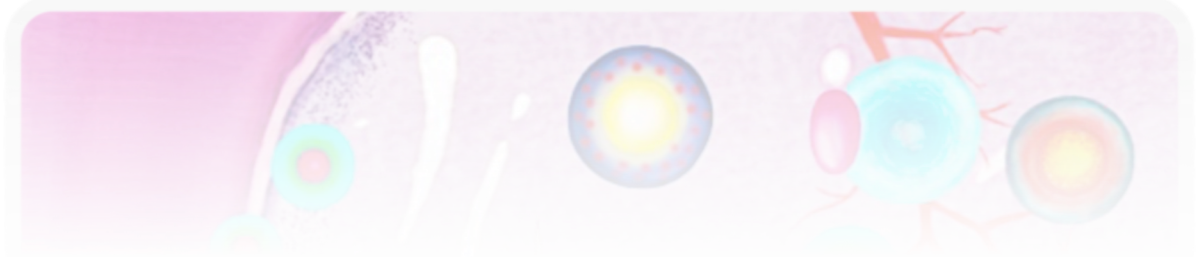
Al Consejo de la Facultad Odontología de la Universidad de los Andes, que mantuvieron siempre su confianza en mí.

Al Departamento de Innovación y Desarrollo (I+D) de la Universidad de los Andes, por creer en este proyecto y la adjudicación de fondos que permitieron financiar esta tesis doctoral.

A mis alumnos María Ignacia Bravo, Luís Castrillón, Carlos Briceño por su trabajo en equipo y colaboración durante el desarrollo de esta tesis. A Carolina Inostroza por su permanente apoyo y trabajo en este proyecto que empezamos juntas.

En especial quiero agradecer a mi familia, pilar fundamental para mi vida, gracias por su cariño y comprensión, por entender lo importante que es para mí este proyecto. A Gustavo, mi esposo, por su increíble paciencia, ayuda, aliento y amor incondicional. A mis hijos Bastián, Martín y Camila por las horas que les quité durante el desarrollo de esta tesis y a veces no poder estar presente, disculpas por eso, los amo infinitamente. Sin ustedes esto no habría sido posible.

Índice de Contenidos



INDICE DE CONTENIDOS

1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	14
1.1. Pregunta de Investigación	15
1.2. Relevancia de la Investigación	15
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Caries.....	19
2.2 Inervación Pulpar.....	20
2.3 Teorías del Dolor.....	21
2.3.1 Teoría de la activación de extensiones intradentinarias de los nervios pulpares	21
2.3.2 Teoría del mecanismo de transducción que considera al odontoblasto y a sus prolongaciones dentinarias.....	22
2.3.3 Teoría Hidrodinámica de Brännström	22
2.4 Diagnósticos clínicos en Endodoncia	23
2.4.1 Definición.....	23
2.4.2 Pulpa Normal	24
2.4.3 Pulpitis Reversible.....	25
2.4.4 Pulpitis Irreversible Sintomática	25
2.4.5 Pulpitis Irreversible Asintomática.....	26
2.4.6 Necrosis Pulpar.....	26
2.5 Pruebas diagnósticas	26
2.5.1 Test de vitalidad pulpar.....	26
2.5.2 Test de sensibilidad pulpar	27
2.5.3 Sensibilidad.....	27
2.5.4 Especificidad	27
2.5.5 Valor predictivo positivo.....	28
2.5.6 Valor predictivo negativo.....	28
2.5.7 Exactitud.....	28
2.6 Pruebas de sensibilidad pulpar	28
2.6.1 Test de frío	28
2.6.2 Test de calor	31
2.6.3 Test pulpar eléctrico	32
2.6.4 Correlación entre los resultados de los test pulpares eléctricos y el estado histológico	33
2.6.5 Valor predictivo de pruebas de sensibilidad pulpar	33
2.6.6 Limitaciones de las pruebas de sensibilidad pulpar	34
2.7 Pruebas de vitalidad pulpar.....	35
2.7.1 Flujometría de Láser Doppler	35
• Mecanismo de funcionamiento	36
• Análisis de Transformación Rápida de Fourier.....	39
• Profundidad de penetración del haz del láser doppler	40
• Indicaciones de uso de la flujometría láser doppler	40
• Limitaciones y factores influyentes de la flujometría de láser doppler.....	42
• Confiabilidad de la flujometría láser doppler	45
2.7.2 Pulsioximetría	45
• Limitaciones y factores influyentes de pulsioximetría	47
2.7.3 Medición de la temperatura:.....	48
• Limitaciones y factores influyentes de la medición de temperatura	49
2.7.4 Sensibilidad y especificidad de las pruebas de vitalidad.....	49
2.8 Diagnóstico Histológico.....	50
2.8.1 Clasificación de histología según diagnóstico	50
2.9 Respuesta inflamatoria e inmune de la pulpa dentaria frente a una noxa.....	51
2.10 Diagnóstico molecular	54

2.11	Fluido Dentinario	55
2.12	Membrana de fluoruro de polivinilideno	56
2.13	Biomarcadores	56
2.13.1	Citoquinas	57
2.13.2	Quimioquinas	58
•	Interleuquina 1 α (1IL-1 α)	58
•	Interleuquina 1 β (1IL-1 β)	59
•	Interleuquina 8 (IL- 8)	59
•	Interleuquina 6 (IL-6)	59
•	Interleuquina 10 (IL-10)	60
2.13.3	Las metaloproteinasas (MMP)	60
•	Metaloproteinasas 3 (MMP -3)	61
•	Metaloproteinasas 9 (MMP-9)	61
•	Metaloproteinasas 8 (MMP-8)	61
•	Metaloproteinasas 2 (MMP-2)	61
2.13.4	Factores de Crecimiento	62
•	Factor de necrosis tumoral- α (TNF - α)	62
•	Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)	63
•	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	63
3	HIPÓTESIS	66
3.1	Nula	66
3.2	Experimental	66
4	OBJETIVOS	68
4.1	Objetivo General	68
4.2	Objetivos Específicos	68
5	METODOLOGÍA	70
5.1	Diseño del estudio	70
5.2	Aspectos éticos	70
5.3	Tamaño de la muestra	70
5.4	Muestra	71
5.5	Criterios de Inclusión y exclusión	71
5.5.1	Criterios de Inclusión	71
•	Pacientes	71
•	Dientes	71
5.5.2	Criterios de Exclusión	72
•	Pacientes	72
•	Dientes	72
5.6	Grupos experimentales	72
5.7	Categorización de las muestras	73
5.8	Técnica de recolección de la información	74
5.9	Diagnóstico clínico	74
5.9.1	Protocolo de las pruebas de sensibilidad	74
•	Protocolo de la prueba del frío:	74
•	Interpretación de la prueba del frío:	75
•	Protocolo de la prueba de calor:	76
•	Interpretación de la prueba del calor:	77
•	Protocolo de Prueba eléctrica:	77
•	Interpretación de la prueba eléctrica:	78
5.9.2	Protocolo pruebas de la prueba de vitalidad	78
5.9.3	Interpretación de la prueba de vitalidad	80
5.9.4	Sesgos	80
5.10	Relación entre pruebas de sensibilidad versus prueba de vitalidad	81

5.11	Preparación de membrana Durapore para tomar muestras de fluido dentinario.....	81
5.12	Protocolo de toma de muestra de fluido dentinario	82
5.13	Preparación de las muestras.....	84
5.14	Determinación de la concentración total de proteínas.....	84
5.15	Histología de la pulpa.....	86
5.15.1	Protocolo toma de muestra para realizar análisis histológico del tejido pulpar	86
5.15.2	Procesamiento histológico	86
5.15.3	Microscopia óptica.....	87
5.15.4	Análisis cualitativo	87
5.16	Biomarcadores seleccionados	88
5.17	Determinación de los niveles de biomarcadores.....	89
5.18	Plan de análisis estadístico	94
6	RESULTADOS	97
6.1	Relación entre pruebas de sensibilidad y de vitalidad	97
6.2	Determinación de la concentración total de proteínas.....	99
6.3	Relación entre los diagnósticos clínicos versus histología.....	102
6.4	Determinación de los biomarcadores	106
7	DISCUSIÓN.....	127
7.1	Limitaciones del estudio.....	139
8	CONCLUSIONES	142
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	144
10	FUENTE DE FINANCIAMIENTO	145
11	DATOS RELEVANTES DURANTE EL PERIODO DE DESARROLLO DEL PROYECTO	146
12	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DURANTE EL DESARROLLO DEL PERIODO DOCTORAL.....	147
13	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
14	ANEXOS	156
14.1	ANEXO 1. Aprobación de la Comisión Académica de Doctorado.	156
14.2	ANEXO 2. CER proyecto de tesis.	157
14.3	ANEXO 3. Carta aceptación incorporación como tutor del Dr. Lluís Guiner.	158
14.4	ANEXO 4. Carta del departamento de Innovación y Desarrollo (I+D) de la Universidad de los Andes.....	159
14.5	ANEXO 5. Carta aprobación comité de ética Metropolitano Oriente.	160
14.6	ANEXO 6. Carta aprobación comité de ética Centro de Salud Universidad de los Andes (CESA).	161
14.7	ANEXO 7. Carta autorización jefe de servicio CESA.....	162
14.8	ANEXO 8. Consentimiento informado.	163
14.9	ANEXO 9. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de sensibilidad.	164
14.10	ANEXO 10. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de vitalidad con láser doppler.....	165
14.11	ANEXO 11. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de sensibilidad.	166
14.12	ANEXO 12. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de toma de muestra de Micro BCA.	167

14.13 ANEXO 13. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) toma de fluido dentinario.....	168
14.14 ANEXO 14. Adjudicación PMI.	169
14.15 ANEXO 15. Resumen IADR 2016.	170
14.16 ANEXO 16. Presentación Bruselas 2017.	171
14.17 ANEXO 17. Libro resumen presentación Bruselas 2017.	172
14.18 ANEXO 18. Presentación Universidad Diego Portales (UDP).....	173
14.19 ANEXO 19. Presentación jornadas Universidad de los Andes 2016.	174
14.20 ANEXO 20. Resumen IADR 2017.	175
14.21 ANEXO 21. Paper Biodentine.....	176
14.22 ANEXO 22. Ficha registro pacientes.....	177
14.23 ANEXO 23. Paper Forense.	178
14.24 ANEXO 24. Paper L-PRF.	179
14.25 ANEXO 25. Paper Encía.	180
14.26 ANEXO 26. Tabla Histología.....	181
14.27 ANEXO 27. Jornadas Científicas En Salud.	182

INDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS

FIGURA 1. ILUSTRACIÓN DEL MOVIMIENTO DEL FLUIDO DENTINARIO AL INTERIOR DE LOS TÚBULOS DENTINARIOS EN RESPUESTA A UN ESTÍMULO CALIENTE (FLECHA ROJA) Y A UNO FRÍO (FLECHA AZUL). FUENTE. (11).....	23
FIGURA 2, DEFINICIÓN DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO Y PRECISIÓN DE LAS PRUEBAS DE LA PULPA. FUENTE (5).....	28
FIGURA 3, ENVASE DE AEROSOL REFRIGERANTE COMPRIMIDO, DICLORODIFLUORMETANO (ENDRO-ICE, COLTENE).....	30
FIGURA 4, VARILLA DE NIEVE DE DIÓXIDO DE CARBONO EN SU APLICADOR SOBRE UN DIENTE. FUENTE (31).	31
FIGURA 5, VARILLA DE GUTAPERCHA APLICADA SOBRE UN DIENTE. FUENTE (31).	31
FIGURA 6, UN DIENTE AISLADO SOMETIÉNDOSE A UNA PRUEBA ELÉCTRICA PULPAR. EL ASA EN EL LABIO DEL PACIENTE COMPLETA EL CIRCUITO. FUENTE (31).....	32
FIGURA 7, FOTONES DE LUZ REFLEJADOS POR ERITROCITOS EN MOVIMIENTO Y POR LOS TEJIDOS ESTÁTICOS, AMBOS DETECTADOS POR LA FIBRA AFERENTE DE LA Sonda. FUENTE (51).....	37
FIGURA 8, FOTONES DE LUZ REFLEJADOS POR ERITROCITOS EN MOVIMIENTO Y POR LOS TEJIDOS ESTÁTICOS, AMBOS DETECTADOS POR LA FIBRA AFERENTE DE LA Sonda. FUENTE MANUAL DEL USUARIO 8. MOORVMS-LDF (53) 37	37
FIGURA 9, LA SEÑAL DE FLUJO ES OBSERVADA EN FORMA NUMÉRICA MEDIANTE UNIDADES DE PERFUSIÓN EN LA PANTALLA DEL EQUIPO LÁSER DOPPLER Y EN FORMA DE GRÁFICO A TRAVÉS DEL SOFTWARE MOOR VMS-PC (MOOR INSTRUMENTS LTD) (53).....	38
FIGURA 10, GRÁFICO DE UNIDADES DE PERFUSIÓN EN EL TIEMPO, DONDE SE OBSERVAN PICOS DE FLUJO SANGUÍNEO....	39
FIGURA 11, COMPARACIÓN GRÁFICA DE UNIDADES DE PERFUSIÓN DE DIENTE VITAL (EN ROJO) Y DIENTE NO VITAL (NEGRO) DONDE NO SE OBSERVAN PICOS CON CARACTERÍSTICAS PULSÁTILES.....	39
FIGURA 12, SONDA POSICIONADA A 3MM DEL MARGEN GINGIVAL.....	44
F 46	
TABLA 1, INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA ELÉCTRICA	78
FIGURA 14, CALIBRACIÓN DE LA Sonda.....	79
FIGURA 15, PACIENTE EN POSICIÓN SUPINA CON FÉRULA Y Sonda CONECTADA A EQUIPO.	79
FIGURA 16, SE OBSERVAN DESTACADOS 3 PICOS PULSÁTILES.	80
FIGURA 17, PREPARACIÓN DE PAPEL DURAPORE® PARA SU UTILIZACIÓN. EN LA IMAGEN A, SE OBSERVAN LOS MATERIALES NECESARIOS PARA ESTE PROCEDIMIENTO. EN LA IMAGEN B, SE OBSERVA EL CORTE EN ¼ PARA SER POSICIONADO CORRECTAMENTE EN LA CAVIDAD. EN LA IMAGEN C SE OBSERVA EL PAPEL YA ESTERILIZADO Y LISTO PARA SU UTILIZACIÓN.	82
FIGURA 18, MEMBRANA DURAPORE FORMATO DE VENTA Y MICROSCOPIA DONDE SE OBSERVA LA POROSIDAD DE LOS FILTROS DE MEMBRANA. FUENTE (133) MERCK MILLIPORE, BILLERICA, MA, USA.....	82
FIGURA 19, REPRESENTACIÓN DE UNIÓN DEL ANTICUERPO SELECCIONADO SEGÚN PROTEÍNA CON “BEADS” DEL ESTUDIO LUMINEX®. SE OBSERVA CÓMO EL ANALITO ES POSICIONADO EN EL POCILLO Y SE UNE CON EL ANTICUERPO ESPECÍFICO QUE DARÁ LA FLUORESCENCIA.	90
FIGURA 20, LÁSER DEL EQUIPO LUMINEX® LEYENDO ANALITOS. PROCESO DE MEDICIÓN ANTÍGENO – ANTICUERPO CON LÁSER BIFÁSICO. A: EQUIPO LUMINEX® TOMANDO LA MUESTRA PARA SER LEÍDA. B: REPRESENTACIÓN DE LA UNIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO FOTOACTIVADA. C: REPRESENTACIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO SIENDO DESPLAZADA POR EL TUBO DE LECTURA. D: GRACIAS A UN SISTEMA DE IMÁN SE PRODUCE EL DESPLAZAMIENTO DEL ANALITO.	90
FIGURA 21, SOFTWARE xPONENT Y LAS REGIONES LEÍDAS SEGÚN EL ANALITO A INVESTIGAR. SE PUEDE OBSERVAR COMO LOS ANALITOS LEÍDOS CALZAN DENTRO DE LAS REGIONES.	91
FIGURA 22, LA CURVA SE CONSTRUYE TOMANDO LOS VALORES DE MFI (FLUORESCENCIA) VS EXPECTED (VALOR ESPERADO PARA CADA PUNTO).....	91
FIGURA 23, TABLA ENTREGADA POR EL FABRICANTE PARA LOS PUNTOS DE CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESPECÍFICA PARA CADA KIT	92
FIGURA 24, MUESTRAS POSICIONADAS Y LÁSER DE LECTURA LISTO PARA MEDICIÓN DE ANALITOS	93
TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRA SEGÚN SEXO Y DIAGNÓSTICO SEGÚN LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PULPAR.....	97
TABLA 3, DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN EDAD.	97
TABLA 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS UP SEGÚN DIAGNÓSTICO.	98
TABLA 5. UP DE PULPA NORMAL VS PULPITIS REVERSIBLE.	98
TABLA 6. UP DE PULPA NORMAL VS PULPITIS IRREVERSIBLE.....	99
TABLA 7. UP DE PULPITIS REVERSIBLE VS PULPITIS IRREVERSIBLE.	99
TABLA 8. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN SEXO.	100
TABLA 9. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN TIPO DE DIENTE.	100
TABLA 10. DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS SEGÚN DIAGNOSTICO SUS FRECUENCIAS Y PORCENTAJES.	101

TABLA 11. RESUMEN DE PROMEDIOS, MEDIANAS, MÍNIMOS Y MÁXIMOS DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SEGÚN DIAGNÓSTICO DEL DIENTE. VALORES MEDIDOS EN MG/ML.....	101
GRÁFICO 1. GRÁFICO SCATTER DOT QUE MUESTRA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE LOS TRES GRUPOS DE PULPA NORMAL, PULPITIS REVERSIBLE Y PULPITIS IRREVERSIBLE EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS EN MG/ML.....	102
FIGURA 25. CORTE DE PULPA NORMAL AUMENTO 40X TINCIÓN DE HE. SE OBSERVÓ PRESENCIA DE NÚCLEOS DE FIBROBLASTOS (FLECHA 1). TAMBIÉN SE IDENTIFICARON NÚCLEOS DE CÉLULAS CILÍNDRICAS CORRESPONDIENTES A ODONTOBLASTOS (FLECHA 2).....	103
FIGURA 26. CORTE DE PULPA NORMAL AUMENTO 40X TINCIÓN T DE MASSON: SE OBSERVÓ TEJIDO CONECTIVO LAXO CON UN GRAN NÚMERO DE NÚCLEOS DE FIBROBLASTOS (FLECHA 1). LAS FIBRAS COLÁGENAS SE ENCONTRABAN EN SU MAYORÍA EN EL CENTRO DEL TEJIDO EN FORMA DE PEQUEÑAS FIBRAS ONDULADAS (FLECHA 2). ADEMÁS SE OBSERVARON VASOS SANGUÍNEOS DE PEQUEÑO LÚMEN (FLECHA 3).....	103
FIGURA 27. CORTE DE PULPA NORMAL AUMENTO 40X TINCIÓN DE VAN GIESON: SE OBSERVÓ TEJIDO CONECTIVO LAXO CON UN ALTO NÚMERO DE NÚCLEOS FUSIFORMES CORRESPONDIENTES A FIBROBLASTOS (FLECHA 1). LAS FIBRAS COLÁGENAS SE CONCENTRABAN EN EL CENTRO DE TEJIDO (FLECHA 2), LAS CUALES SE OBSERVABAN DE FORMA ORDENADAS Y ORGANIZADAS EN FIBRAS DELGADAS. NO SE OBSERVAN SIGNOS DE LICUEFACCIÓN.....	104
FIGURA 28. CORTE DE PUPITIS IRREVERSIBLE AUMENTO 40X, TEÑIDA T MASSON: SE OBSERVARON GRANDES MANOJOS DE FIBRAS COLÁGENAS (FLECHA 1).....	104
FIGURA 29. CORTE DE PUPITIS IRREVERSIBLE AUMENTO 40X, TEÑIDA CON HE. SE OBSERVÓ EL TEJIDO PULPAR CON ZONAS DE LICUEFACCIÓN DONDE EXISTÍA PÉRDIDA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SIGNOS DE CARIOLISIS (FLECHA 1) Y OTRAS ZONAS CON TEJIDO LAXO CONSERVADO (FLECHA 2). ADEMÁS SE OBSERVARON NÚCLEOS CON MORFOLOGÍA CIRCULAR MUY PEQUEÑOS COMPATIBLES CON LINFOCITOS (FLECHA 3).....	105
FIGURA 30. CORTE DE PUPITIS IRREVERSIBLE AUMENTO 40X, TEÑIDA CON T MASSON. SE OBSERVÓ UN TEJIDO PULPAR MUY VASCULARIZADO (FLECHA 1), ESTOS VASOS AÚN CONSERVABAN SUS GLÓBULOS ROJOS (FLECHA 2), ADEMÁS SE EVIDENCIA LA PRESENCIA DE FIBRAS COLÁGENAS ABUNDANTES (FLECHA 3).....	105
FIGURA 31. CORTE DE PUPITIS IRREVERSIBLE AUMENTO 40X, TEÑIDA CON VAN GIESON. SE OBSERVÓ UN TEJIDO CONECTIVO CON SIGNOS DE LICUEFACCIÓN (FLECHA 1). TAMBIÉN HUBO PRESENCIA DE NÚCLEOS DE FIBROBLASTOS BIEN CONSERVADOS (FLECHA 2).....	106
TABLA 12. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN SEXO Y DIAGNÓSTICO.....	107
TABLA 13. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN TIPO DE DIENTE EVALUADO Y DIAGNÓSTICO.....	108
TABLA 14. SE OBSERVA EL LOD Y LOQ DE CADA BIOMARCADOR EXPRESADOS EN PG/ML ENTREGADO POR EL FABRICANTE SEGÚN CADA KIT.....	109
TABLA 15. RESULTADOS DE CADA BIOMARCADOR OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS SOBRE LOD Y LOQ PARA LOS TRES DIAGNÓSTICOS. SE CONSIDERA EL VALOR MÍNIMO, MÁXIMO PROMEDIO Y MEDIANA, PARA CADA DIAGNÓSTICO.....	110
TABLA 16. RESULTADOS DE LOS BIOMARCADORES IL8, TIPM-1 Y MMP9 OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS, QUE SE EXPRESARON EN PULPITIS REVERSIBLE E IRREVERSIBLE SOBRE LOD Y LOQ. SE CONSIDERA EL VALOR MÍNIMO, MÁXIMO PROMEDIO Y MEDIANA, PARA CADA DIAGNÓSTICO.....	111
TABLA 17. RESULTADOS DE IL-6 SIENDO DETECTADO SÓLO EN PULPITIS IRREVERSIBLE EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS. SE CONSIDERA EL VALOR MÍNIMO, MÁXIMO PROMEDIO Y MEDIANA, PARA CADA DIAGNÓSTICO.....	111
NF: MUESTRAS DE FLUIDO GRUPO PULPA NORMAL, BAJO EL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	111
IF: MUESTRAS DE FLUIDO GRUPO PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA.....	111
TABLA 18. BIOMARCADORES BAJO EL LOQ.....	112
GRÁFICO 2. CONCENTRACIÓN DE FGF –ACID EN GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	113
GRÁFICO 3. CONCENTRACIÓN DE IL-1 α EN GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	113
GRÁFICO 4. CONCENTRACIÓN DE VEGF- α DE GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	114
GRÁFICO 6. CONCENTRACIÓN DE MMP-9 DE GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	115
GRÁFICO 7. CONCENTRACIÓN DE TNF - α DE GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	116
GRÁFICO 8. CONCENTRACIÓN DE IL -1 β DE GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	117
GRÁFICO 9. CONCENTRACIÓN DE TIMP -1 GRUPOS EXPERIMENTALES: PULPA NORMAL (G1), PULPITIS REVERSIBLE (G2) Y PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA (G3).....	117
TABLA 19. P-VALUE POR CADA ANALITO SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL.....	118
TABLA 20. MUESTRA EL DETALLE DEL COMPORTAMIENTO SEGÚN CURVA ROC (AUC).....	119

GRÁFICO 10. CURVA ROC PARA FGF –ACID	119
GRÁFICO 11. CURVA ROC PARA IL -1 α	120
GRÁFICO 12. CURVA ROC PARA VEGF - α	120
GRÁFICO 13. CURVA ROC PARA IL-8.....	121
GRÁFICO 14. CURVA ROC PARA MMP -9.	122
GRÁFICO 15. CURVA ROC PARA TNF - α	122
GRÁFICO 16. CURVA ROC PARA IL- 1 β	123
GRÁFICO 17. CURVA ROC PARA TIMP-1.....	123
GRÁFICO 18. CURVA ROC PARA IL -4.....	124
GRÁFICO 19. CURVA ROC PARA FGF ACID + IL -1 α :	125
FIGURA 32 DE POSIBLE KIT DIAGNÓSTICO "DIAGNO PULP". A: ABRIR EL TUBO PARA DILUCIÓN Y CON EL DISPENSADOR, TOMAR UNA MUESTRA DE FLUIDO DENTINARIO. B: INTRODUCIR EL DISPENSADOR EN EL DILUYENTE, CERRANDO EL TUBO. AGITAR PARA FACILITAR LA DISPERSIÓN DE LA MUESTRA. C: ROMPER LA PUNTA DEL VIAL. DEPOSITAR EXACTAMENTE 3 GOTAS EN LA VENTANA CIRCULAR "A" MARCADA CON UNA FLECHA. D: DEPOSITAR EXACTAMENTE 3 GOTAS EN LA VENTANA CIRCULAR "B" MARCADA CON UNA FLECHA. E: LEER EL RESULTADO A LOS 10 SEGUNDOS. F: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.	144

ABREVIATURAS

TPV: Terapia Pulpar Vital

IL: Interleuquinas

MMP: Metaloproteinasa de la matriz

PMN's: Polimorfos nucleares neutrófilos

FVP: Fracción de verdaderos positivos

FVN: Fracción de verdaderos negativos

TGF $-\beta$ 1: Factor de crecimiento tumoral

VEGF: Factor de crecimiento endotelial epitelial

CCL2/MCP1: Quimioquina ligando -2

IL -8: Interleuquina -8

CXCL: Quimioquina ligando 10

ENA 78 – CXCL5: Quimioquina derivada de neutrófilo epitelial

IL -1 β : Interleuquina -1 β

IL -2: Interleuquina -2

IL -4: Interleuquina-4

IL -6: Interleuquina -6

IL -10: Interleuquina -10

IL -11: Interleuquina -11

TNF - α : Factor de necrosis tumoral - α

CAM's: Moléculas de adhesión

RAGE: Receptores de productos de glicosilación avanzada

TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TLRs: Receptores tipo Toll

LTA: Ácido lipoteicoico

SP: Sustancia P

UP: Unidades de perfusión

LOQ: Límite de cuantificación

LOD: Límite de detección

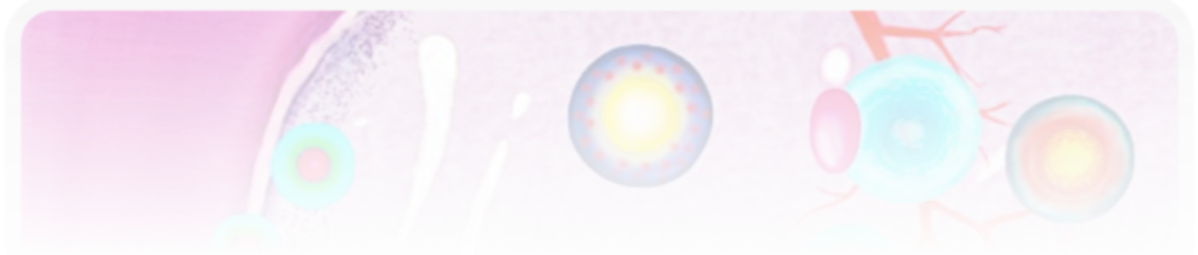
AUC: Área bajo la curva

ROC: Característica Operativa Relativa

BPC: Buenas prácticas clínicas

ICCC: Colaboración Internacional de Consenso de Caries

Justificación



1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En el estudio de la Carga Mundial de Morbilidad del año 2010, se determinó que las patologías bucales mantienen una alta prevalencia, afectando en conjunto a 3.900 millones de personas (1). Dentro de estas, la caries sin tratar en dientes definitivos, fue la condición más prevalente afectando a un total de 2.431 millones de individuos de la población mundial (1).

En Chile el panorama no es diferente. El estudio observacional realizado por Urzúa y cols, en el 2012, da cuenta de la situación de salud bucal de la población adulta chilena, indicando una alta prevalencia de la caries con un promedio de 4,2 lesiones cariosas por individuo entre los 35 y 44 años y de 1,44 para adultos entre los 65 y 74 años, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre géneros (2). Cuando la caries no recibe tratamiento, puede progresar hacia una inflamación pulpar irreversible (pulpitis irreversible) la que involucra la pérdida de la vitalidad pulpar (necrosis), además del desarrollo de una periodontitis apical (compromiso óseo infeccioso). Lamentablemente el diagnóstico de la patología pulpar es muy tardío y las herramientas clínicas, son imprecisas y subjetivas. Además, estas pruebas no permiten identificar estadios intermedios de inflamación pulpar, en los cuales la pulpa podría responder sin necesidad de su extirpación. Mejares (3) en su revisión sistemática concluyó que la evidencia disponible es insuficiente para determinar si la presencia, naturaleza y duración de los síntomas ofrecen información precisa sobre la extensión de la inflamación de la pulpa. Según cifras reportadas por la Asociación Americana de Endodoncia (AAE), la prevalencia de tratamientos de conductos radiculares, realizados en el transcurso de un año asciende a la cantidad de 15,1 millones de casos (4). Si asociamos a esta alta prevalencia, el costo anual que tiene la terapia endodóntica para países desarrollados como Estados Unidos, que es cerca de 15 mil millones de dólares al año, nos encontramos con un alto costo para el sistema de salud de este país. En Chile si bien no hay una completa información de la prevalencia de este tratamiento, los datos del Ministerio de Salud (MINSAL) reportan un total de 83.287 tratamientos de conductos realizados en el año 2012. Esto permite calcular que en el sector público se gastan alrededor de 11 millones de dólares al año. Debido a las razones mencionadas como la alta prevalencia y altos costos asociados, es que se requieren métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico antes de realizar este tratamiento. El diagnóstico molecular a través

de la determinación de biomarcadores relacionados con la inflamación pulpar del diente, podría representar un método innovador y objetivo que ayude al clínico frente a la disyuntiva del diagnóstico pulpar, evitando el sobre-tratamiento o sub-tratamiento endodóntico, disminuyendo el gasto público y privado en endodoncia.

1.1. Pregunta de Investigación

En relación al actual problema planteado, surge como interrogante la siguiente pregunta de investigación; ¿existe un perfil diferencial entre biomarcadores inflamatorios obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática?

1.2. Relevancia de la Investigación

La relevancia de esta investigación radica en la posibilidad de poder establecer un perfil diferencial de biomarcadores específicos y asociarlos con los diagnósticos de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática. De esta forma, se pretende innovar logrando una asociación entre los biomarcadores y el diagnóstico clínico. El objetivo es poder lograr así diagnósticos con mayor objetividad y por lo tanto tratamientos odontológicos más adecuados y predecibles en el tiempo. Recientes revisiones sistemáticas han reconocido el problema de los actuales métodos para establecer un diagnóstico pulpar, debido a que las herramientas utilizadas son subjetivas e imprecisas, ya que se limitan solamente a identificar el grado de sensibilidad del paciente a determinados estímulos (5,6) La gravedad y desventaja de no tener pruebas objetivas es que, frente a un diagnóstico incorrecto de pulpa enferma en estado irreversible, se debe indicar un tratamiento de extirpación pulpar, que generará la pérdida de la vitalidad del diente en forma innecesaria. Por otra parte, el no indicar un tratamiento en caso de que fuera necesario, podría traer inconvenientes para el paciente como un dolor agudo o una infección. Es por estas razones, que los métodos de diagnóstico mediante evaluación molecular utilizando biomarcadores, podrían dar respuesta a este problema.

A partir de lo anterior es posible postular que, los biomarcadores para el diagnóstico molecular de patologías en endodoncia podrían ser el futuro hacia a donde apunta la odontología del siglo XXI. Esta tecnología podría objetivar el diagnóstico pulpar, por medio de un test diagnóstico, con una toma de muestra poco invasiva, dado que se tomaría muestra de fluido dentinario previa a la

comunicación pulpar (o con una exposición pequeña). Se espera que esta prueba sea de mayor sensibilidad y especificidad que las que se realizan actualmente. De esta forma se beneficiaría al paciente, considerando el menor costo de un tratamiento conservador de la pulpa, frente a una endodoncia convencional. Otras ventajas asociadas a la disminución de la sobre indicación de terapias endodónticas convencionales, serían el menor tiempo clínico necesario para realizar estos tratamientos, además de la preservación de estructura dentaria y de las mejores propiedades biomecánicas que posee un diente vital (comparado con el tratado endodónticamente).

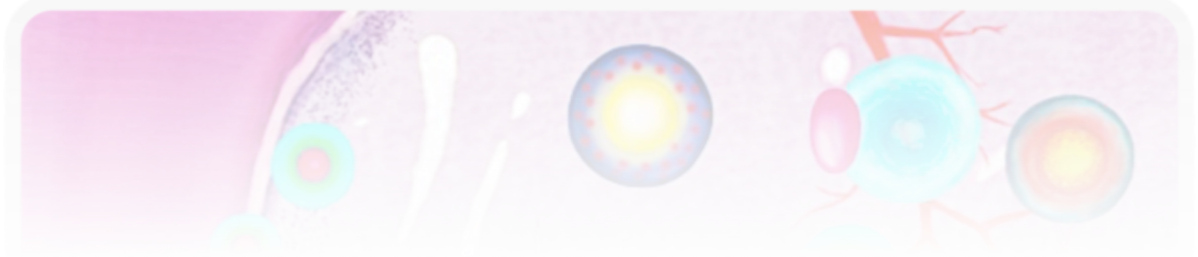
Por lo tanto, esta tesis Doctoral se configura como un compendio que busca triangular la información obtenida de las pruebas de sensibilidad, el diagnóstico clínico, las pruebas de vitalidad, la histología y los biomarcadores. Los objetivos planteados fueron los siguientes:

- En primer lugar, relacionar el diagnóstico clínico obtenido con las pruebas de sensibilidad pulpar de frío, calor y eléctrica, versus la prueba vitalidad utilizando láser Doppler.
- En segundo lugar, relacionar el diagnóstico clínico de pulpa normal y pulpitis irreversible obtenido con las pruebas de sensibilidad pulpar de frío, calor y eléctrica versus la histología.
- En tercer lugar, determinar la concentración de proteínas en muestras de fluido dentinario de dientes humanos con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática utilizando membrana de fluoruro de polivinilideno Durapore® (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a través del ensayo de Micro BCA.
- Finalmente, identificar y comparar la expresión de biomarcadores inflamatorios presentes en muestras de fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática mediante tecnología Luminex.

No existe en la literatura una investigación que considere la evaluación del grupo de biomarcadores como los propuestos en este estudio, asociados a inflamación pulpar. La idea final es proyectar el desarrollo de un prototipo diagnóstico, que complemente el actual diagnóstico clínico en el ámbito de la salud oral, para ser utilizado como herramienta diagnóstica por todos los odontólogos.

Debido a los hallazgos obtenidos en esta investigación, el Departamento de Innovación y Desarrollo (I+D) de la Universidad de los Andes solicitó postergar la publicación de estos resultados por la posibilidad de patentarlos (Anexo 4).

Marco Teórico



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Caries

La Colaboración Internacional de Consenso de Caries (ICCC), llegó a un acuerdo sobre la terminología, clasificación y recomendaciones clínicas para la eliminación de tejido cariado y para las lesiones de caries cavitadas. El foco de esta clasificación estaba en la textura de la dentina desmineralizada (7).

De esta forma se define la caries dental como una enfermedad que resulta de un cambio en la ecología del biofilm del diente, el cual pasa de una población equilibrada de microorganismos a una población microbiológica acidogénica, acidúrica y cariogénica, que es mantenida por el consumo frecuente de carbohidratos fermentables. El cambio de la actividad en el biofilm está asociado a un desequilibrio entre la desmineralización y remineralización, conduciendo a la pérdida de minerales de los tejidos duros del diente, siendo éste el signo y síntoma de una lesión de caries (8).

En consecuencia, la caries dental no es una enfermedad infecciosa que necesita ser curada mediante la eliminación de bacterias o, menos aún, de una especie bacteriana particular. En su lugar, el comportamiento de la caries dental puede ser manejado mediante el control de sus factores causales, el suministro de hidratos de carbono fermentables y la presencia y maduración de biofilms bacterianos. Sin embargo, si no se controla la actividad de las lesiones, el biofilm cariogénico promueve la progresión de la lesión, lo que eventualmente puede conducir a la inflamación crónica de la pulpa, produciéndose la necrosis pulpar y una periodontitis apical producida por la penetración de bacterias a la cavidad pulpar (9).

Dado que la caries actúa en un biofilm, la prevención de nuevas lesiones y el manejo de las lesiones existentes debiesen centrarse principalmente en el control, en lugar de la eliminación del tejido. A la vez, las restauraciones deberían apuntar a controlar el biofilm, proteger el complejo pulpo-dentinario y restaurar la función, la forma y la estética de los dientes, mientras que no causen daño innecesario. La eliminación de tejido cariado tiene como objetivo crear las condiciones para una restauración de larga duración, preservar tejido sano y remineralizable, lograr un buen sellado, mantener la salud pulpar y maximizar el éxito de la restauración. Sin embargo, esto no significa que cerca de la pulpa, todos los tejidos contaminados

por bacterias o desmineralizados deban ser eliminados. En lesiones profundas, en la cuales se mantiene la vitalidad pulpar, se recomienda una remoción selectiva de la dentina blanda. Se debe dejar tejido cariado blando sobre la pulpa, para evitar la exposición y estrés de ésta. Por el contrario, en el esmalte y la dentina de la periferia se debe eliminar todo el tejido contaminado, hasta encontrar tejido duro para permitir un buen sellado de la restauración (7).

El objetivo de eliminar la dentina contaminada superficial y restaurar el diente es promover reacciones fisiológicas en el órgano pulpo-dentinario, estimulando la aposición de dentina terciaria. Esta dentina actúa como una barrera frente a los productos bacteriológicos y por lo tanto, protege al tejido pulpar (10).

2.2 Inervación Pulpar

La pulpa dental es un tejido altamente vascularizado e innervado (11). El componente nervioso del tejido pulpar consta de fibras nerviosas sensitivas, las cuales provienen del V par craneal, llamado nervio trigeminal. Todo estímulo que provoque a estas fibras dará como resultado una sensación dolorosa (11).

Las fibras de tipo sensitivo pertenecen según su diámetro, velocidad de conducción y función, a dos grupos: las tipo A (*A-gamma* y *A-beta*), que son mielínicas, y las tipo C, que son amielínicas (12). Ambas fibras actúan como nociceptores contribuyendo a la función defensiva del tejido (11).

El 90% de las fibras tipo A corresponde a *A-gamma* y sus axones mielínicos son de un diámetro que varía entre 1 a 4 μm , tienen una rápida velocidad de conducción de 12 a 30 m/s y un bajo umbral de excitación (12). Transmiten un dolor de tipo agudo y punzante por su transmisión directa al tálamo. Su ubicación es superficial, preferentemente en la unión pulpo-dentinaria en la zona coronal y en los cuernos pulpares (11,12) Estas características las posicionan como las primeras fibras nerviosas en reaccionar y transmitir el impulso doloroso, cuando aún no existe daño tisular irreversible (10).

Las fibras tipo C son amielínicas, tienen un diámetro menor a 1 μm , una baja velocidad de conducción de 0,5 a 2 m/s y un alto umbral de excitación (11). Se ubican en el cuerpo pulpar y se extienden hasta la zona libre celular bajo la capa odontoblástica, se activan principalmente por calor, produciendo un dolor lento, difuso y duradero, debido a que son influenciadas por varias interneuronas moduladoras antes de enviar la información al tálamo (11). Las fibras tipo C

también difieren de las de tipo A, en su habilidad para mantener su integridad funcional cuando el tejido se vuelve hipóxico. Esto se debe a que el consumo de oxígeno es mayor en las fibras de mayor grosor, como las tipo A, lo que podría explicar el dolor percibido ocasionalmente durante la endodoncia de un diente con pulpa necrótica (11).

Las fibras nerviosas sensitivas de la pulpa dental ingresan a través del foramen apical, a menudo asociadas a vasos sanguíneos en una vaina de colágeno, formando el paquete vásculo-nervioso (11). Pocas bifurcaciones ocurren en el interior del conducto radicular, pero al alcanzar la pulpa cameral, las fibras nerviosas se comienzan a dividir y a enviar ramas a la dentina circundante (11) (13). Al acercarse a la región subodontoblástica, las fibras forman una red intrincada conocida como Plexo de Raschkow, aquí las fibras mielinizadas pierden su vaina de mielina y surgen como terminaciones nerviosas simples (13). Algunos estudios han revelado que muchas fibras nerviosas terminan en el espacio extracelular de la zona rica en células o en la capa de odontoblastos, mientras que otras se extienden en los túbulos de la preentina o dentina, pudiendo penetrarlos hasta 150 μm (13,14). Estas fibras intratubulares son más numerosas en la región de los cuernos camerales, donde se ha estimado su presencia en aproximadamente un 25% de los túbulos, mientras que en la raíz sólo el 10% de los túbulos contiene fibras nerviosas, tendiendo a ser más pequeñas y no se extienden más allá de la preentina (13).

2.3 Teorías del Dolor

2.3.1 Teoría de la activación de extensiones intradentinarias de los nervios pulpares

Esta teoría sugiere la existencia de terminaciones nerviosas en la dentina, las cuales pueden estimular directamente a la pulpa (15,16). Se basa en que las terminaciones nerviosas que están presentes en la pulpa dental, ingresan a través del foramen apical, se ramifican y forman el plexo de Rashkow en la periferia de la pulpa y en la zona celular subyacente; de aquí se extienden a la capa subodontoblástica y ocurre la arborización en la capa odontoblástica (13). Las fibras nerviosas forman asas, llegando algunas a la preentina o dentina, pudiendo penetrar una distancia no mayor a 150 μm (13). No existe suficiente evidencia científica que sustente que las fibras penetren hasta la unión amelo-

dentinaria (16), ya que los estudios ultraestructurales han mostrado que las fibras intratubulares se asemejan más a fibras simpáticas motoras, que a receptores sensoriales (16).

2.3.2 Teoría del mecanismo de transducción que considera al odontoblasto y a sus prolongaciones dentinarias

Esta teoría plantea que los odontoblastos pudieran funcionar como receptores. Por lo tanto, la estimulación de las prolongaciones odontoblásticas en la dentina periférica podría provocar cambios en el potencial de membrana de los odontoblastos, el cual permite a través de uniones sinápticas con las células nerviosas, la transmisión del impulso, y de este modo la sensación dolorosa (16) (17). Sin embargo, no se ha demostrado mediante microscopía electrónica de barrido la formación de complejos sinápticos entre los nervios pulpaes y los odontoblastos (18). Además, es importante destacar que desde el punto de vista embriológico el odontoblasto es una célula de origen mesodérmico y no neuronal (16). Otro factor que se opone a esta teoría es que no ha sido posible comprobar, a través microscopía electrónica de barrido, que las prolongaciones odontoblásticas se extiendan más allá de un tercio de la mitad de la longitud de los túbulos dentinarios (18). De esta forma, no se ha demostrado que el potencial de membrana generado por el odontoblasto sea el suficiente para producir un estímulo y, por lo tanto, un proceso excitable (16).

2.3.3 Teoría Hidrodinámica de Brännström

Aunque la mitad periférica de la dentina carece de nervios y de prolongaciones odontoblásticas, existe líquido en el interior de los túbulos dentinarios (16). Cambios en la función, presión o tensión sobre la superficie del túbulo dentinario, alteran el equilibrio hidrostático del fluido, generando una estimulación de los mecano-receptores pulpaes y de este modo convirtiendo la energía mecánica en eléctrica (16,19). Brännström en el año 1986, mediante sus estudios *in vivo*, entregó sustento a la teoría hidrodinámica, demostrando que el fluido dentinario, podría filtrarse a través de los túbulos sobre una superficie de dentina expuesta. Este movimiento del fluido se produjo a una velocidad calculada de 2 a 4 mm por segundo, lo que refleja que los túbulos dentinarios vacíos podrían ser rellenados en escasos segundos (19). La teoría hidrodinámica es válida en la medida que se produce un rápido flujo del fluido dentinario en el interior del túbulo, causado por

ciertos estímulos que provocan dolor en el diente (Figura 1) (16,19) . En los casos de la desecación de la dentina, la presencia de frío o soluciones hiperosmóticas generan un flujo del fluido hacia el exterior, y a través de un fenómeno mecano-receptor serían estimulados los odontoblastos y los nervios sensoriales causando la sensación dolorosa en el individuo (16,19). Por otro lado, la influencia del calor que causa dolor es más complicada que los casos anteriores. Aparentemente la aplicación de calor seco produce una evaporación del fluido dentinario y un cambio de movimiento hacia la pulpa; de este modo, la acumulación de presión sería reconocida como una sensación dolorosa (15,18).

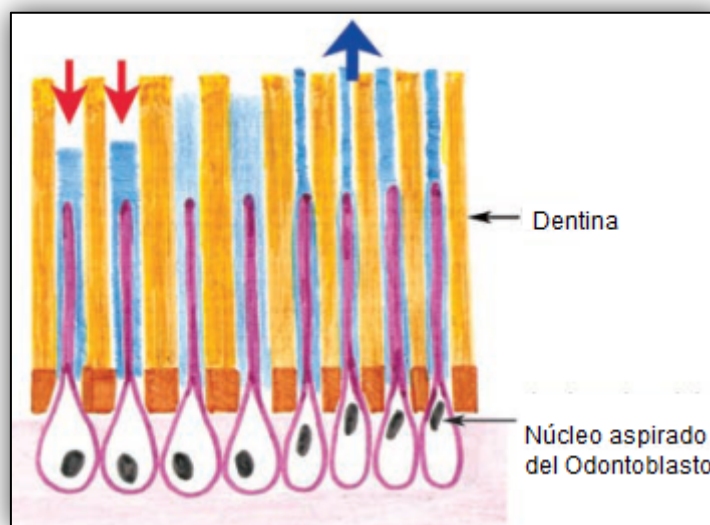


Figura 1. Ilustración del movimiento del fluido dentinario al interior de los túbulos dentinarios en respuesta a un estímulo caliente (flecha roja) y a uno frío (flecha azul). Fuente. (11).

La teoría hidrodinámica es la más ampliamente aceptada para explicar el fenómeno de sensibilidad dentinaria, sobre la base de la estimulación mecánica de las fibras *A-delta* en la unión pulpo-dentinaria o dentro de los túbulos dentinarios, causada por el resultado de un rápido flujo del fluido inducido por estímulos irritantes (16,19).

2.4 Diagnósticos clínicos en Endodoncia

2.4.1 Definición

El término diagnóstico proviene del concepto en griego, que relacionaba una enfermedad con una causa tangible, en lugar de ligarlo a la voluntad de un poder

superior (20) y se define como “el arte de distinguir una enfermedad de otra” o “el arte y la ciencia de la detección de las desviaciones de la salud, su causa y la naturaleza de ellas” (21,22)

Para poder realizar un adecuado diagnóstico en Endodoncia se debe obtener información sobre la historia de dolor o incomodidad del paciente, su experiencia de trauma o procedimientos restauradores, una exhaustiva evaluación clínica, resultados de pruebas clínicas y exámenes radiográficos del diente y de los tejidos que lo rodean (3).

En Octubre del año 2008 la Asociación Americana de Endodoncia (AAE), convocó a una conferencia para establecer un consenso en la terminología utilizada en el diagnóstico endodóntico, con el fin de unificar términos y minimizar las diferencias en los enfoques de diagnóstico terapéutico y de investigación en endodoncia, centrándose en los signos y síntomas presentados por el paciente. Los resultados de dicho consenso fueron publicados en Diciembre del 2009 en la revista Journal of Endodontics, en la que se estableció la siguiente terminología para el diagnóstico pulpar (23).

2.4.2 Pulpa Normal

Diagnóstico clínico en que la pulpa está libre de síntomas y responde en forma normal a los test de sensibilidad. Se han usado significados equivalentes como “pulpa vital asintomática” o “pulpa sana”. Pulpa normal pareciera ser un término relevante en la clínica. Las palabras vital y saludable son terminología inexacta debido a que la vitalidad pulpar no puede ser determinada a través de la exploración clínica o pruebas de sensibilidad, ya que la pulpa podría estar afectada y aun así responder de manera normal clínicamente (24,25).

La pulpa normal cumple con las siguientes características:

- Todos los signos clínicos están dentro de límites normales ya que el diente se encuentra asintomático.
- Dependiendo de la edad del diente, podría o no haber evidencia de calcificaciones pulpares o fibrosis pulpar.
- La pulpa generalmente responderá a las pruebas térmicas (frío) o a estímulos eléctricos. La respuesta no va a persistir por más de unos segundos.
- Por lo general no responden en forma dolorosa al calor.

- Percusión, palpación y pruebas de mordida no provocan dolor.
- Radiografía sin alteraciones.

2.4.3 Pulpitis Reversible

Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican la existencia presencia de inflamación pulpar leve que podría resolverse (y la pulpa volver a su estado normal) si se elimina el factor irritante (24–26).

Características:

- Este estado puede deberse a la presencia de caries, trauma, restauraciones nuevas o defectuosas.
- Se caracteriza por una respuesta dolorosa de leve a mediana intensidad frente a los estímulos (generalmente pruebas térmicas pero también puede ser provocada en la masticación).
- El dolor se resuelve en cuestión de segundos después de la eliminación del factor irritante.
- No hay respuesta a la percusión o la palpación.
- La pulpitis reversible debe distinguirse clínicamente de la hipersensibilidad dentinaria.

2.4.4 Pulpitis Irreversible Sintomática

Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de lograr reparar. Estado pulpar que implica la presencia de un proceso degenerativo más severo en que la pulpa no es capaz de retornar a la normalidad. Si la pieza no es tratada se generará necrosis pulpar seguido de una periodontitis apical (24,25,27,28).

Características:

- Dolor leve a severo que persiste después de la eliminación del estímulo o que se produce de manera espontánea.
- Dolor cuando se expone a estímulos térmicos (calor y/o frío). El dolor puede ser agudo o sordo dependiendo del tipo de fibras nerviosas pulpares que respondan.
- La etiología de la pulpitis irreversible puede ser caries profundas, restauraciones, exposiciones pulpares, fracturas o “*cracks*”
- Dolor espontáneo y referido.

- El diente puede o no responder a la percusión.
- Radiográficamente, podría observarse el agente etiológico (caries profundas). En ocasiones si la inflamación se ha extendido a la zona periapical, se puede observar ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal u osteítis condensante.

2.4.5 Pulpitis Irreversible Asintomática

Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de reparar. Sin síntomas, pero con inflamación irreversible de la pulpa que se produce por caries, trauma. Sin tratamiento progresa a necrosis pulpar (26).

Actualmente para realizar el diagnóstico de dichas patologías, se utilizan métodos diagnósticos en base a evaluar la “sensibilidad” pulpar más que la vitalidad.

2.4.6 Necrosis Pulpar

Es una categoría de diagnóstico clínico que indica la muerte de la pulpa dental, originada por una pulpitis irreversible no tratada, una lesión traumática o cualquier circunstancia que origine una interrupción prolongada del suministro de sangre a la pulpa (23).

Usualmente el paciente no responde a las pruebas de sensibilidad endodónticas, y se encuentra asintomático a menos que la inflamación haya progresado al tejido perirradicular (21,23).

2.5 Pruebas diagnósticas

Los sistemas de pruebas más comúnmente utilizados no evalúan realmente la vitalidad pulpar y la mayoría no indican la presencia o severidad del proceso inflamatorio, se utilizan dado que la reproducción de los síntomas, su localización y categorización de su severidad, es una respuesta subjetiva y algunos pacientes pueden tender a exagerar su dolor (29). Es importante destacar las diferencias entre:

2.5.1 Test de vitalidad pulpar

Evalúa el suministro sanguíneo pulpar. El tejido pulpar tiene un suministro vascular adecuado, pero éste no está necesariamente inervado. La mayoría de las pruebas pulpares no evalúan directamente la vascularización de la pulpa (29).

2.5.2 Test de sensibilidad pulpar

Este test evalúa la respuesta sensorial pulpar. La sensibilidad es definida como la habilidad de responder a un estímulo, siendo este término apropiado para los test pulpares eléctrico y térmicos.

Las pruebas clínicas más populares son los test de sensibilidad pulpar, como las pruebas térmicas y eléctricas, sin embargo, estas pruebas no nos proporcionan información directa respecto al suministro sanguíneo pulpar, requerido para una verdadera evaluación de la vitalidad pulpar.

Idealmente, los métodos usados para evaluar la pulpa dental deberían ser no invasivos, objetivos, no provocar dolor, de confianza, reproducibles, estandarizados, fáciles de realizar y de bajo coste económico (3).

Para efecto de una prueba diagnóstica, es necesario definir qué se entiende por especificidad, sensibilidad, valor predictivo y exactitud.

2.5.3 Sensibilidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. La sensibilidad también se conoce como “fracción de verdaderos positivos (FVP)” (5).

2.5.4 Especificidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sujetos sanos. También es denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)” (5).

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, éstos carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo), en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información a priori acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo

(negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (sano)? De esta forma, aparecen los conceptos de valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud para responder mejor a estas preguntas (5) (Figura 2).

2.5.5 Valor predictivo positivo

Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resulten estar enfermos (5) (Figura 2).

2.5.6 Valor predictivo negativo

Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba (5) (Figura 2).

2.5.7 Exactitud

Es el grado en que una prueba clasifica correctamente la respuesta del paciente (5). (Figura 2).

		Condition		
		Clinically normal pulp	Necrotic pulp or pulpless tooth	
Test outcome	Positive	True positive (TP)	False positive (FP)	⇒ Positive predictive value $[TP/(TP+FP)]$
	Negative	False negative (FN)	True negative (TN)	⇒ Negative predictive value $[TN/(TN+FN)]$
		↓ Sensitivity $[TP/(TP+FN)]$	↓ Specificity $[TN/(TN+FP)]$	Accuracy $[(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)]$

Figura 2, Definición de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y precisión de las pruebas de la pulpa. Fuente (5).

2.6 Pruebas de sensibilidad pulpar

2.6.1 Test de frío

Varios métodos han sido usados para aplicar frío a los dientes, sin embargo los más empleados para esta prueba son la varilla de hielo, gases comprimidos y la

nieve carbónica, siendo la principal diferencia entre ellos el grado de temperatura alcanzado (30,31).

- Varilla de hielo: para obtener las varillas de hielo, se pueden cargar de agua unas fundas de plástico de agujas hipodérmicas y se dejan en el congelador. Antes de realizar la prueba, se retira una cubierta del congelador y se temple un poco manteniéndola en la mano durante unos minutos o ubicándola brevemente bajo un grifo de agua, de ese modo se funde el exterior de la varilla y se puede retirar el plástico para usarla envuelta en una compresa de gasa (31,32). La varilla de hielo se aplica inmediatamente en el tercio medio de la superficie vestibular de la corona del diente, o en cualquier superficie metálica expuesta de la corona protésica, manteniéndose en contacto con el diente durante 5 segundos o hasta que el paciente comienza a sentir dolor (32).
- Gases comprimidos: el Cloruro de etilo se encuentra disponible en forma de pulverizador comprimido, y se emplea con frecuencia en medicina como un refrigerador cutáneo, su temperatura de ebullición es -4° Celsius (31). No se recomienda emplearlo para pruebas de la pulpa, debido a que resulta menos efectivo que la nieve de dióxido de carbono o el diclorodifluorometano. El diclorodifluorometano, conocido en el comercio como refrigerante R-12 y presentado como un pulverizador comprimido (Endo-Ice®), tiene un punto de ebullición de -44° C, la cual fue prohibida en Estados Unidos el 1 enero de 1986, por la Clean Air Act, debido a su efecto perjudicial por el medio ambiente; sin embargo su utilización aún es permitida en varios países (31) (Figura 3). Frente a esta restricción, el fabricante lo ha sustituido por el 1,1,1,2-tetrafluoroetano, el refrigerante R-134a, un producto sin fluorocarbono que se comercializa bajo el nombre Green Endo-Ice, con un punto de ebullición de $-40,4^{\circ}$ C (31,33–35). El modo de utilización consiste en pulverizar el material en forma abundante sobre una bolita de algodón, que después se aplica en el tercio medio de la superficie vestibular del diente, la bolita de algodón se mantiene en contacto con la corona durante 5 segundos o hasta que el paciente comienza a sentir dolor (36).



Figura 3, Envase de aerosol refrigerante comprimido, diclorodifluormetano (Endro-Ice, Coltene).

Nieve de dióxido de carbono (Figura 4): tiene una temperatura extremadamente fría de menos 77°C . El dióxido es liberado desde un cilindro de gas, y se comprime para producir una varilla (31). A través de un aplicador especial se ubica en el tercio medio de la superficie vestibular de la corona, y se mantiene en contacto durante 2 segundos o hasta que el paciente comienza a sentir dolor (31) (37,38). No produce efectos perjudiciales sobre el tejido pulpar con vitalidad y no origina fisuras ni irregularidades superficiales en el esmalte del diente evaluado (31). Esta prueba en conjunto con el tetrafluoroetano, parecen ser más eficaces que el cloruro de etilo en estimular un diente vital, debido a su mayor reducción de temperatura (31,39).



Figura 4, Varilla de nieve de dióxido de carbono en su aplicador sobre un diente. Fuente (31).

2.6.2 Test de calor

Al igual que la prueba con frío, se han sugerido muchos métodos para la prueba de dientes con calor. Si bien todos transfieren calor al diente, los más utilizados son las varillas de material de obturación temporal, el baño de agua caliente y las copas de goma para pulir (31,36).

- Material de obturación temporal (Figura 5): consiste en varillas de gutapercha. Para utilizar esta técnica, los dientes a evaluar se protegen primero con una ligera capa de vaselina para evitar que se adhiera la gutapercha, la gutapercha se calienta sobre una llama hasta que se ablanda y comienza a brillar, pero sin que llegue a fundirse y se haga demasiado blando para utilizarlo. La aplicación en el tercio medio de la superficie vestibular de la corona, suele provocar una respuesta en menos de dos segundos.



Figura 5, Varilla de gutapercha aplicada sobre un diente. Fuente (31).

Se cree que con esta técnica se puede alcanzar una temperatura, en la superficie del diente, que varía entre los 90°C y 150°C, la gutapercha se ablanda a los 65°C y puede ser calentada hasta 200°C en determinados dispositivos de suministro (31). Un calor prolongado puede resultar en una estimulación bifásica de las fibras nerviosas, donde inicialmente se estimularán las fibras A-delta y posteriormente de las fibras tipo C, resultando en un dolor persistente (31). Por lo que se recomienda, no aplicar por más de 5 segundos (31).

- Baño de agua caliente: el baño con agua caliente requiere el aislamiento con dique de goma del diente que se va a probar. El diente se baña con agua muy caliente, inyectada con una jeringa de plástico, durante 5 segundos o hasta que el paciente comienza a sentir dolor. El empleo de agua consume bastante tiempo, pero su exactitud es superior a la proporcionada por las varillas, además permite actuar sobre la corona completa y no sólo en una sección del diente.
- Copa de goma: se puede generar calor friccional usando una copa de goma para profilaxis, pero sin pasta profiláctica (31).

2.6.3 Test pulpar eléctrico

Mediante la aplicación de una corriente eléctrica en la superficie del diente, son estimuladas las fibras A-delta intactas del complejo pulpo-dentinario. Esto produciría un cambio iónico en el fluido dentinario, provocando la despolarización de la membrana de la fibra nerviosa y generando subsecuentemente un potencial de acción (6,31). Hasta el año 1950 los instrumentos para realizar la prueba eléctrica eran bipolares, mientras que hoy en día la mayoría de los equipos son monopolares (40). Los instrumentos bipolares consisten en ubicar dos electrodos en el diente, uno en la superficie vestibular y otro en la palatal/lingual en forma de pinza, generando una corriente eléctrica que pasa a través de la corona, de un electrodo a otro. Mientras que los equipos monopolares implican sólo un electrodo aplicado al diente y el paciente completa el circuito eléctrico sosteniendo un mango metálico del sistema o ubicándole un clip labial (6,40) (Figura 6).



Figura 6, Un diente aislado sometiéndose a una prueba eléctrica pulpar. El asa en el labio del paciente completa el circuito. Fuente (31).

Antes de realizar esta prueba, los dientes se deben aislar y secar con ayuda de una gasa. El área a evaluar se debe mantener seca mediante una aislación relativa, evitando de este modo los posibles falsos positivos o negativos, que son causados por una conducción eléctrica a los dientes vecinos. Si el diente tiene una restauración metálica, se debe aislar de modo absoluto con goma dique o colocar tiras de celuloide interproximales, para evitar de esta manera la conducción a los dientes adyacentes (6).

2.6.4 Correlación entre los resultados de los test pulpares eléctricos y el estado histológico

El punto más importante del uso de test pulpar eléctrico es la interpretación de sus resultados en conjunto con la historia del paciente, hallazgo de examinación clínica y radiográfica y la comparación con un diente control, porque variados estudios han demostrado que no existe correlación entre la respuesta positiva al test pulpar eléctrico y el estado histológico de la pulpa. Una respuesta positiva simplemente indica que las fibras sensoriales presentes en la pulpa pueden responder a la estimulación eléctrica. Los intentos de correlacionar las lecturas numéricas del test pulpar eléctrico con el estado pulpar histológico no han tenido resultados concluyentes (6). Por lo tanto, los dentistas no deben tratar de cuantificar y comparar la respuesta entre los dientes porque pueden existir otras variables que intervienen en el resultado.

El test eléctrico tiene una alta especificidad >90%, pero también una sensibilidad muy variable, entre 21 – 87% para diagnósticos de pulpitis irreversible. (3,6).

2.6.5 Valor predictivo de pruebas de sensibilidad pulpar

Las pruebas de diagnóstico en salud, tienen como objetivo obtener un resultado concreto de la verdadera condición del paciente en relación a una enfermedad; así en endodoncia un resultado positivo de una prueba indicará que un diente está necrótico, y un resultado negativo señalará a un diente como vital. Por lo tanto, el valor predictivo positivo de una prueba de sensibilidad pulpar, es la probabilidad de que un resultado positivo de prueba, un diente que no responde sensiblemente, representa a un diente con pulpa necrótica; y el valor predictivo negativo, es la probabilidad de que un diente con resultado negativo de prueba, un diente que presente una respuesta sensible, represente a un diente vital.

Peters (37) en su estudio clínico evaluó la habilidad de las pruebas térmicas y eléctricas para registrar la vitalidad pulpar. Sus resultados indicaron que la probabilidad que una reacción no sensible representara a una pulpa necrótica (valor predictivo positivo) fue del 89% para la prueba térmica del frío, 48% para la prueba térmica del calor y un 88% para la prueba de sensibilidad eléctrica. La probabilidad que una reacción sensible representara a un tejido pulpar vital (valor predictivo negativo) fue del 90% para la prueba del frío, 80% para la prueba del calor y del 84% para la prueba eléctrica. Así, la precisión fue del 86% para la prueba térmica del frío, 71% para la prueba del calor y del 81% para la eléctrica. Por otro lado, Villa en su estudio determinó que el valor predictivo positivo fue de 100% para las pruebas de sensibilidad frío, calor y eléctrico, mientras que el valor predictivo negativo fue del 90% para la prueba del frío, 89% para la del calor y del 83% para la eléctrica; concluyendo que la prueba del frío es el método más preciso, con un valor del 94%, para las pruebas de sensibilidad diagnósticas (41).

2.6.6 Limitaciones de las pruebas de sensibilidad pulpar

Algunas de las limitaciones de las pruebas de sensibilidad pulpar son las siguientes:

- Subjetividad, es decir, sólo miden la respuesta nerviosa pulpar y no el flujo sanguíneo de la pulpa, que es lo que realmente define la vitalidad.
- Las pruebas térmicas requieren de túbulos dentinarios permeables, que permitan el flujo del fluido dentinario de acuerdo con la teoría hidrodinámica (5). Por lo tanto estas pruebas no son eficaces en dientes de personas con edad avanzada, donde es más probable que los túbulos se encuentren obliterados por la formación de dentina secundaria y terciaria.
- Menor confiabilidad de los resultados en dientes con ápice inmaduro, debido a que el desarrollo completo del plexo de Rashkow no ocurre hasta el estado final de la formación radicular. Tampoco son confiable en dientes traumatizados, ya que pueden no responde a las pruebas térmicas ni eléctricas, incluso si la circulación sanguínea está restaurada.
- Falta de correlación con el estado histológico de la pulpa. Varios estudios han evaluado los resultados de las pruebas de sensibilidad junto al estado histológico del tejido pulpar, y no han encontrado una clara correlación entre estas variables (42–44).

- Dificultad para aplicar en niños, ya que ellos no siempre describen con exactitud y precisión los síntomas subjetivos o una respuesta a un estímulo. Además, estas pruebas son percibidas como desagradables, por lo cual los niños pueden modificar su comportamiento para evitar el estímulo doloroso.
- Restauraciones extensas, pulpas atróficas y excesivas calcificaciones son limitaciones para realizar e interpretar los resultados de las pruebas pulpares.
- Diferencia en la respuesta de los pacientes a las pruebas de sensibilidad. Éstas varían al ser aplicadas en distintos días y horas del mismo día, por lo que no son reproducibles.

2.7 Pruebas de vitalidad pulpar

El método ideal para evaluar la vitalidad pulpar debe ser no invasivo, indoloro, objetivo, económico, confiable y reproducible. Las pruebas utilizadas comúnmente para este procedimiento son las de sensibilidad, sin embargo, su mayor limitación es que monitorean indirectamente la vitalidad de la pulpa, a través de la respuesta nerviosa y no del sistema vascular, el cual es el medio más confiable para evaluar la vitalidad pulpar. Es más, los dientes con pulpa vital son aquellos con un suministro vascular adecuado. Por lo tanto, ha sido propuesto el estado circulatorio del tejido pulpar para evaluar la vitalidad del diente (45).

2.7.1 Flujiometría de Láser Doppler

La palabra láser proviene del acrónimo inglés LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) que significa “amplificación de luz por emisión estimulada de radiación”. Corresponde a un dispositivo electrónico, que basado en una emisión inducida, amplifica de manera extraordinaria un haz de luz monocromático, coherente y muy intenso, mediante la estimulación eléctrica o térmica de los átomos, moléculas o iones de un material (46).

La flujometría láser doppler es una técnica óptico-eléctrica no invasiva, que se utiliza ampliamente en distintas áreas de la medicina para evaluar el flujo sanguíneo de los sistemas micro-vasculares, tales como los de la retina, corteza renal, piel, mesenterio intestinal y membranas mucosas. Esta técnica ha demostrado tener un amplio potencial como método de evaluación de la vitalidad de los dientes, detectando la presencia o ausencia de fluido sanguíneo de la

pulpa dentaria. Otras aplicaciones odontológicas reportadas son en mediciones del ligamento periodontal, del fluido sanguíneo gingival o surcular en tejidos sanos o enfermos, evaluación del grado de cicatrización y revascularización de heridas quirúrgicas, de los efectos vasculares de los tratamientos ortodóncicos y de los efectos de la inyección de anestésicos con vasoconstrictores (47,48).

La aplicación exitosa de la flujometría láser doppler en dientes humanos, fue descrita por primera vez por Gazelius y colaboradores en el año 1986. Ellos fueron capaces de reconocer las oscilaciones regulares del latido del corazón en las lecturas del láser, y las correlacionaron con lecturas de electrocardiograma simultáneas. La flujometría láser doppler produjo fluctuaciones regulares de señal para los dientes con pulpa vital, que eran idénticas a las ondas del electrocardiograma. Los dientes con pulpas necróticas no mostraron señales sincrónicas, pero produjeron fluctuaciones irregulares muy pronunciadas que se atribuyeron a artefactos de movimiento (49).

- **Mecanismo de funcionamiento**

El efecto doppler es la base de la flujometría láser doppler. Este fenómeno físico se basa en los cambios de frecuencia que una determinada onda experimenta cuando es emitida, o en este caso, reflejada de un objeto que se aleja o acerca a un determinado observador (50). La flujometría láser doppler es un método de medición óptico que permite medir el número y velocidad de partículas transportadas por un fluido. Las partículas (1-206nm) deben ser lo suficientemente grandes para dispersar la luz emitida y a la vez poder detectarla, y lo suficientemente pequeñas para que puedan fluir adecuadamente (51,52).

La técnica de flujometría de láser doppler utiliza un haz de luz infrarroja, de 780 a 820 nm, o una luz cercana al infrarrojo de 632 nm (47). Este haz de luz láser es transmitido a través de la corona del diente por una sonda de fibra óptica ubicada en la superficie dentaria. El haz de luz sigue la dirección de los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios hasta los capilares presentes en la pulpa dental (51). Los fotones que son reflejados desde los eritrocitos en movimiento, se dispersan y su frecuencia cambia de acuerdo al principio doppler; mientras que aquellos fotones que interactúan con las células estacionarias del tejido, también se dispersan, pero su frecuencia de onda no se encuentra desplazada (48,51). (Figura 7).

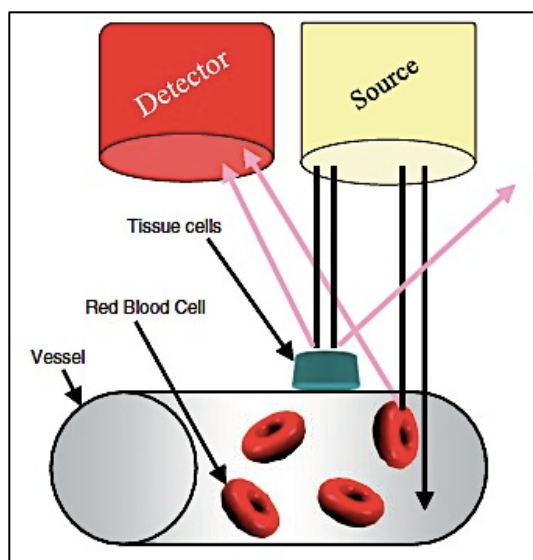


Figura 7, Fotones de luz reflejados por eritrocitos en movimiento y por los tejidos estáticos, ambos detectados por la fibra aferente de la sonda. Fuente (51).

La proporción de luz desplazada y no desplazada, dentro de la luz reflejada, arroja una medición semi-cuantitativa del flujo sanguíneo a través del tejido, la cual se devuelve por una fibra aferente dentro de la misma sonda para ser analizada por fotodetectores y producir una señal que es registrada como una salida de voltaje. La medida del voltaje es relacionada linealmente con el flujo sanguíneo llamado “Señal de flujo” y es expresada en unidades de perfusión (UP) arbitrarias, de acuerdo con un consenso general existente (47,51) (Figura 8).

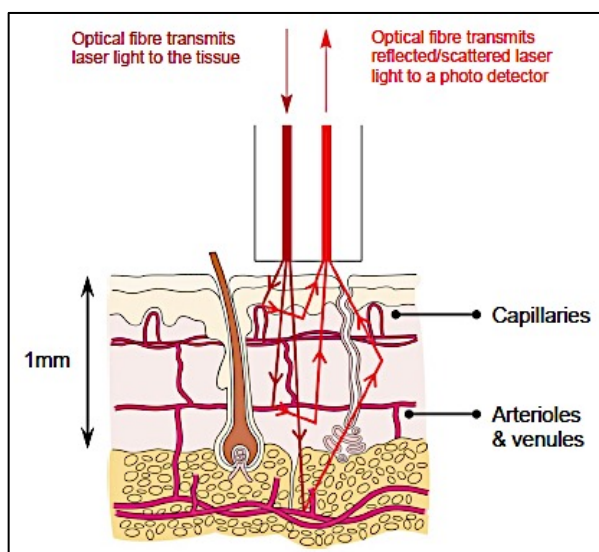


Figura 8, Fotones de luz reflejados por eritrocitos en movimiento y por los tejidos estáticos, ambos detectados por la fibra aferente de la sonda. Fuente Manual del usuario 8. MoorVMS-LDF (53)

Mediante un algoritmo y cálculo de información, el láser doppler determina un flujo o señal de flujo el cual puede simplificarse como el producto de la concentración de eritrocitos por la velocidad media que traen (54). Matemáticamente, la señal de flujo consiste en el número de eritrocitos por segundo por el promedio de las velocidades presentes. Si se busca determinar la vitalidad de un diente, la señal de flujo se puede comparar entre un diente control sabidamente vital y un diente sospechoso no vital. La señal de flujo en un diente reconocido como vital debería ser mayor que la de un diente no vital (51,55), siendo la señal de flujo de un diente necrótico en promedio un 42,7% menor al compararlo con dientes vitales (56).

Los aparatos disponibles en la actualidad muestran la señal en una pantalla, en la que el clínico debe interpretar si la pulpa está viva, sana o muerta. La precisión de la valoración de la vitalidad de la pulpa depende de variables del aparato y puede mejorar mediante el análisis matemático de la señal (51) (Figura 9).

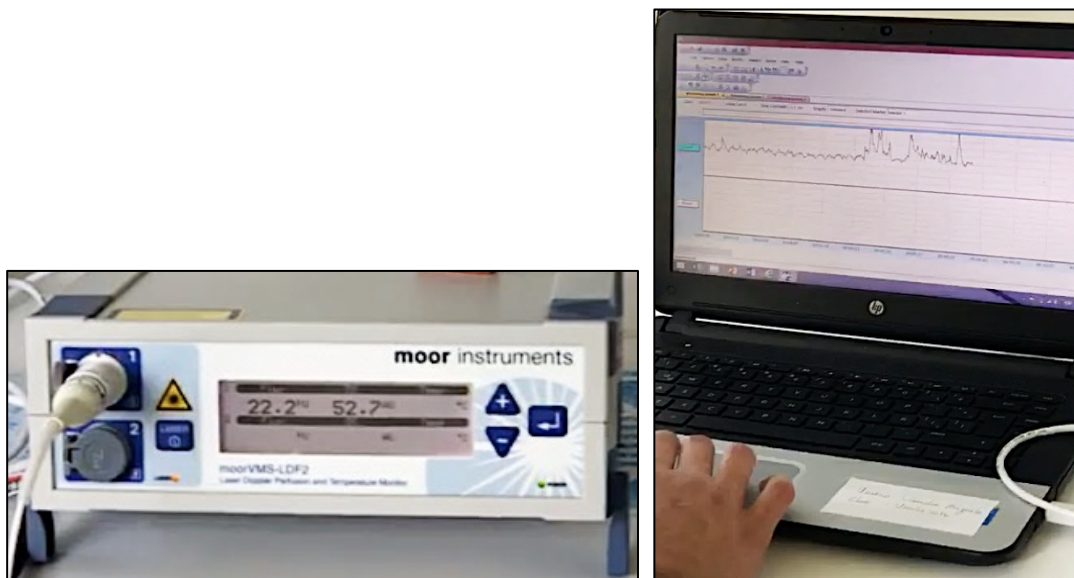


Figura 9, La señal de flujo es observada en forma numérica mediante Unidades de Perfusión en la pantalla del equipo láser doppler y en forma de gráfico a través del Software Moor VMS-PC (Moor Instruments Ltd) (53).

La mayoría de los aparatos dan una lectura en unidades de perfusión, las cuales son arbitrarias y calculadas por el software. No existen unidades absolutas por lo que no se pueden comparar las unidades de un aparato con otro. Incluso en el mismo aparato doppler pueden haber variaciones a diferentes intervalos de tiempo (48).

- **Análisis de Transformación Rápida de Fourier**

Para muchos equipos de láser doppler, puede ser difícil analizar objetivamente la señal de salida del instrumento. Por lo tanto se sugiere usar el llamado análisis de Transformación rápida de Fourier (FFT, siglas en inglés), asociado con las mediciones de flujo sanguíneo pulpar (57). Numerosos estudios han confirmado la utilidad de este análisis, para evaluar el flujo sanguíneo en los tejidos blandos. Este análisis identifica la presencia consistente en el tiempo de los picos de pulsos en la medición del flujo sanguíneo pulpar (Figura 10). Por ejemplo, un pico de alrededor de 1.3 Hz, es equivalente a aproximadamente 78 latidos por minuto, lo que nos indica la existencia de vitalidad en la pulpa de un diente. Cuando se analizan las lecturas en dientes con pulpas no vitales, el pico dominante esta ausente (Figura 11). Este método de análisis establece que la lectura pulsátil del flujo sanguíneo pulpar es de frecuencia similar a la frecuencia cardíaca, estableciendo de esta manera, que los picos corresponden realmente al flujo sanguíneo más que a los artefactos de movimiento de la sonda (57).

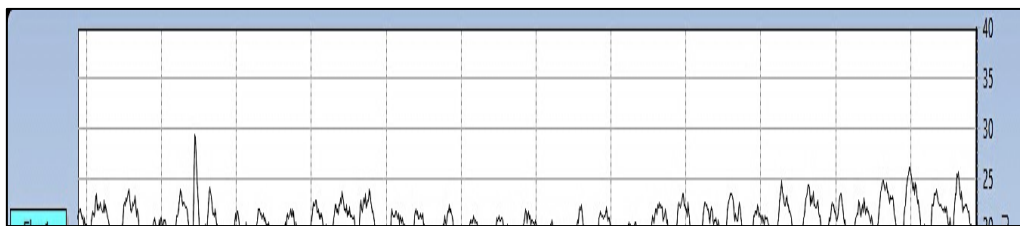


Figura 10, Gráfico de Unidades de perfusión en el tiempo, donde se observan picos de flujo sanguíneo.

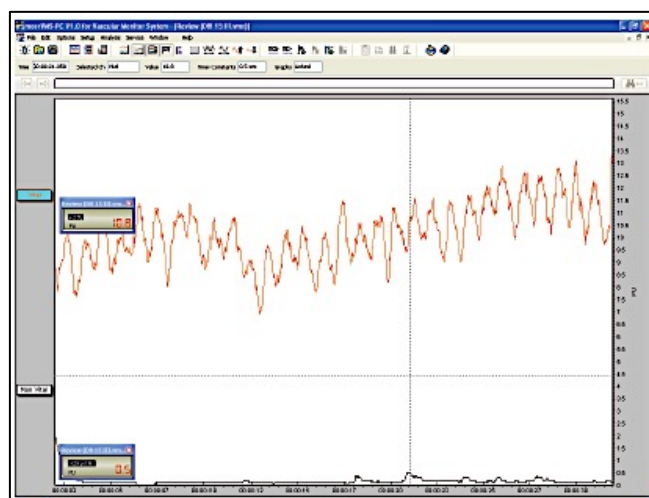


Figura 11, Comparación gráfica de unidades de perfusión de diente vital (en rojo) y diente no vital (negro) donde no se observan picos con características pulsátiles.

- **Profundidad de penetración del haz del láser doppler**

Se ha investigado la profundidad de penetración del haz del láser doppler en dientes extraídos a distintas densidades del láser. La luz láser alcanza aproximadamente 4-6 mm de profundidad con un láser denso y 13 mm de profundidad con un láser de menor densidad. En algunos dientes, la luz láser puede incluso llegar al ápice (58). En este mismo estudio se concluyó que el contacto o no contacto de la sonda en la superficie del diente no influyó significativamente en la profundidad de penetración de la luz (58).

- **Indicaciones de uso de la flujometría láser doppler**

La flujometría de láser doppler ha sido utilizada para la medición del fluido de sangre pulpar en las siguientes situaciones:

- Estimación de la vitalidad de la pulpa durante la planificación de un tratamiento. Es importante evaluar el estado pulpar de un diente individual cuando se necesita realizar un diagnóstico diferencial de odontalgia. Además, el diagnóstico de un diente con pulpa necrótica, puede ser particularmente difícil, en aquellas situaciones en donde el dolor referido está presente. Es por esto, que la realización de las pruebas adecuadas y su correcta interpretación es de suma importancia (51).
- Pruebas pulpares en niños. Las pruebas de sensibilidad no son confiables en niños debido a que son subjetivas y dependen de la respuesta del paciente. La flujometría de láser doppler podría ser una opción indicada para esta situación. Además, se ha demostrado que es un método adecuado para la medición del flujo sanguíneo pulpar en incisivos temporales (51).
- Casos de presencia de radiolucidez periapical de origen no-endodóntico. La flujometría láser doppler puede ayudar en el diagnóstico diferencial de estas imágenes radiográficas (59).
- Monitoreo de los cambios del flujo sanguíneo pulpar relacionados con la edad. Usando la flujometría de láser doppler, se ha evidenciado que la hemodinámica en la pulpa humana se reduce con la edad (60).

- Monitorización del efecto del ejercicio en los cambios del flujo sanguíneo pulpar. Se ha indicado que el flujo sanguíneo pulpar varía durante el ejercicio, con un cambio porcentual medio del 38% con respecto al nivel en reposo. Para considerar reproducibles las mediciones clínicas del láser doppler, deben ser realizadas con el paciente en reposo (61).
- Monitorización de las reacciones a los agentes farmacológicos locales y sistémicos, incluidas las soluciones anestésicas locales. Mediante la flujometría láser doppler se ha demostrado que la lidocaína al 2% con 1:100.000 de epinefrina, reduce significativamente el flujo sanguíneo pulpar y gingival, lo cual puede ser crítico para las pulpas comprometidas con un flujo sanguíneo ya reducido (62). Fernieini y colaboradores en el año 2001, utilizaron la flujometría láser doppler para comparar los efectos hemodinámicos de la administración de anestésicos locales, donde el mayor cambio se asoció con la ansiedad justo antes de la inyección del anestésico, confirmando la sensibilidad del láser doppler como un dispositivo de investigación para evaluar los cambios hemodinámicos, asociados con la ansiedad y la administración de anestesia local (63).
- Monitoreo de la reacción de la pulpa a la estimulación eléctrica y térmica. Se ha visto que a medida que se baja la temperatura de los dientes, el flujo sanguíneo pulpar disminuye, pero no se detiene por completo (64). Mavropoulos y cols utilizaron la flujometría láser doppler para estudiar el efecto del bloqueo del nervio mandibular sobre los cambios en el flujo sanguíneo pulpar provocados por la aplicación de frío o calor a los dientes. El flujo sanguíneo pulpar mostró un aumento del 7% frente a la aplicación de calor y un 20% de disminución cuando el diente estuvo expuesto al frío. Ninguna respuesta se vio afectada por un bloqueo del nervio mandibular (65).
- Monitoreo de la reacción pulpar a los procedimientos ortodóncicos. Se han reportado muchos estudios sobre el efecto de las fuerzas ortodóncicas intrusivas en el flujo sanguíneo pulpar. Se ha reportado que el flujo sanguíneo pulpar, se reduce significativamente durante la aplicación de fuerzas intrusivas continuas, lo que es seguido de una recuperación después del cese de la aplicación de la fuerza (66).

- Medición del flujo sanguíneo pulpar después de una cirugía ortognática. Entre los pacientes que se someten a una cirugía Le Fort I, se ha observado una reducción significativa de la sensibilidad pulpar de los dientes en el segmento intervenido (67). En pacientes sometidos a este tipo de cirugías, la ocurrencia postoperatoria de falta de respuesta de los dientes a las pruebas de sensibilidad eléctricas, tienen una incidencia que va del 6% al 43%. Por lo tanto, la flujometría láser doppler es de gran valor para asegurar una información diagnóstica más confiable (51).
- Medición del fluido sanguíneo pulpar después de un trauma; los dientes traumatizados pueden tener daños en su inervación y dar una respuesta negativa a las pruebas de sensibilidad, aunque su circulación sanguínea se encuentre intacta, y de este modo su vitalidad y funcionalidad (51). Por lo general, en estos casos transcurren de 1 a 8 semanas antes de que se pueda obtener una respuesta pulpar normal, por lo cual se requieren de períodos de observación más largos. La regeneración de los nervios dañados es lenta y pueden pasar muchos meses antes de que vuelvan las respuestas nerviosas positivas. Si se inicia el tratamiento endodóntico mientras los vasos sanguíneos intentan volver a crecer a través del foramen apical, la curación de la pulpa se detiene y no hay un mayor desarrollo de la raíz en los dientes inmaduros. Es por esto que la flujometría láser doppler es una técnica precisa y objetiva para evaluar la vitalidad de la pulpa en estos dientes (68).
- Monitoreo de la revascularización pulpar en dientes reimplantados. La flujometría láser doppler determina correctamente el estado pulpar (vital versus no vital) en un 84% de dientes reimplantados, sin existir una asociación significativa entre la eficacia del láser y el tipo de diente (69).

- **Limitaciones y factores influyentes de la flujometría de láser doppler**

Algunas de las características del rayo láser, podrían afectar significativamente a la señal de flujo registrada a partir de las pulpas dentales. Se pueden mencionar por ejemplo la elección del filtro del ancho de banda (usado para reducir el ruido de la señal), el tipo de longitud de onda del láser utilizado y la separación de las fibras en la sonda. Los estudios que comparan algunas de estas variables han respaldado el uso de un filtro estrecho de ancho de banda de 3 kHz, en lugar de

un filtro de ancho de banda de 20 kHz. Además, recomiendan el uso de una fuente láser de 810 nm o 633 nm. En relación a la separación de las fibras, algunos estudios respaldan el uso de fibras con una separación amplia de 500 μm y otros recomendaron una separación de fibra más estrecha de 250 μm (51).

- Posición de la sonda: algunos estudios han demostrado que se obtienen valores de flujo más altos a medida que la sonda se posiciona más cerca del margen gingival. Sin embargo, al acercarse la sonda a esta área puede aumentar la posibilidad de incluir señales que no son de origen pulpar, sino de los tejidos periodontales. Se debe ubicar la sonda en el tercio cervical de la corona del diente, a 3 mm del margen gingival ya que la señal de salida para la luz láser transmitida es mínima debido al grosor del diente en esta región, o debido a la retrodispersión pulpar (70).
- Diseño de la sonda: las sondas para el uso de flujometría laser doppler han sido fabricadas en varios diseños de acuerdo a sus distintos usos. Las diferencias entre las sondas se encuentran en sus características externas, que se adaptan según la aplicación requerida, en sus características internas, incluida la separación de sus fibras (55).
- Características de la férula: la flujometría Doppler láser es compleja debido a que el haz de luz del láser debe interactuar con las células móviles dentro de la vasculatura pulpar. Para evitar los artefactos, debe producirse un soporte o mantenedor tipo férula adecuado para estabilizar la sonda y posicionarla correctamente sobre los dientes, como también para la creación de un posicionamiento reproducible, en el caso de pacientes que es necesario realizar seguimiento en el tiempo (51). Aunque las mediciones se pueden obtener con la sonda posicionada manualmente, se obtendrán mejores registros cuando la sonda se soporte en una férula de masilla dental (71). La mayoría de los estudios han utilizado férulas rígidas fabricadas con diferentes materiales como silicona, plástico, acrílico, resinas de autocurado (51). Estas férulas pueden ser hechas de silicona tipo masilla, la cual es moldeada sobre el diente. Posteriormente se les realiza un pequeño orificio a 3 mm del margen gingival para sostener la sonda (51,71) (Figura 12).

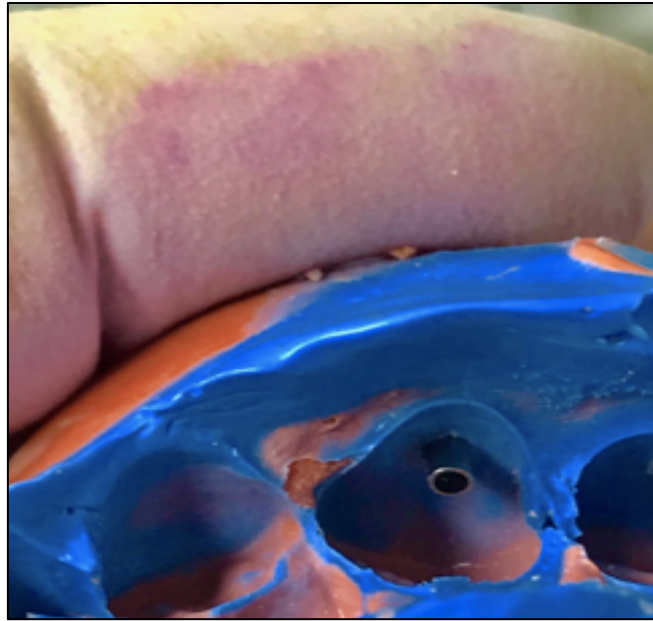


Figura 12, Sonda posicionada a 3mm del margen gingival.

- Señales de origen no pulpar: Las señales no pulpares, principalmente del flujo sanguíneo periodontal, pueden contaminar significativamente la señal de flujo registrada en la pulpa, por lo que se ha afirmado que las señales obtenidas de dientes humanos, no necesariamente indican el flujo sanguíneo pulpar sino que pueden confundirse con señales obtenidas de tejidos cercanos. Se ha propuesto aislar los dientes mediante el uso de torundas, pastas o goma dique, sin embargo es imposible eliminar completamente la contaminación de las señales de origen periodontal (57,70).

- Tipo de diente: Casi la totalidad de los estudios han sido realizados en dientes anteriores, y muy pocos en premolares y molares (72,73). Investigaciones han revelado que no existen diferencias significativas entre incisivos y premolares no vitales cuando son evaluados con flujometría láser doppler; sin embargo ésta sí existe cuando se evalúan dientes vitales. También, se reportan diferencias significativas entre primeros y segundos premolares, siendo éste último el tipo de diente menos preciso (51).

Se ha estudiado el efecto del morfotipo dental en las variaciones intraindividuales e interindividuales de los valores basales de flujo, así como en las variaciones en intervalos de tiempo en los valores de flujo sanguíneo pulpar (73). Las comparaciones intraindividuales de los valores de flujo relacionados con

morfotipos dentales revelaron diferencias significativas solo para el primer molar, mientras que se encontraron diferencias interindividuales significativas para el incisivo lateral, canino, premolares y primer molar (73).

- El flujo de sangre pulpar puede verse alterado por la aplicación de capsaicina, como anestésico, en la encía adyacente o en la mucosa alveolar. También puede verse alterado por el consumo de fármacos hipotensores y el uso de nicotina (74).
- Otra de las limitaciones del uso de flujometría láser doppler es su susceptibilidad a ruidos extraños, como sonidos fuertes, por ejemplo vibraciones, o movimiento cerca o en el propio aparato (58).
- El alto costo que aún tienen los equipos, hace que sea muy poco probable que la flujometría de láser doppler se popularice y que la técnica sea ampliamente utilizada (51).
- La presencia de tejido mineralizado en el diente, limita la penetración del láser en éste (51).
- La técnica puede estar contraindicada para dientes con restauraciones extensas, y en aquellos con pulpa vital apical (51).

- **Confiabilidad de la flujometría láser doppler**

Muchos estudios han sugerido una precisión por sobre el 80-90% en la capacidad de evaluar correctamente la vitalidad pulpar (55).

Karayilmaz y cols evaluaron la confiabilidad de las pruebas de flujometría de láser doppler, oximetría de pulso y eléctrica en la determinación del estado pulpar. De los resultados obtenidos se observó que la sensibilidad y especificidad para la prueba eléctrica fueron de 0,95 y 0,81 respectivamente, 0,83 y 0,949 para la oximetría de pulso. Concluyeron que la flujometría laser doppler es un método más confiable y efectivo para evaluar la vitalidad de los dientes, con una sensibilidad y especificidad de 1,0 (47).

2.7.2 Pulsioximetría

La pulsioximetría es una técnica ampliamente utilizada en medicina, para medir las concentraciones de saturación de oxígeno en la sangre, durante la administración de anestesia intravenosa, por ser fácil y asequible. Además es una prueba absolutamente objetiva, ya que no requiere la respuesta subjetiva del paciente, para medir los niveles de saturación de oxígeno. El pulsioxímetro utiliza

una pinza con un diodo que emite luz de dos longitudes de onda, la luz roja de 640 nm y otra infrarroja de aproximadamente 940 nm. Esa luz es recibida por un diodo fotodetector, conectado a un microprocesador, y el dispositivo compara la relación de las amplitudes de la luz infrarroja y la luz roja transmitidas, para determinar las concentraciones de oxígeno y la frecuencia de pulso (Figura 13) (75).

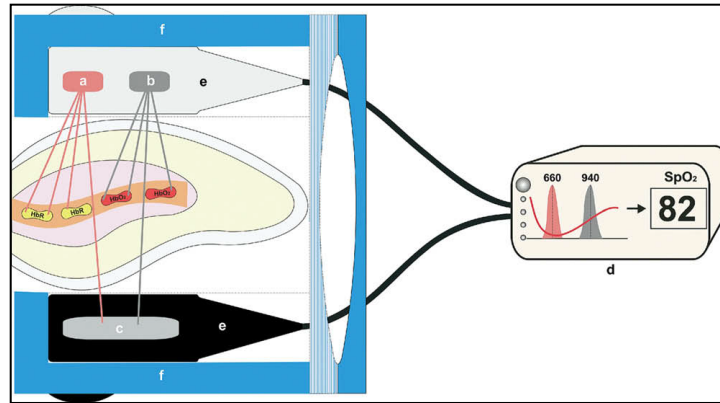


Figura 13, Mecanismo del oxímetro de pulso. (a) Emisión de luz a 640 nm. (b) Emisión de luz a 940 nm. (c) Fotodetector. (d) Monitor (e) Sensor del oxímetro de pulso. (f) Microprocesador. Fuente (51).

El aumento de la acidez y de la tasa metabólica producida por la inflamación, causa desoxigenación de la hemoglobina y cambia la saturación de oxígeno en la sangre. Es por esto que, al monitorizar los cambios en la saturación de oxígeno, la oximetría puede detectar la inflamación o necrosis parcial de la pulpa en los dientes que todavía conservan vitalidad, y responden a las pruebas de sensibilidad.

Esta prueba es especialmente aplicable a los dientes recientemente traumatizados, en los cuales la parestesia temporal de las fibras nerviosas por el edema intramielínico, el aumento de volumen axonal y la pérdida parcial de la vaina de mielina, reduce la eficacia y fiabilidad de las pruebas de sensibilidad endodónticas. La determinación de la vitalidad de la pulpa y del plan de tratamiento, en estos casos, podría ser en una etapa más temprana de lo que ocurre en la actualidad, por una evaluación precisa de la irrigación sanguínea con el oxímetro de pulso, en lugar de esperar a que las pruebas de sensibilidad otorguen una respuesta. Gopikrishna (35) evaluó por lecturas la vitalidad de 17 dientes incisivos superiores recientemente traumatizados, determinando que el oxímetro de pulso arrojó lecturas constantes de vitalidad por un período de 0 a 6 meses en todos los pacientes.

La medición de la saturación de oxígeno de la pulpa varía dependiendo del diente estudiado. Bruno y cols en su revisión de literatura, indicaron que esta medición fue de 87,73% en los incisivos centrales superiores, 87,24% en los incisivos laterales superiores y finalmente de 87,26% en los caninos superiores (76).

La saturación de oxígeno arterial sistémica en individuos sanos bordea entre el 95% al 100%. Sin embargo, en los dientes estos niveles son más bajos, debido a ciertos factores:

- La pulpa se encuentra rodeada por tejido mineralizado, el cual puede actuar como un obstáculo para la detección de la vascularización.
- La difracción de la luz infrarroja atraviesa los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios, que pueden dar lugar a lecturas de baja concentración de oxígeno erróneamente.

Teóricamente, las lecturas del oxímetro de pulso son más dificultosas de obtener en dientes que presentan un grosor dentinario incrementado. Razón por la cual, el clínico debería considerar la edad del paciente al realizar mediciones con el oxímetro de pulso.

- **Limitaciones y factores influyentes de pulsioximetría**

- Factores relacionados con el paciente como una baja perfusión periférica, un aumento de la pulsación venosa, desórdenes relacionados con la hemoglobina, vasoconstricción, hipotensión y movimientos corporales que contribuyen a lecturas erróneas (77).
- Factores ambientales como la electrocauterización cerca del sensor e interferencias de luz ambiental.
- Ajuste de los sensores a la forma, tamaño y anatomía del diente a probar. Ese es un requisito crítico para el uso del oxímetro de pulso en odontología, además que el diodo y el fotodetector deben encontrarse paralelos entre sí, de modo que toda la luz emitida por el primero sea recibida por el segundo. Si el sensor no puede adaptarse a la forma y tamaño de la corona, no se podrán obtener resultados fiables (77).
- El oxímetro de pulso sólo lee el porcentaje de hemoglobina ligada, pero ésta puede enlazarse a otros gases además del oxígeno, como el monóxido de carbono y todavía arrojar lecturas altas a pesar de que el paciente esté hipóxico.

2.7.3 Medición de la temperatura:

La temperatura en la superficie de un diente, está determinada por la facilidad con que el calor llega hasta la superficie, y la facilidad con la que es disipado en el medio ambiente. En condiciones medioambientales controladas, las fuentes de calor para los dientes son el calor conducido desde los tejidos periodontales, el calor transportado por la circulación de la pulpa, y finalmente el producido en el interior de la cámara pulpar debido al metabolismo de la pulpa. Aquellos dientes con pulpa necrótica, poseerían la primera fuente de calor mencionada; estableciéndose una diferencia de temperatura con un diente con pulpa vital, por lo cual la medición de ésta podría ser de utilidad en la obtención de información sobre la integridad del tejido pulpar subyacente (45).

Diversas herramientas se han utilizado para medir la temperatura, como procedimiento de diagnóstico en dientes humanos:

- Termopar: En la ingeniería eléctrica y electrónica, los termopares son un tipo de sensor de temperatura ampliamente utilizado. Brown demostró, mediante el uso de termopares, que la temperatura de la superficie de un diente disminuye en sentido anterior, evidenciándose que la cara palatina fue 0,4° Celsius más templada que la vestibular; en conjunto con esto no se establecieron diferencias significativas entre dientes con pulpas vitales y necróticas. Por lo que concluyó que la principal fuente de calor que determina la temperatura de la superficie de un diente son las estructuras periodontales, y que la circulación pulpar y el metabolismo de este tejido, son relativamente poco importantes como fuentes de calor (78). Hoy en día, los termopares, rara vez se utilizan para medir la temperatura de la superficie de los dientes.
- Termistor: El termistor es un pequeño termómetro de resistencia con una sensibilidad muy alta y baja capacidad de calor, que actúa como un bolómetro y cambia su resistencia eléctrica en proporción a la energía radiante que recibe. Este elemento es tan sensible a los cambios de temperatura, que la presencia de una pequeña cantidad de saliva en el diente o un cambio en el aire local de la habitación, puede influir en sus resultados. Stoops enfrió dientes por debajo de la temperatura corporal, y registró la temperatura de la superficie dental, con la ayuda de un termistor, durante el período que el diente se recalentaba hasta alcanzar la

temperatura corporal nuevamente (79). Esto demuestra una relación entre la vitalidad pulpar y la superficie de un diente, que puede proporcionar un medio útil para la detección de la vitalidad pulpar.

- Termografía infrarroja: la imagen de la tomografía computarizada infrarroja controlada, es un método no invasivo para registrar la temperatura superficial del cuerpo. Esta técnica es precisa y permite realizar comparaciones de diferentes áreas del diente, muy similar a la flujometría de láser doppler, siendo una valorable herramienta experimental. Pogrel (75), a través de su estudio, reveló que la temperatura de un incisivo superior, disminuyó desde el margen gingival hasta el borde incisal, aproximadamente 2,5° Celsius. Además determinó que los dientes con pulpa vital y no vital tuvieron la misma temperatura en reposo, pero después del enfriamiento con aire frío, dientes con pulpa no vital fueron más lentos en templarse nuevamente comparado con los con pulpa vital (75).

- **Limitaciones y factores influyentes de la medición de temperatura**

Esta técnica es muy sensible, por lo que se deben controlar tantas variables como sea posible cuando se estudie la temperatura.

Para crear un ambiente controlado, cada paciente debería ser examinado en un ambiente termológico, debiendo ser interrogados respecto si fumaron, bebieron o comieron durante los 60 minutos previos al procedimiento. La habitación debería encontrarse aislada, libre de corrientes de aire, sin iluminación solar directa, y a una temperatura de 20°C. Dado que los pacientes deben permanecer quietos durante el examen, se sugiere tener un apoyo adecuado para la cabeza de ellos.

2.7.4 Sensibilidad y especificidad de las pruebas de vitalidad

La sensibilidad de una prueba indica la habilidad de ésta para identificar a los dientes con pulpas necróticas o no vitales. Mientras que la especificidad nos habla de la capacidad de la prueba para identificar a los dientes vitales.

Dastmalchi, en su estudio clínico del 2013 (36), determinó que los valores de sensibilidad de las pruebas de oximetría de pulso, eléctrica y de frío fueron 0,93; 0,6 y 0,53 respectivamente; y los valores de especificidad para la oximetría de pulso fue 1, la prueba eléctrica 0,55 y 0,66 para la del frío. Concluyendo que la oximetría de pulso es un método efectivo y objetivo, para evaluar la vitalidad

pulpar (36). Por otra parte, Karayilmaz diseñó un estudio para evaluar la confiabilidad de las pruebas de flujometría de láser doppler, oximetría de pulso y eléctrica en la determinación del estado pulpar. De los resultados obtenidos se observó que la sensibilidad y especificidad para la prueba eléctrica fueron de 0,95 y 0,81 respectivamente, 0,83 y 0,949 para la oximetría de pulso; mientras que para la flujometría de láser doppler los valores fueron de 1 para ambos. Concluyendo que la flujometría de láser doppler, sería un método más confiable y efectivo para evaluar el estado pulpar de dientes humanos, comparado con la prueba eléctrica y el oxímetro de pulso (47).

2.8 Diagnóstico Histológico

El diagnóstico histológico en endodoncia es considerado el Gold estándar para la evaluación del real estado inflamatorio pulpar, pero es inviable en la práctica clínica diaria. Ricucci y cols. el 2014 en un estudio realizado con dientes humanos, concluye que la clasificación del diagnóstico clínico propuesto por la Asociación Americana de Endodoncia (23), la mayoría de las veces se correspondía con el diagnóstico histológico, tanto para pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible (80). Sin embargo, la validez de las pruebas clínicas actualmente empleadas para determinar el estado real o histopatológico de la pulpa sigue siendo controversial (42).

2.8.1 Clasificación de histología según diagnóstico

Pulpa normal: ausencia de cambios a nivel del complejo pulpo dentinario. Los túbulos dentinarios se muestran paralelos unos a otros y no se observa disminución del número de éstos. No hay modificaciones en la capa odontoblástica o del tamaño del odontoblasto. Existe ausencia de dentina terciaria o calcificaciones, además, no hay presencia de células inflamatorias, vasodilatación pulpar o bacterias (80,81).

Pulpitis reversible: presencia de distintos grados de inflamación, con su subsecuente acumulación de infiltrado inflamatorio crónico bajo la capa odontoblástica, que se encuentra bajo los túbulos que están siendo afectados por caries, pero que no han modificado la arquitectura normal pulpar. Existe ausencia de áreas de licuefacción, necrosis o bacterias (80,81).

Pulpitis irreversible: existe necrosis parcial o total de la pulpa coronal. Presenta al menos un área de tejido pulpar en donde se encuentre licuefacción o

coagulación rodeada de polimorfos nucleares neutrófilos (PMN's). Periféricamente a estos PMN'S, una gran cantidad de infiltrado inflamatorio se encuentra presente. Se puede observar gran cantidad de bacterias o biofilms colonizando el tejido necrótico o las paredes dentinarias contiguas. Puede o no existir comunicación de la pulpa con el medio oral (80,81).

2.9 Respuesta inflamatoria e inmune de la pulpa dentaria frente a una noxa

La inflamación de la pulpa dentaria (pulpitis) es una secuencia de eventos vasculares y celulares estrechamente regulados y mediados por factores moleculares. La pulpitis es generalmente causada por la infección oportunista de la pulpa dentaria por microorganismos comensales de la cavidad oral, siendo la caries dental la ruta de entrada más común de estos microorganismos. Otras rutas de entrada incluyen el trauma dentario, *cracks* dentinarios, túbulos dentinarios expuestos y el foramen apical (82).

La proliferación y la actividad metabólica de los microorganismos comensales conducen a la liberación de componentes bacterianos en los túbulos dentinarios y su difusión hacia la pulpa periférica. El reconocimiento de los componentes bacterianos por parte de las células del huésped en la interfaz dentina-pulpa, desencadena eventos protectores del huésped que incluyen respuestas antibacterianas, inmunes e inflamatorias (83).

La pulpa dentaria tiene la capacidad de expresar un gran número de mediadores de la inflamación, los cuales pueden hacer frente a los diversos irritantes. Este mecanismo comienza con cambios en el sistema vascular, el cual es mediado por los receptores tipo Toll (TLRs, sigla en inglés), los cuales son células de regulación positiva. Dichos vasos pulpares son regulados generalmente por metabolitos locales, y en menor medida, por la inervación simpática. Estos desencadenan la respuesta inmune por parte del hospedero (82). La primera respuesta del tejido pulpar frente a una noxa, es a través de la inmunidad innata. Según Hahn y col, la inmunidad innata del complejo dentino-pulpar ante la caries, incluye los siguientes componentes (84):

- a) Fluido dentinario y la deposición de inmunoglobulinas intratubularmente: La primera respuesta protectora de la pulpa ante la caries, es el aumento en la

salida del fluido dentinario como resultado de la presión intrapulpar positiva que reduce la difusión de estímulos nocivos a través de los túbulos dentinarios (17,84–86). La composición del fluido dentinario no está completamente estudiado, sin embargo, se considera que contiene fluido tisular derivado del suero con proteínas e inmunoglobulinas (14,15).

- b) **Odontoblastos:** Los odontoblastos son los primeros en enfrentarse con los antígenos de la caries bacteriana, por lo que su participación es sumamente importante en distintos aspectos: los odontoblastos de la pulpa normal poseen TLRs, que son receptores transmembranosos que reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos y estimulan una variedad de respuestas inflamatorias. Estos receptores reconocen productos bacterianos como el ácido lipoteicoico (LTA, siglas en inglés), además inducen a la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, siglas en inglés) el cual es un estimulador de la angiogénesis y la permeabilidad vascular, e induce a las células pulpares cuando son invadidas por ácido lipoteicoico. En pulpas sanas, los Odontoblastos, secretan el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF-beta), y su expresión aumenta en la pulpitis irreversible. Es importante en la dentinogénesis y reparación ya que promueve la secreción de la matriz de metaloproteinasas (MMP) y la mineralización de la dentina. En la etapa temprana de la inflamación, actúa como proinflamatorio, reclutando células inmunes, tales como células dendríticas (CD), y en la etapa tardía actúa como antiinflamatorio, reprimiendo la activación de macrófagos y células dendríticas y la proliferación de linfocitos (84,87,88).
- c) **Neuropéptidos e inflamación neurogénica:** La pulpa dental es uno de los tejidos más densamente inervados del cuerpo. Los neuropéptidos se describen como neurotransmisores peptídicos que presentan efectos biológicos por la activación de receptores localizados en la membrana plasmática de las células diana (88). Entre los neuropéptidos más frecuentes en la pulpa dental se encuentra la sustancia P (SP), la cual fue el primer neuropéptido identificado en este tejido (89). La SP es liberada por efecto de varios tipos de estímulos nocivos, tales como estímulos térmicos, químicos, eléctricos y mecánicos. Ésta cumple una importante función en la iniciación y propagación de la inflamación pulpar, dado que

tiene la habilidad para interactuar con las células inmunocompetentes (89). Los mastocitos, macrófagos, células mesenquimatosas, odontoblastos, linfocitos T y B, presentan receptores en su membrana para este neuropéptido. Su efecto biológico consiste en la vasodilatación, extravasación de plasma, estimulación del sistema inmune, quimiotaxis, aumento de la actividad de macrófagos, activación de la formación de tejidos duros y reparación tisular (15,16). La liberación de mediadores inflamatorios como bradiquinina y prostaglandinas puede activar la producción de neuropéptidos y formar parte de una reacción positiva en el proceso inflamatorio (85). Algunos estudios demuestran que en pulpitis irreversible la concentración de bradiquinina inmunoreactiva es significativamente mayor que en pulpas normales y estos niveles estaban directamente relacionados con pacientes que en el pasado habrían tenido historia de dolor (90).

- d) Células de inmunidad innata: En diversos estudios (19,20) se ha demostrado que bajo condiciones de normalidad, la pulpa dental se encuentra equipada con una variedad de células asociadas con el sistema inmune de defensa. Las principales células efectoras innatas en la mayoría de los tejidos, son los neutrófilos, fagocitos mononucleares, linfocitos incluyendo células NK y células dendríticas.
- e) Citoquinas de inmunidad innata: Las bacterias y sus componentes inducen la producción de mediadores polipeptídicos o citoquinas inmunes, por células inflamatorias. Las citoquinas influyen en la actividad, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células inmunológicas, como también regulan la producción y la actividad de otras citoquinas que pueden aumentar la respuesta inflamatoria (proinflamatorias) o atenuar la respuesta inflamatoria (antiinflamatorias) (91). Las citoquinas inflamatorias incluyen: interleuquina 2 (IL -2), interleuquina 6 (IL -6), interleuquina 8 (IL-8), interferón γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros; mientras que entre las antiinflamatorias se encuentran: interleuquina 4 (IL -4), interleuquina 10 (IL -10), interleuquina 13 (IL -13) entre otras (110). La IL-1 y TNF- α derivado de linfocitos B, presentan múltiples actividades en la regulación de la respuesta inmune y la inflamación (84). Se han observado

grandes concentraciones de TNF- α en pulpitis irreversible sintomática en comparación con pulpas sanas. A medida que esta pulpitis avanza la concentración de TNF- α disminuye; esto se cree que es por la finalización de la inflamación y el comienzo de la necrosis pulpar (92). La pulpa dental también se defiende mediante la inmunidad adquirida o adaptativa, la cual funciona mediante la acción de linfocitos (células T y B) y sus productos, las citoquinas y los anticuerpos (93). Los linfocitos B son los encargados de producir anticuerpos. Se han realizado estudios, en donde se observó la presencia de inmunoglobulinas (IgG, IgA o IgM) en el tejido pulpar. Esto lleva a sugerir que existe una producción local de anticuerpos por parte de la pulpa dental. Estos estudios han demostrado un aumento en la cantidad de inmunoglobulinas IgA e IgG y una aparente disminución en la fracción del complemento C3, cuando se comparan pulpas inflamadas con pulpas normales (93). Igualmente, se han observado cantidades de IgE en muestras de pulpas inflamadas, lo cual sugiere la presencia de componentes para una reacción de hipersensibilidad de tipo I anafiláctica, debido al contenido de mastocitos en pulpas inflamadas. Estos hallazgos, más la presencia de IgE sugiere que los componentes necesarios para las reacciones de hipersensibilidad de tipo anafiláctica, pueden estar presentes en pulpas inflamadas (93).

2.10 Diagnóstico molecular

Tal como hemos recalcado a lo largo del marco teórico, actualmente el diagnóstico en endodoncia se basa en respuestas subjetivas y son realizadas en base a los test de sensibilidad. Es por esta razón que en muchas oportunidades hay errores al momento de realizar el diagnóstico, donde el sobrediagnosticar o subdiagnosticar la patología presente, conlleva a decisiones terapéuticas no acordes al real estado inflamatorio pulpar (5,34).

El diagnóstico molecular está enfocado en la respuesta del hospedero, donde cada sitio y tejido poseen factores específicos o biomarcadores como anticuerpos, antígenos bacterianos, proteínas y citoquinas, que pueden ser analizados (20).

Según Arango “el término biomarcador se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o

molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. La interacción depende de las características heredadas y adquiridas del individuo (o del sistema biológico), y de las circunstancias de la exposición, y como resultado es posible no encontrar efecto o tener algún efecto adverso” (94).

Los biomarcadores son objetivamente medibles, evaluables y sirven tanto como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, como también a una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica determinada (95).

En el caso de endodoncia estos biomarcadores pueden ser recolectados de diversas formas y a través de varios sitios donantes; fluido crevicular, sangre pulpar, fluido dentinario y fluido periapical (20). Dentro de éstos, el que propone mejores proyecciones de utilidad clínica para el diagnóstico molecular en endodoncia es el fluido dentinario. Lamentablemente el número de estudios *in vivo* que se han realizado son escasos y la forma de recolección, material y tipo de análisis aún no están claramente establecidos (20). Las investigaciones más recientes que se acercan al diagnóstico molecular, describen que han encontrados ciertos biomarcadores en la pulpa. Algunos de éstos, han reportado que IL-1 beta (96–99), IL-8 (91,97,98), IL-6 (11,100,101) y TNF alfa (20,102), se encuentran aumentados en dientes con pulpas inflamadas irreversiblemente, en comparación a dientes con pulpas normales, al analizar muestras de sangre pulpar. En la revisión sistemática realizada por Zanini y cols. el año 2017 concluyeron que la expresión génica y proteica de IL-8, TNF-alfa, MMP-9 y receptores de productos de glicosilación avanzada (RAGE), aumenta en muestras de dientes con pulpitis irreversible sintomática y podrían ser utilizadas como marcadores diagnósticos (95).

2.11 Fluido Dentinario

Tal como se mencionó anteriormente, el fluido dentinario es un exudado extracelular linfático, procedente de la sangre de la micro vascularización pulpar, que fluye a través de los túbulos dentinarios gracias a la función de los odontoblastos (103). El fluido dentinario es considerado un derivado plasmático por lo tanto, dentro de su composición podemos encontrar proteínas séricas e inmunoglobulinas, además de un gran número de mediadores inflamatorios que incluyen quimioquinas, citoquinas y defensinas (103,104).

2.12 Membrana de fluoruro de polivinilideno

Las membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) han sido utilizadas extensamente en investigaciones científicas y procesos industriales, por sus increíbles propiedades físico químicas y de resistencia (105,106).

Esta membrana es de un polímero semicristalino, que posee propiedades de resistencia, químicas y de estabilidad térmica, así como de resistencia al paso del tiempo. Este material puede utilizarse creando membranas tanto planas como tubulares (106). Dentro de los usos de estas membranas podemos mencionar:

- Tratamientos de aguas (106).
- Recuperación de biocombustibles (106).
- Separaciones de baterías de litios (106).
- Filtrado de gases (106).

En el área de odontología estas membranas han sido escasamente utilizadas. Zehnder el año 2011 utilizó en uno de sus estudios membranas de PVDF, para recolectar metaloproteinasas de fluido dentinario. El mismo autor el año 2013 comparó membranas de celulosa con PVDF, concluyendo que las primeras serían un material de mejor calidad para la obtención de ciertas proteínas del fluido dentinario (107). Sin embargo, aún es necesario realizar más investigaciones con el objetivo de validar esta membrana como un material idóneo para la recolección de proteínas del fluido dentinario.

2.13 Biomarcadores

De acuerdo con los términos MeSH (Medical Subject Headings en inglés y Encabezados de Temas Médicos en español), la definición de un marcador biológico o biomarcador es: “Un parámetro biológico mensurable y cuantificable que sirve como un indicador para las evaluaciones relacionadas con la salud y la fisiología”. También son “Moléculas expresadas en la cascada de inflamación tisular que pueden servir como biomarcadores (de diagnóstico) para la presencia de inflamación” (108).

Las moléculas expresadas en la cascada de la inflamación de un tejido pueden servir como biomarcadores para determinar la presencia/severidad de la inflamación, determinando así un diagnóstico (14,15).

De hecho, ciertos estudios han demostrado que los eventos que están ocurriendo en la pulpa, pueden verse reflejados en la medición de niveles de marcadores

proteínicos correlacionados con síntomas pulpares en sangre pulpar, fluido dentinario, fluido periapical y fluido gingival crevicular (15).

El primer paso para realizar un diagnóstico molecular en la enfermedad pulpar, es la identificación de los mediadores inflamatorios claves. Esto permitiría lograr un entendimiento de su rol en la inflamación y en la regeneración tisular. Dada la complejidad de la inflamación pulpar, es poco probable que sólo un mediador entregue toda la información necesaria para lograr el diagnóstico, de una inflamación irreversible de la pulpa (94).

El segundo paso, es determinar los “puntos de corte” de los mediadores inflamatorios. Dichos puntos de corte tienen que estar basados en los niveles de inflamación de la pulpa, que permitan delimitar reversibilidad de irreversibilidad pulpar (94).

Finalmente, el tercer paso es desarrollar instrumentos y métodos clínicos que permitan detectar tipo y cantidad de estos marcadores en forma certera (94).

2.13.1 Citoquinas

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares hidrosolubles que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares (109). Se generan por medio de diversos tipos celulares en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteinoquinas activadas por mitógeno (110). Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. A diferencia de las hormonas clásicas, las citoquinas no se almacenan como moléculas preformadas, y actúan especialmente por mecanismos paracrino (en células vecinas) y autocrino (en las propias células productoras) (110).

Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, del tejido muscular (miocitos) y del tejido conjuntivo (97).

Las citoquinas son redundantes en sus actividades, es decir, acciones similares pueden ser desencadenadas por diferentes citoquinas. A menudo se forma una cascada, es decir, una citoquina estimula a sus células blanco para que

produzcan más citoquinas (111). Así las citoquinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica, como también regulan la producción y la actividad de otras citoquinas, que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria (110).

Las citoquinas inflamatorias incluyen: interleuquina IL -2 (IL -2), interleuquina -6 (IL -6), interleuquina -8 (IL- 8), interferon γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros; mientras que las antiinflamatorias se encuentran: interleuquina -4 (IL -4), interleuquina -10 (IL -10), interleuquina -13 (IL -13) entre otros (91).

2.13.2 Quimioquinas

También conocidas como «citoquinas quimiotácticas» son proteínas pertenecientes a la familia de las citoquinas. Tiene ese nombre por su capacidad de atraer a otras células de la respuesta inmune como los neutrófilos, los cuales además de atraerlos los activa. Son rápidamente sintetizadas en los sitios de inflamación. En enfermedades pulpares son producidas por células del endotelio y odontoblastos. (91). Además los lipopolisacáridos bacteriales estimulan a los fibroblastos presentes en la pulpa para producir estas células (98).

Por lo tanto, según el levantamiento del estado del arte previo, se han analizado los siguientes marcadores de la inflamación, que tiene directa relación con la inflamación y respuesta inmune pulpar:

- **Interleuquina 1 α (1IL-1 α)**

IL-1 α es un mediador inflamatorio importante. Se ha implicado en la patogenia de muchas enfermedades crónicas incluyendo pulpitis y periodontitis apical. Es secretado por varios tipos de células incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos, células vasculares, células cerebrales, células de la piel y fibroblastos. Altos niveles de IL-1 α y TNF α han sido detectados en tejidos de pulpa dental de rata después de la exposición a la pulpa quirúrgica (112).

Wisithphrom y cols reportaron en su estudio que la IL-1 α puede inducir la destrucción de la pulpa regulando en forma diferencial las MMPs y TIMPs (113).

La IL-1 α inicia y aumenta las cascadas inflamatorias que posteriormente conducen a la destrucción del tejido. Además la IL-1 α así como TNF- α , se ha

demostrado que induce la expresión de ARNm de plasminógeno tisular activador (114) para estimular la expresión de ARNm y proteína de ciclooxigenasa-2 por células de pulpa humana.

- **Interleuquina 1 β (1IL-1 β)**

Responsable de un amplio rango de acciones dado que actúa como mediadora de otras interleuquinas. En bajas concentraciones media de manera local la inflamación, en altas concentraciones tiene efectos endocrinos. Esta IL genera adherencia de los leucocitos a las paredes epiteliales, estimulación de linfocitos, potencia acción de los neutrófilos, activa a las prostaglandinas y enzimas proteolíticas para reabsorción ósea e inhibición de formación de hueso nuevo. También es capaz de estimular la secreción de otros mediadores inflamatorios como la IL-6, IL-8, MMPs y Prostaglandinas E2. La literatura sugiere que esta interleuquina actúa en estadios iniciales de la inflamación, dando luego el paso para IL-6 y IL-8. Silva, 2009 la encontró elevada en tejidos pulpaes (91) y Shimauchi en 1998 la encontró bastante aumentada en lesiones óseas (115).

- **Interleuquina 8 (IL- 8)**

Citoquina mayormente inflamatoria gracias a su acción quimio táctica ya que recluta los neutrófilos al sitio inflamado. Actúa en fase aguda de la inflamación. Su acción pro inflamatoria es similar a la de la IL-6 y se basa en la inducción y diferenciación de células T. Es también mediada por la IL-1. Un estudio demostró que IL -8 e IL -18 se encontraron muy elevadas en fluido pulpar y en odontoblastos. (98,115). Así con la progresión de la caries aumenta la densidad del infiltrado inflamatorio.

- **Interleuquina 6 (IL-6)**

Es una interleuquina con propiedades proinflamatorias. Se la ha visto también mediada por la IL-1 β , aunque contrarresta alguno de sus efectos. Esta citoquina es conocida por ser una importante moduladora de la inflamación local crónica. Regula el reclutamiento de células para pasar de una inflamación aguda (reclutamiento de neutrófilos) a crónica (reclutamiento de monocitos). Es secretada por macrófagos, participa en reacciones de fase aguda, también estimula el crecimiento y diferenciación de tanto linfocitos T como linfocitos B. Permite que se genere respuesta inmune frente a un tejido afectado. Estimula la

diferenciación de linfocitos B en células productoras de anticuerpos, activa las células T y aumenta la hematopoyesis la cual permite la leucocitosis. Es parte de la respuesta inmune innata. Se ha encontrado en la formación de absceso apical de origen endodóntico. Garrido 2015, la encontró aumentada en pulpa inflamada (116).

- **Interleuquina 10 (IL-10)**

Es una citoquina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos. A su vez, es un factor de inhibición de la síntesis de citoquinas. Se encontró elevada y en asociación con la IL-8 y IL-6 en pulpitis irreversible, puesto que es citoquina antiinflamatoria (97).

2.13.3 Las metaloproteinasas (MMP)

Tienen un rol fundamental en la inflamación a nivel de la matriz extracelular. Poseen acciones quimiotácticas, factores de crecimiento latentes, receptores de superficie, produce acciones de adhesión celular en las ECM de proteínas. Tiene un rol fundamental en la patogénesis de la inflamación, estimulación de las respuestas innatas y/o adaptativas como también en la destrucción tisular gracias a que debilitan la membrana celular llevando a una destrucción tisular (117–119).

La expresión de MMP es regulada por citoquinas pro inflamatorias y factores de crecimiento como también componentes de la matriz extra celular. Las colagenasas (MMP 1, 8, 13) y las gelatinasas (MMP 2 y 9) son las responsables del colapso de las láminas de colágeno y son consideradas como el factor clave en la destrucción de la matriz extracelular y de la membrana basal epitelial.

Las MMP pueden ser activadas extracelularmente, en la superficie de las células o intracelularmente, dado que su activación está regulada para el sitio de acción donde deben actuar. Cada paso es controlado por un activador o inhibidor específico llamado “tissue inhibitors of metalloproteinases” (TIMPs). Se ha visto que las MMP en tejidos dentarios como la dentina, pulpa y odontoblastos juegan un rol fundamental en la formación de matriz, modulación de la progresión de caries (MMP 2, 8 9) y la formación de dentina secundaria (MMP 8-2-9-3-14-20) (120). En la caries dental la desmineralización es causada por liberación de ácidos por parte de las bacterias y la degradación de la matriz orgánica de la dentina por las acciones proteolíticas de las enzimas bacterianas, pro esto no es

suficiente para el nivel de destrucción percibido en la caries dental, por lo que la literatura ha propuesto que las MMP podrían tener algo que ver en esto. Jain, (2015) propuso que las MMP 8-9-2 serían las más influyentes (117).

- **Metaloproteinasas 3 (MMP -3)**

Shin, (2003), documentó que la concentración de MMP -3 está elevada en pulpitis aguda, ésta tiene un rol que las demás no tienen, es encargada de activar a otras MMP como la 1-7-9 y además está implicada en procesos fisiológicos y patológicos tales como: aumenta la angiogénesis en inflamación, produce la “regeneración” de los fibroblastos, participar en la formación de dentina reparativa y actuar como antiinflamatoria, aunque una vez que la inflamación se mantiene actúa estimulando la degradación de colágeno llevando a un cambio en la estructura de la ECM sumado a la angiogénesis fomenta la inflamación (121).

- **Metaloproteinasa 9 (MMP-9)**

La gelatinasa B (MMP-9) es almacenada por los neutrófilos y los eosinófilos. Tiene un papel importante en la degradación final del colágeno, una vez que éste ha sido modificado inicialmente por otras colagenasas; no obstante, ambas poseen cierta actividad colagenolítica; la MMP-2 rompe colágeno tipo IV, V, I y la MMP-9 rompe colágenos I, II, IV y V. Ésta última es encontrada en fluido pulpar (119,122).

- **Metaloproteinasa 8 (MMP-8)**

Es más eficaz degradando colágeno tipo I que tipo III o II: producida por macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, su función es atraer a neutrófilos y linfocitos vírgenes, así como movilizar, activar y provocar la degranulación de neutrófilos. También estimula la angiogénesis, elevada en dientes con sintomatología. La MMP -8 fue encontrada elevada en abscesos y exudado del canal radicular (121).

- **Metaloproteinasa 2 (MMP-2)**

Atul en 2015, las encontró más elevadas en la caries dental por rol de degradación de túbulos dentinarios. Son secretada por macrófagos/monocitos y fibroblastos (117).

Por lo tanto, la caries dental puede llevar a una inflamación del tejido pulpar debido a la agregación de células inflamatorias, lo que lleva a una liberación de citoquinas. La familia de las proteínas MMP juegan entonces un doble rol en la patogénesis de la inflamación, tanto estimulando a la respuesta inmunológica innata y adaptativa como promoviendo la destrucción tisular.

2.13.4 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son células proteicas pequeñas con efectos bioactivos en variadas actividades celulares, tales como; división celular, diferenciación celular y migración celular (123). Se encuentran en todo el organismo y son responsables de la regulación de la mayoría de eventos celulares. En la cavidad oral, existen dichos factores adosados en la dentina, la cual al ser desmineralizada por el avance de la caries, quedan liberados y contribuyen al proceso reparativo en conjunto con las citoquinas y metaloproteinasas (124).

Existen receptores específicos por cada factor de crecimiento en la superficie celular. En su unión con el receptor, los factores de crecimiento desencadenan una cascada de señales intracelulares para generar su acción.

- **Factor de necrosis tumoral- α (TNF - α)**

Corresponden a efectos citotóxicos directos y efectos debilitantes generales. Sus efectos son similares a los de la IL-1. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetarias, y probablemente la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral. Es capaz de estimular la secreción de otros mediadores inflamatorios como IL-6, IL-8, MMP y PGE2. Por otro lado, el TNF- α regula la producción de MMP. Es parte de la respuesta inmune innata. Produce apoptosis celular, inflamación y mediación del sistema inmune. Pezelj-Ribaric, (2002)(125), Pfeffer, (2003) y Hall, (2016) (126) indicaron encontrarla elevada en paciente con inflamación de pulpar.

- **Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)**

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son una familia de factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis, cicatrización tisular y desarrollo embriológico, dado que actúan construyendo el revestimiento de los vasos sanguíneos y crean la infraestructura para el flujo de nutrientes a áreas lesionadas (127). Se ha encontrado también acción en la inflamación, activando a las etapas de la vía intrínseca en la respuesta inmune (127). Tienen dos sub tipos: los factores de crecimiento básicos o FGF -2 y los ácidos o FGF -1. Actúan con acción mitogénica para varios tipos celulares, es decir, estimulan el ciclo de división celular en sus células blanco (128).

En la pulpa dental se ha visto que tienen acciones quimiotácticas. Es secretado por las células dañadas del endotelio como señales (tanto a FGF-1 como FGF-2) para comenzar la inflamación y posteriormente, el proceso reparativo (129).

- **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)**

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es conocido como un factor de crecimiento angiogénico, que producen las células en respuesta a la hipoxia (130). El estrés mecánico que reciben los dientes durante la masticación, es un estímulo para la liberación de dicho factor en condiciones fisiológicas (130).

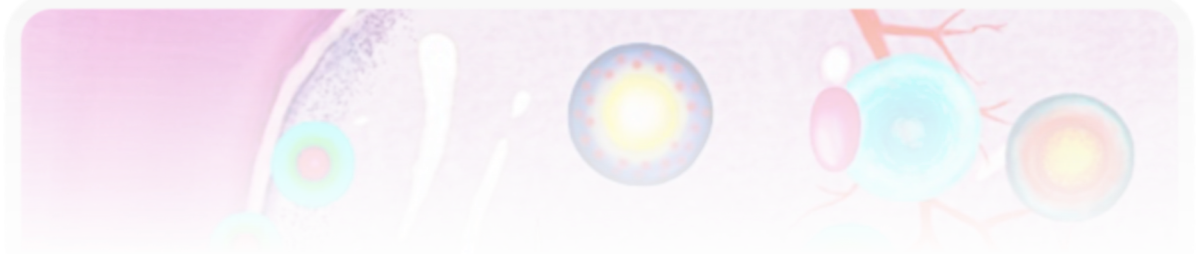
Dentro de los factores de crecimiento que producen angiogénesis podemos mencionar: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF $-\alpha$ $-\beta$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $-\alpha$) y el VEGF, éste último es considerado el más importante de todos (131). Dentro de sus acciones se encuentran mitogénesis de las células endoteliales, inducción de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y proliferación y/o diferenciación celular. Es secretada por células tipo odontoblastos, macrófagos y células pulpares indiferenciadas frente al estímulo de los lipopolisacáridos bacterianos.

Es igual de importante la acción de los neuropéptidos (sustancia P, calcitonina), dado que ellos generalmente se localizan en las terminaciones aferentes de los nervios cercanos a vasos y asociados a macrófagos y odontoblastos (132). Como respuesta al aumento de la concentración de neuropéptidos en las terminaciones nerviosas, se genera dolor espontáneo, alodínea o hiperalgesia en dientes con pulpitis (43).

De manera simultánea a la destrucción tisular a causa de la infiltración leucocítica, dichas células tienen la capacidad para inducir reparación tisular gracias a la liberación de VEGF, TGF- β , GM-CSF, entre otros, que actúan sobre la matriz extracelular, promoviendo la inducción endotelial y así, la migración celular y proliferación además de inhibición del crecimiento vascular (132).

Finalmente, del estudio del arte previamente analizado, se revela el vacío que existe en relación al correcto diagnóstico pulpar. Actualmente, algunas revisiones sistemáticas reconocen el gran problema que tienen los métodos diagnósticos que hoy se utilizan para establecer el real estado inflamatorio de la pulpa. Esto se debe a que las herramientas utilizadas son subjetivas e imprecisas, y están limitadas a responder si el paciente tiene sensibilidad o no a ciertos estímulos (5,39). La principal desventaja de la subjetividad de las pruebas es que, frente a un diagnóstico incorrecto, se puede indicar un tratamiento equivocado, no acorde al real estado inflamatorio de la pulpa, llevando a sobretratar (indicar un tratamiento cuando no estaba indicado) o subtratar (no indicar un tratamiento cuando estaba indicado) dientes. Es por esto, que los métodos de diagnóstico moleculares por medio del análisis de biomarcadores, podrían dar respuesta a este problema.

Hipótesis



3 HIPÓTESIS

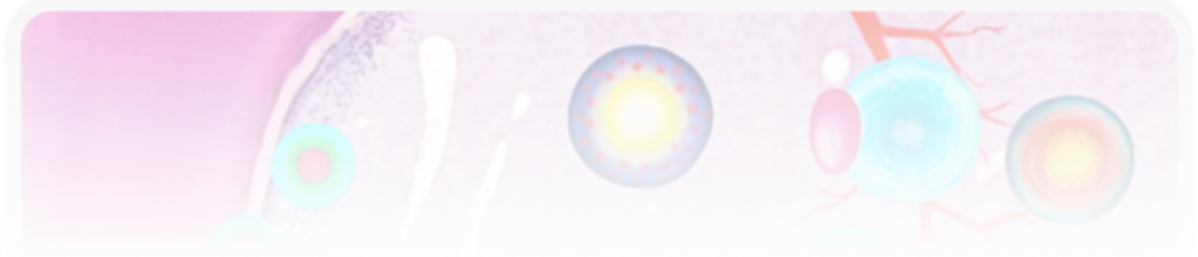
3.1 Nula

- No existe un perfil diferencial de biomarcadores obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática.

3.2 Experimental

- Existe un perfil diferencial de biomarcadores obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática.

Objetivos



4 OBJETIVOS

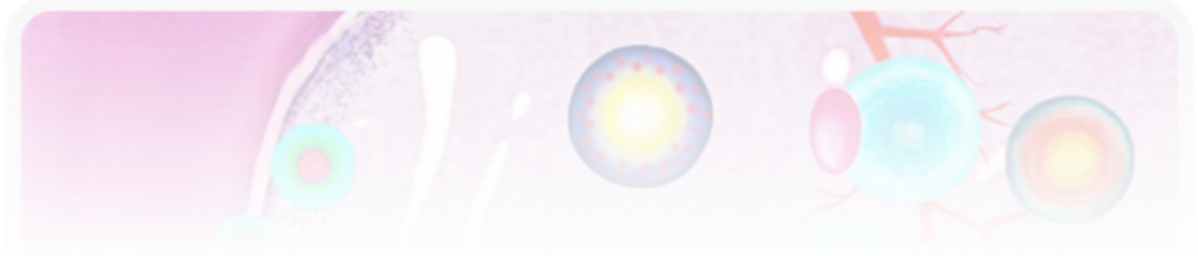
4.1 Objetivo General

Explorar un perfil diferencial entre biomarcadores inflamatorios obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática.

4.2 Objetivos Específicos

- Relacionar el diagnóstico clínico de pulpa normal y pulpitis irreversible sintomática obtenido con las pruebas de sensibilidad pulpar de frío, calor y eléctrica versus la histología.
- Relacionar y comparar el diagnóstico clínico obtenido con las pruebas de sensibilidad pulpar de frío, calor y eléctrica versus la prueba vitalidad utilizando láser Doppler.
- Determinar la concentración de proteínas en muestras de fluido dentinario de dientes humanos con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática utilizando membrana de fluoruro de polivinilideno Durapore® (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a través del ensayo de Micro BCA.
- Identificar y comparar la expresión de biomarcadores inflamatorios presentes en muestras de fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible, y pulpitis irreversible sintomática mediante tecnología Luminex.
- Analizar la capacidad de discriminación de cada biomarcador entre los diagnósticos de pulpitis reversible versus pulpitis irreversible sintomática.

Método



5 METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

El presente estudio es Observacional Transversal de Diagnóstico, pues busca evaluar marcadores de pulpa normal, pulpitis reversible e irreversible sintomática.

5.2 Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por dos comités de ética: el comité de ética del Servicio Metropolitano Oriente SSMO06_12_2016 (<http://www.cec-ssmoriente-adultos.cl>) (Anexo 5) y el comité de ética del Servicio de Salud de la Universidad de los Andes ubicado en la comuna de San Bernardo (Anexo 6) y la autorización del jefe servicio del establecimiento (CESA) (Anexo 7). Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos que tienen su origen en la declaración de Helsinki revisada (64a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2008) y que son consistentes con las Buenas Prácticas Clínicas y los requerimientos regulatorios aplicables:

- No tuvo coste para los sujetos que decidieron participar en el estudio.
- Los sujetos que decidieron participar en el estudio, no recibieron un pago monetario por participar de él.
- El investigador y los co-investigadores declararon no tener conflicto de intereses.
- Existió una protección de los participantes: si hubiese ocurrido un efecto adverso, la institución se haría cargo de solucionarlo. Sin embargo, esto no ocurrió.
- Buenas prácticas clínicas (BPC): Los sujetos fueron informados de los objetivos, beneficios y riesgos de la investigación, así como de las alternativas terapéuticas existentes.

5.3 Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra se estableció de forma arbitraria por conveniencia, debido a la ausencia de estudios previos que evalúen muestras de fluido dentinario, que permitirán realizar un cálculo de tamaño muestral probabilístico. Para cada objetivo se estableció un tamaño muestral que varió de acuerdo a las condiciones de los experimentos, éstos se detallarán en cada método.

5.4 Muestra

Población: La población muestral correspondió a pacientes de sexo femenino y masculino, de entre 12 y 55 años de edad. Éstos fueron reclutados en la Clínica Odontológica del Centro de Salud de la Universidad de los Andes (CESA), ubicada en la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana, Santiago, Chile entre los meses de marzo del año 2016 a agosto del año 2017. Estos pacientes acudieron a la clínica para realizarse diversos tratamientos odontológicos. Algunos presentaban dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible sintomática, que requerían de tratamiento endodóntico; otros con diagnóstico de pulpitis reversible, que requerían de tratamiento restaurador; y finalmente pacientes con premolares con pulpa normal, con indicación de exodoncia por ortodoncia. El tamaño muestral fue distinto para cada objetivo y será descrito cuando se explique cada procedimiento durante el desarrollo del material y método. Los pacientes debían cumplir con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

5.5 Criterios de Inclusión y exclusión

5.5.1 Criterios de Inclusión

- **Pacientes**
 - Pacientes entre 12 y 55 años de edad.
 - Pacientes sistémicamente sanos (ASA I).
 - Pacientes no fumadores actuales.
 - Pacientes sin enfermedad periodontal (sin bolsas periodontales mayores a 3 mm).
 - Pacientes que aceptasen firmar el consentimiento o asentimiento informado (Anexo 8).

- **Dientes**
 - Dientes premolares, caninos, incisivos y molares con diagnóstico de pulpa normal y de pulpitis irreversible sintomática luego de ser realizadas pruebas de sensibilidad pulpar (frío, calor, eléctrico) y de vitalidad pulpar (láser doppler).
 - Dientes que al examen radiográfico presentaron ligamento periodontal apical normal y sin señales de reabsorción interna.

- Dientes con posibilidad de ser restaurables mediante rehabilitación.
- Dientes sin comunicación pulpar previa.

5.5.2 Criterios de Exclusión

- **Pacientes**

- Pacientes con historia de enfermedades sistémicas, que alteren la función inmunológica, como diabetes mellitus, inmunodeficiencia, leucemia, enfermedad de Addison o de Cushing.
- Pacientes fumadores.
- Pacientes que hayan consumido fármacos inmunosupresores o recibido quimioterapia 3 meses antes del estudio.
- Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
- Pacientes que hayan ingerido antibiótico, antiinflamatorios o analgésicos la semana antes de la colección de la muestra.
- Pacientes que no dispongan de un número telefónico para su contacto durante el estudio.
- Pacientes con alergia a cualquier material o medicamento utilizado en el estudio.

- **Dientes**

- Dientes que fueron tratados endodónticamente en forma previa.
- Dientes que al examen clínico o radiográfico presenten signos de reabsorción interna o externa.
- Dientes con movilidad clase III o Dens invaginatus.
- Dientes con historia de avulsión.
- Dientes con evidencia clínica y/o radiográfica de fractura radicular.
- Dientes que no puedan ser aislados en forma absoluta con dique de goma.
- Dientes con evidencia clínica y/o radiográfica de atrofia pulpar.
- Dientes con ápice abierto

5.6 Grupos experimentales

Se evaluaron tres grupos experimentales; el primer grupo constituido por dientes con diagnóstico de pulpa normal, el segundo grupo por dientes con diagnóstico de pulpitis reversible y el tercer grupo constituido por dientes con diagnóstico de

pulpitis irreversible sintomática. Los criterios para esta clasificación que se utilizaron en esta investigación, fueron los descritos en la clasificación propuesta por la AAE y serán mencionados a continuación:

- **Grupo pulpa normal:** Premolares de pacientes sin historia de dolor, derivados a Cirugía Bucal, para realizar exodoncia por indicación ortodóncica. Al examen clínico y radiográfico deben estar libres de caries o restauraciones profundas, sin ligamento periodontal apical ensanchado ni radiolucidez apical detectable. Deben responder a las pruebas de sensibilidad pulpar frío (1,1, 1, 2- tetrafluoroetano) y calor (varilla de gutapercha) de forma normal, sin una respuesta aumentada en intensidad ni tiempo en comparación al diente control.
- **Grupo pulpitis reversible:** Dientes de pacientes con diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican la inflamación debería resolverse y la pulpa volver a la normalidad. Al examen clínico y radiográfico pueden presentar caries o restauraciones de mediana a gran profundidad, sin ligamento periodontal apical ensanchado ni radiolucidez apical detectable. Deben responder a los test de sensibilidad pulpar frío (1,1, 1, 2-tetrafluoroetano), calor (varilla de gutapercha) y eléctrica de forma aumentada en intensidad, pero no en duración en comparación al diente control.
- **Grupo pulpitis irreversible sintomática:** Dientes de pacientes con diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la pulpa vital está inflamada es incapaz de curar. Descripciones adicionales: dolor térmico persistente, dolor espontáneo, dolor referido. Al examen clínico y radiográfico pueden presentar caries o restauraciones de mediana o gran profundidad, sin ligamento periodontal apical ensanchado ni radiolucidez apical detectable. Deben responder a los a los test de sensibilidad pulpar frío (1,1, 1, 2- tetrafluoroetano), calor (varilla de gutapercha) y eléctrica de forma aumentada en intensidad y duración en comparación al diente control.

5.7 Categorización de las muestras

NF: Fluido dentinario de dientes con diagnóstico de pulpa normal.

RF: Fluido dentinario de dientes con diagnóstico de pulpitis reversible.

IF: Fluido dentinario de dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible.

5.8 Técnica de recolección de la información

Sólo un diente por paciente fue incluido en el estudio para evitar una posible agrupación de los datos. Se generó una hoja de registro donde se ingresaron los datos del paciente (Anexo 22). Posteriormente para la evaluación de los datos se asignó un código para cada paciente con el que fue identificado en forma confidencial y los datos fueron vertidos a una base de datos destinada para ello, protegiendo de esta forma la privacidad y confidencialidad de éstos. La información que se registró fue; edad, sexo, diente, escala de dolor EVA, resultados de las pruebas de sensibilidad, resultados de las pruebas de vitalidad y diagnóstico pulpar. Con esta información se creó una base de datos para ser analizada estadísticamente.

5.9 Diagnóstico clínico

Para obtener el diagnóstico clínico se tomaron radiografías digitales Retroalveolares y Bite wing con posicionador, al diente control y al diente a evaluar. El equipo utilizado fue de marca HELIODENT vario® de Sirona, con un tiempo de exposición de 3,2 segundos a 70 KV y se utilizó una película radiográfica digital de placa de fósforo. La técnica utilizada fue la del paralelismo con ayuda de un posicionador Kit básico XIOS XG® Sirona. Además, se realizaron las pruebas de sensibilidad térmicas de frío, calor y eléctrica primero en el diente control y luego en el diente a evaluar según el siguiente protocolo:

5.9.1 Protocolo de las pruebas de sensibilidad

Una vez determinado el diente que participaría en el estudio se seleccionó el diente control, el cual debía estar libre de caries, enfermedad periodontal, restauraciones muy extensas o pérdida de sustancia coronaria.

Para efectos de este estudio se utilizó como diente control el diente contralateral similar al diente a analizar. En caso que este diente no cumpla con las características indicadas para un diente control, se utilizará el diente más sano y similar en anatomía al evaluar y que cumpla con los criterios antes mencionados.

- **Protocolo de la prueba del frío:**
 - Se utilizó el compuesto 1,1, 1, 2- tetrafluoroetano, comercialmente llamado Endolce (Refrigerante Endo-Ice de Hygenic, -26 °C).

- Se le explicó al paciente que sentirá una temperatura fría y que debe avisar con una señal cuando esto ocurra. Una vez retirado el estímulo, se evaluó la intensidad del dolor en escala de visualización análoga (EVA 1-10) y su duración en segundos. Esta escala de visualización análoga permite medir la intensidad del dolor que describe el paciente con la máxima reproducibilidad entre los observadores. Consiste en una línea horizontal de 10 unidades, en cuyos extremos se encuentran las expresiones extremas de un síntoma. En el lado izquierdo se ubica la ausencia o menor intensidad y en el derecho la mayor intensidad. Ésta se mide en escala de 1 al 10 y para efectos de este estudio la valoración fue la siguiente:
 - Dolor leve si el paciente puntúa el dolor entre 1 y 3.
 - Dolor moderado si el paciente puntúa el dolor entre 4 y 7.
 - Dolor severo si el paciente puntúa el dolor entre 8 y 10.
- Se identificó el diente control.
- Se aisló de manera relativa ubicando torundas de algodón en el fondo del vestíbulo.
- Se secó la zona a evaluar con jeringa triple por 20 segundos.
- Se aplicó Endo Ice (Hygenic) con adaptador plástico previamente posicionado sobre una torunda de algodón por 3 segundos.
- Se ubicó la torunda de algodón sobre el tercio medio de la superficie vestibular del diente a evaluar.
- Se esperó la respuesta por parte del paciente y se registraron los datos en una tabla diseñada para ese fin.
- Se esperó un minuto y se repitió el procedimiento primero en el diente control y luego en el diente a evaluar.

- **Interpretación de la prueba del frío:**

Se evaluó la respuesta en términos de intensidad y duración, comparando la respuesta obtenida con la información entregada por el paciente cuando se realizó la prueba al diente control.

- Se consideró una respuesta normal en duración, cuando la sensibilidad al estímulo frío se detuvo inmediatamente al retirarse la torunda de algodón con Endo Ice (Hygenic).
 - Se consideró una respuesta aumentada en duración, cuando la sensibilidad al estímulo frío persistió más de dos segundos una vez retirada la mota de algodón con Endo Ice (Hygenic).
 - Se consideró una respuesta negativa en duración, cuando el paciente no tuvo respuesta al estímulo frío luego de 15 segundos de aplicación.
 - Se consideró una respuesta normal en intensidad, cuando el registro de EVA del diente evaluado fue igual al registro EVA del diente control.
 - Se consideró una respuesta aumentada en intensidad, cuando el registro EVA del diente evaluado fue mayor al registro EVA del diente control.
 - Se consideró una respuesta disminuida en intensidad, cuando el registro EVA del diente evaluado fue menor al registro EVA del diente control.
- **Protocolo de la prueba de calor:**
 - Se utilizó una barra de gutapercha caliente.
 - Se le explicó al paciente que sentiría una temperatura y que debería avisar con una señal cuando esto ocurriera. Una vez retirado el estímulo, se evaluó la intensidad del dolor en escala de visualización análoga (EVA 1-10) antes explicada y su duración en segundos.
 - Se identificó el diente control.
 - Se aisló de manera relativa ubicando torundas de algodón en el fondo del vestíbulo.
 - Se secó la zona a evaluar con jeringa triple por 20 segundos.
 - Se le aplicó vaselina sólida al diente control y al diente a evaluar.
 - Se calentó una barra de gutapercha en un mechero por 5 segundos, hasta lograr que la gutapercha se observara brillante y reblandecida.
 - Se posicionó la barra de gutapercha caliente en el tercio medio de la cara vestibular del diente.
 - Se esperó la reacción por parte del paciente, durante máximo 15 segundos y se registraron los datos en una tabla diseñada para ese fin.

- Se esperó un minuto y se repitió el procedimiento primero en el diente control y luego en el diente a evaluar.

- **Interpretación de la prueba del calor:**

Se evaluó la respuesta en términos de intensidad y duración, comparando la respuesta obtenida con la información entregada por el paciente cuando se realizó la prueba al diente control.

- Se consideró una respuesta normal, cuando la duración de la sensibilidad al estímulo térmico se detuvo inmediatamente cuando se retiró la barra de gutapercha.
- Se consideró una respuesta aumentada en duración, cuando la sensibilidad al estímulo térmico persistió más de dos segundos una vez retirada la barra de gutapercha.
- Se consideró una respuesta negativa, cuando el paciente no tuvo respuesta al estímulo térmico luego de 15 segundos.
- Se consideró una respuesta normal en intensidad, cuando el registro EVA del diente evaluado fue igual o menor al registro EVA del diente control.
- Se consideró una respuesta aumentada en intensidad, cuando el registro EVA del diente evaluado fue mayor al registro EVA del diente control.

- **Protocolo de Prueba eléctrica:**

- Se utilizó la unidad diagnóstica de Sybronendo “Elements™ Diagnostic Unit Electronic Pulp Tester and Apex Locator”.
- Se le explicó al paciente que con el examen que se realizó, probablemente sentiría distintas sensaciones como hormigueo, presión o calor.
- Se identificó el diente control.
- Se aisló de manera relativa utilizando torundas de algodón en el fondo del vestíbulo.
- Se secó la zona a evaluar con jeringa triple por 20 segundos.
- Se encendió la unidad diagnóstica de Sybron Endo.
- Se ajustó el dial del equipo en el número “1”.

- Se conectó la pinza labial en la línea de descarga a tierra y el inserto de la varilla de la sonda.
 - Se ubicó el clip labial en labio del paciente.
 - Se aplicó una pequeña cantidad de anestésico tópico utilizado como conductor en la punta del inserto y se ubicó en la superficie escogida del diente, evitando que contacte la encía.
 - Cuando alcanzó un buen contacto se inició el registro.
 - Una vez que el paciente reportó que percibió el estímulo se retiró la punta del inserto en contacto con el diente.
 - Se leyó y registró el número indicado en el monitor del dispositivo en una tabla diseñada para ese fin.
- **Interpretación de la prueba eléctrica:**
 - Según el diente a tratar y de acuerdo a las indicaciones del fabricante se consideró un registro normal de acuerdo a la siguiente tabla 1:

Diente	Rango normal
Incisivos y caninos	10-30
Premolares	20-40
Molares	30-50

Tabla 1, Interpretación de la prueba eléctrica

5.9.2 Protocolo pruebas de la prueba de vitalidad

La Flujometría Laser Doppler se realizó con la unidad de medición MoorVMS-LDF; Moor Instruments Ltd, Axminster, UK. La fuente del láser fue de 785 nm de longitud de onda, la que fue transmitida a través de una sonda VP3 de punta roma con un diámetro externo de 1,5 mm y una longitud de 20 mm, que contiene una fibra aferente y otra eferente, existiendo una separación entre las fibras de 0,5 mm y cada una con un diámetro de 200 micras. Se utilizó un ancho de banda de 3 KHz, recomendado por el fabricante y los valores fueron registrados cada 0,1 segundos. El protocolo fue el siguiente:

- Las sondas MoorLab VP13 y VP5 fueron calibradas en un medio de movimiento browniano (Figura 14). Esto se realizó de acuerdo a recomendaciones del fabricante en forma mensual.



Figura 14, Calibración de la sonda.

- Se confeccionó una férula para los dientes de cada paciente, con silicona pesada de adición (AFFINIS soft/fast putty, AFFINIS regular body; Coltene/Whaledent, Cuyahoga Falls, OH). Esto permite fijar y posicionar correctamente la sonda.
- Se realizaron perforaciones en la férula a 3 mm del margen gingival, con el objetivo de fijar la punta de la sonda en forma perpendicular al diente a evaluar (Figura 12).
- El paciente descansó en posición supina durante 15 minutos antes de comenzar la prueba, para adaptarse al ambiente. Se procuró que el paciente estuviera relajado, cómodo y que respirara normalmente (respiraciones profundas pueden alterar las mediciones) (Figura 15).



Figura 15, Paciente en posición supina con férula y sonda conectada a equipo.

- Se le explicó al paciente que no debía hablar durante la medición.
- Primero se realizó la prueba en el diente control, y una vez realizado el registro se procedió con el diente a evaluar.
- Para realizar el registro se utilizó el Software Moor VMS-PC (Moor Instruments Ltd), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (53).
- Se utilizó un tiempo de 30 segundos para realizar el registro de cada diente y se realizaron 2 mediciones por diente.

5.9.3 Interpretación de la prueba de vitalidad

La vitalidad pulpar es confirmada examinando la pulsatilidad y magnitud de la señal. En dientes vitales por lo general se observa un componente pulsátil (frecuencia cardiaca) (Figura 16). Se procedió a calcular el porcentaje de unidades de perfusión del diente a evaluar con respecto a su control, mediante una regla de tres:

$$\% \text{ de unidades de perfusión} = \frac{\text{UP media diente a evaluar}}{\text{UP media diente control}} \times 100$$

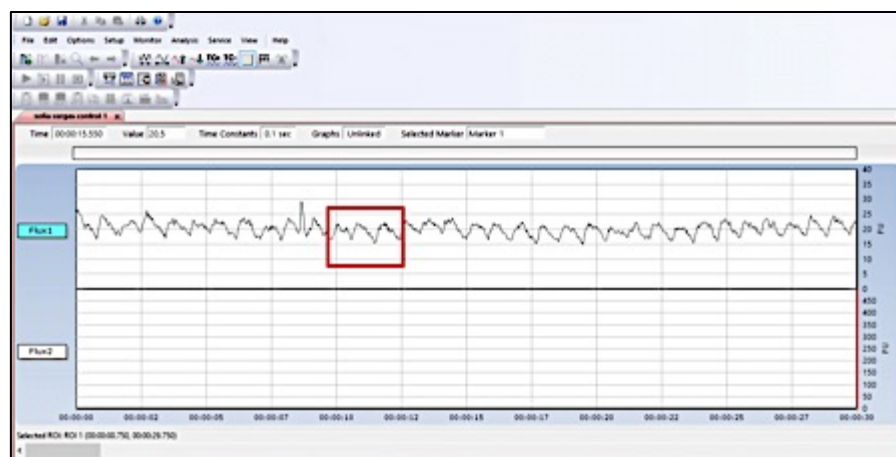


Figura 16, Se observan destacados 3 picos pulsátiles.

5.9.4 Sesgos

Para evitar sesgos y dar validez interna a las pruebas de sensibilidad y vitalidad, se tomaron las siguientes consideraciones:

- Todos los procedimientos diagnósticos realizados en esta investigación, tanto los de sensibilidad como los de vitalidad pulpar, fueron realizados por el mismo operador calibrado para esta actividad.

- En todo momento se siguieron los protocolos operacionales previamente diseñados para realizar las pruebas diagnósticas de sensibilidad pulpar y vitalidad, de forma estandarizada.
- Los pacientes seleccionados para esta investigación aportaron sólo un diente para evitar la agrupación de los datos.
- Se hicieron dos mediciones de vitalidad pulpar en cada diente.
- Se siguieron en forma estricta, los criterios de inclusión y exclusión para dientes y pacientes.
- Todos los diagnósticos clínicos se realizaron siguiendo la clasificación de la Asociación Americana de Endodoncia (23) para homologar los resultados con otras investigaciones.

5.10 Relación entre pruebas de sensibilidad versus prueba de vitalidad

Como fue mencionado anteriormente, el tamaño de la muestra para esta evaluación se determinó en forma arbitraria por conveniencia, debido a la falta de estudios previos que nos permitieran realizar un cálculo de tamaño muestral de manera probabilística. La unidad muestral para este objetivo fue de 70 dientes de 70 pacientes. Un grupo estuvo constituido por 23 dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible sintomática, otro grupo con 24 dientes con diagnóstico de pulpitis reversible y finalmente un grupo constituido por 23 dientes con diagnóstico de pulpa normal. Se comparó el porcentaje de unidades de perfusión obtenidas de los dientes evaluados en relación a su diente control, con los diagnósticos de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática.

5.11 Preparación de membrana Durapore para tomar muestras de fluido dentinario

Los filtros de membrana hidrofílicos que se utilizaron para tomar las muestras de fluido dentinario fueron Durapore® (0,45 μm , 13 mm de diámetro, Merck Millipore, Ltda. Bedford, MA), fueron cortados en 4 partes iguales y luego esterilizados con calor húmedo a 125°C (Figura 17).

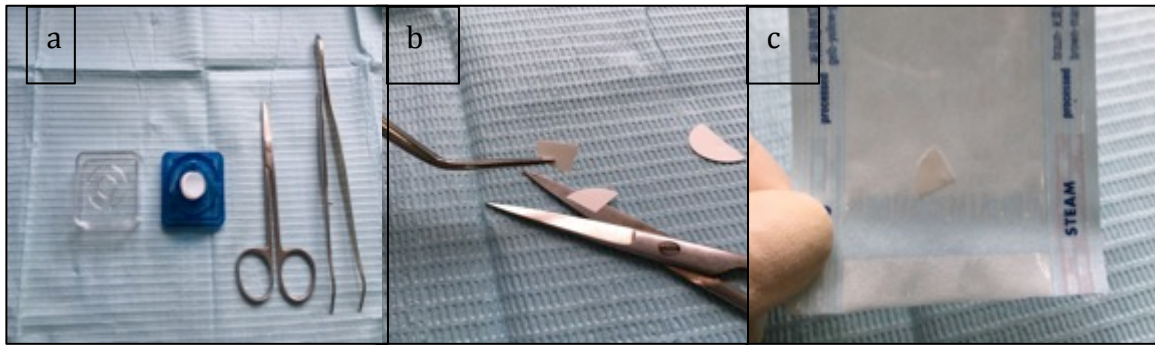


Figura 17, Preparación de papel Durapore® para su utilización. En la imagen a, se observan los materiales necesarios para este procedimiento. En la imagen b, se observa el corte en $\frac{1}{4}$ para ser posicionado correctamente en la cavidad. En la imagen c se observa el papel ya esterilizado y listo para su utilización.

Estos filtros poseen un tamaño del poro de $0,45\mu\text{m}$, una porosidad del 70% y un espesor de $125\mu\text{m}$.

(Figura 18).



Figura 18, Membrana Durapore formato de venta y microscopia donde se observa la porosidad de los filtros de membrana. Fuente (133) Merck Millipore, Billerica, MA, USA.

5.12 Protocolo de toma de muestra de fluido dentinario

- El siguiente protocolo describe el proceso de toma de muestra de fluido dentinario necesario para este estudio. El fluido dentinario a analizar fue de dentina afectada, la cual se define como la capa de dentina afectada por caries con desnaturalización de ésta en forma reversible. Es remineralizable y contiene poca cantidad de bacterias, encontrándose sensible y vital. Se aloja en los túbulos dentinarios y su composición incluye mediadores inflamatorios y compuestos vasoactivos asociados con la inflamación. Mientras la evidencia hasta el momento sugiere que estos

mediadores pueden ser analizados, surgen problemas con la obtención de dichas proteínas. Por esto es necesario, remover las restauraciones existentes y preparar una cavidad en dentina profunda. Una vez identificado al paciente y seleccionado el diente a investigar, cumpliendo los criterios de inclusión de este estudio y firmado el consentimiento informado. Se realizó el procedimiento clínico utilizando magnificación con lupas con un aumento de 3.5X y a una distancia de trabajo de 400 mm (EyeMag Modelo Pro F; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania):

- Se puso anestesia (Clorhidrato de lidocaína al 2% con epinefrina 1: 80,000; Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Francia) con técnica infiltrativa o troncular según sea el caso.
- Se eliminaron de restauraciones antiguas, caries o dentina infectada con turbina y fresas nuevas de alta velocidad de distintos tamaños (Kerr Beavers Dental, Morrisburg, Canada), dejando expuesta dentina dura o tipo cuero.
- Se aisló el diente de manera absoluta utilizando dique de goma (Hygienic; Coltene/Whaledent AG) y clamps adecuados, además se utilizó barrera de protección gingival (OpalDam® SDS) para lograr un mejor sellado marginal y evitar posibilidades de contaminación de la toma de muestra.
- Se desinfectó el dique de goma con gasa con alcohol al 70%.
- Con una pinza estéril se tomó el papel estéril Duraport® 0,45 µm, 13 mm de diámetro (Millipore, Bedford, MA), para tomar la muestra del fluido dentinario.
- El papel se mantuvo en la cavidad por un período de 2 minutos, para estandarizar la toma de muestra.
- Inmediatamente la muestra fue almacenada en un tubo microcentrifuga Eppendorf® LoBind estéril de 1,5mL, rotulándolo con código asignado al paciente, diagnóstico y fecha. Este procedimiento se realizó en duplicado.
- Todas las muestras fueron almacenadas en un IsoFreeze® Flipper, inmediatamente después de ser tomadas y luego guardadas en congelador a -20°C para evitar su desnaturalización.
- Posteriormente las muestras fueron llevadas en un periodo de 3 horas al Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral (CIBRO) de la

Universidad de Los Andes, para su almacenamiento a -80°C y posterior su análisis.

5.13 Preparación de las muestras

Los filtros de papel fueron retirados de la temperatura en que se encontraban (-80°C) y mantenidos durante 10 minutos a temperatura ambiente para su descongelamiento. Cada filtro de papel se trasladó a un tubo ependorff de 2mL y se agregó un volumen de 350ul de Buffer 1:PBS1X + 0,1% de detergente Tween 20 y se dejaron en reposo por 30 minutos. Posteriormente se agitaron las muestras a baja velocidad con Vórtex Mixer MRC Laboratory Equipment a temperatura ambiente, para luego centrifugarlas durante 5 minutos a 10.000 xG en centrífuga de sobremesa PrismR Labnet USA refrigerada a 4°C. Los eluidos fueron conservados a -80°C hasta su utilización.

5.14 Determinación de la concentración total de proteínas

Para determinar la concentración total de proteínas la unidad muestral fue de 33 dientes de 33 pacientes; 10 del grupo de pulpa normal; 8 del grupo de pulpitis reversible y 15 del grupo de pulpitis irreversible. De cada diente se obtuvieron las muestras de fluido dentinario en duplicado. Se realizó el ensayo de micro BCA que mide la absorbancia de luz espectrofotométricamente a 562nm. Para poder obtener la concentración total de proteínas de las muestras recolectadas, el fabricante indica que estas muestras deben ser comparadas con soluciones de proteínas de concentraciones conocidas. Es por esto que el kit, en su composición trae albumina de suero bovino estándar de 2.0 mg/mL, con el que se realizó la curva estándar de comparación. Posterior a esto se prepararon las soluciones de trabajo, las cuales fueron mezcladas con las eluciones realizadas a las muestras a evaluar, para su posterior lectura en el equipo lector de microplacas Tecan CM Sunrise 350-700 nm.

Reactivos del kit:

- Reactivo A (MA) 240 mL
- Reactivo B (MB) 240 mL
- Reactivo C (MC) 12 mL

Albúmina de suero bovino estándar de 2.0mg/mL en una solución salina al 0.9% y azida de sodio al 0.05%.

Preparación de los reactivos para la estandarización de trabajo o curva estándar

A. Preparación del estándar de albúmina diluida (BSA)

Se siguieron las recomendaciones del fabricante para preparar patrones de proteína. Se diluyó el contenido de una ampolla de Albumina (BSA) Standard en varios tubos limpios, preferiblemente usando un diluyente similar al tampón de muestra. Cada ampolla de 1 mL de 2,0 mg / mL de Albúmina es suficiente para preparar un conjunto de patrones diluidos, de manera que se puedan incluir tres repeticiones de cada dilución en el Procedimiento del Tubo de Ensayo.

B. Cálculo de los reactivos de trabajo (WR)

Utilizando las formulas entregadas por el fabricante se realizó el cálculo de los reactivos de trabajo. La fórmula corresponde al número de controles más el número de muestras del estudio multiplicado por el número de duplicados, todo esto multiplicado por la cantidad de mL de cada tubo a usar. Esto nos dio la cantidad de mL finales que se deben preparar para cada tubo.

C. Preparación de los reactivos de trabajo

Éstos estuvieron en un relación de 25:24:1 partes de reactivo (a:b:c).

12,5 mL reactivo A.

12.0 mL reactivo B.

0.5 mL reactivo C.

D. Preparación de la Curva de trabajo para la microplaca. Rango de 2 – 20 µl

1. Se pipeteó 150 µL de cada duplicado de muestra estándar o desconocida en un pocillo de microplaca.
2. Se agregó 150 µL del WR a cada pocillo y se mezcló la placa en un agitador de placas durante 30 segundos.
3. Se cubrió la placa con una cinta de sellado para placas de 96 pocillos e incubó a 37 °C durante 2 horas.
4. Se enfrió la placa a temperatura ambiente (RT).
5. Se midió la absorbancia en o cerca de 562nm en un lector de microplacas Tecan CM Sunrise 350-700 nm.

6. Se restó la lectura de absorbancia media de 562nm de las repeticiones Estándar en Blanco de la lectura de 562nm, de todas las demás repeticiones individuales de muestra estándar y desconocida.

7. Se preparó una curva estándar trazando la lectura media de 562nm corregida en blanco para cada estándar de BSA frente a su concentración en $\mu\text{g} / \text{mL}$.

8.-Se utilizó la curva estándar para determinar la concentración de proteínas de cada muestra desconocida.

5.15 Histología de la pulpa

5.15.1 Protocolo toma de muestra para realizar análisis histológico del tejido pulpar

Por consideraciones éticas, sólo se tomaron muestras histológicas de dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible sintomática y pulpa normal. Se obtuvieron 42 muestras de pulpas humanas, 21 con diagnóstico de pulpa normal y 21 con diagnóstico de pulpitis irreversible sintomática. El siguiente protocolo describe la toma de muestra histológica del tejido pulpar, una vez obtenida la muestra de fluido dentinario. Toda la parte preliminar ya fue descrita.

- Se realizó la cavidad de acceso para exponer el tejido pulpar con fresas de nuevas de alta velocidad estériles de distintos tamaños (Kerr Beavers Dental, Morrisburg, Canada).
- Se realizó irrigación con suero fisiológico.
- Con limas endodónticas o extractores pulpares (color y diámetro adecuado al caso) se extirpó el tejido pulpar.
- Se depositó la pulpa rápidamente en un tubo eppendorf de 1.5mL estéril con 500 μm . de formalina, rotulándola con código asignado al paciente y con la fecha.

5.15.2 Procesamiento histológico

- Las 41 muestras de pulpas fueron fijadas en formalina al 4% tamponada (SIGMA) por un periodo mínimo de 18 horas.
- Todos los eppendorf contenían tejido de al menos 3 mm^2 , de color blanquecino sin identificación de la orientación (no se sabe que parte de la pulpa corresponde a apical o coronal).

- Una muestra se eliminó del estudio ya que se degradó durante el procesamiento del tejido y en las otras fue imposible obtener una cantidad de tejido suficiente para el estudio.
- La deshidratación e impregnación con parafina histológica (HistoPlast), se realizó en un procesador de tejido de carrusel con protocolo estándar (160).
- Los cortes fueron realizados con un micrótopo rotatorio tipo minot (Sakura accut Cut) con navaja de perfil bajo (histo cutter) de un grosor de 3 μm .
- Se realizaron tinciones de Hematoxilina Eosina (HE) (Sigma), Tricromico de Masson y Tricromico de Van Gieson (TM) (Merck KGaA) siguiendo protocolos convencionales de tinción. Luego las muestras fueron montadas para su posterior análisis.

5.15.3 Microscopia óptica

Las 41 muestras fueron observadas con magnificación de 10X y 40X con el microscopio óptico invertido (CKX41 Olympus), conectado con una cámara digital UTV 0.5.0. Las fotografías fueron capturadas con el software micrometrics Micrometrics® SE Premium (Version 3.0) y posteriormente analizadas con el software Image J (NIH) Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD.

5.15.4 Análisis cualitativo

Para el análisis cualitativo se realizó una identificación histomorfológica, en donde se reconocieron las diferentes estructuras teñidas en los tejidos con las tres tinciones, en un aumento de 40X. Se eligieron las 2 zonas más representativas del tejido, cada una de 50 μm^2 . Los dientes fueron clasificados histológicamente en 2 categorías de acuerdo a una ligera modificación de los criterios propuestos por Anderson (81) y posteriormente Ricucci y cols (161). Esto debido a que en este estudio sólo se obtuvo el tejido pulpar y no el diente completo. La clasificación utilizada en este estudio se describe a continuación:

Clasificación histológica según diagnóstico:

Pulpa normal:

- Debe presentar un tejido conectivo laxo con un gran número de núcleos con morfología fusiforme correspondiente a fibroblastos.

- Debe tener células con morfología cilíndrica a veces en empalizada similares a odontoblastos. No debe presentar células inflamatorias como linfocitos ni polimorfos nucleares.
- No debe presentar gran cantidad de células inflamatorias como linfocitos ni polimorfos nucleares.
- Las fibras colágenas deben estar organizadas en pequeños haces distribuidos homogéneamente por todo el tejido.
- Debe haber irrigación, representada por lúmenes de pequeños vasos sanguíneos.

Se consideró para efectos de este estudio como coincidencia si la muestra presentaba al menos tres de los cinco criterios antes señalados.

Pulpitis Irreversible sintomática:

- Debe presentar un tejido conectivo más denso, con mayor presencia de fibras colágenas.
- Debe presentar gran cantidad de células inflamatorias como linfocitos y polimorfos nucleares.
- Debe existir mayor vasodilatación pulpar, encontrando lúmenes de vasos sanguíneos voluminosos.
- Una característica frecuente debe ser signos de licuefacción, donde se destaca la pérdida de sustancia fundamental en parte del tejido o bien la degradación total de éste.

Se consideró para efectos de este estudio como coincidencia si la muestra presentaba al menos dos de los cuatro criterios antes señalados.

Toda la evaluación histológica y la tabulación se realizó a ciegas para eliminar el sesgo. Los portaobjetos fueron examinados por dos evaluadores independientes (I.R y C.R). Además, cada vez que se produjo un desacuerdo, fue resuelto por un tercer evaluador. El número de coincidencias de diagnóstico clínico versus histológico fue registrado.

5.16 Biomarcadores seleccionados

Fueron seleccionados 14 biomarcadores elegidos a partir de la búsqueda previa de la literatura y de estudios del equipo de investigación. Los seleccionados

fueron: TNF α , IL8, IL6, IL4, PDGF-BB, IL12p40, TIMP-1, CXCL10, IL1a, VEGF A, FGF Acid, MMP3 y MMP9.

Se armaron 3 kit de la marca R&D Systems®, Inc, Minneapolis, MN:

- Human Magnetic Luminex Screening Assay 13 plex:
 - Código rd.lxsahm-13.
 - Para 3 biomarcadores: PDGF-bb, IL12p40, TIMP-1
- Human Magnetic Luminex Screening Assay 3 plex:
 - Código: rd.lxsahm-06.
 - Para 6 biomarcadores: CXCL-10, IL-1 alpha, MMP-9, MMP-3, VEGF-a, FGF-acid
- Human High Sensitivity Cytokine Premixed kit:
 - Código: fcstm09
 - Para 5 biomarcadores: IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-alpha

5.17 Determinación de los niveles de biomarcadores

El tamaño de la muestra para este objetivo se determinó en forma arbitraria por conveniencia, debido a la falta de estudios previos que nos permitieran realizar un calculo de tamaño muestral de manera probabilística. La unidad muestral fue de 64 dientes de 64 pacientes Las muestras fueron divididas en tres grupos. Un grupo constituido por 21 dientes con diagnóstico de pulpa normal, 23 dientes con diagnóstico de pulpitis reversible y 20 dientes con diagnóstico pulpitis irreversible sintomática. Para realizar la medición de los biomarcadores obtenidos de las muestras se utilizó la tecnología Luminex (Luminex corporation, Austin, TX, USA), que es un ensayo inmunológico múltiple. Este ensayo mide varios analitos en una misma muestra en forma simultánea, utilizando un sistema de “Beads” (micro esferas) magnéticas, las cuales están acopladas a anticuerpos anti-biomarcadores específicos, que posteriormente son reconocidas y leídas por software especializados (Figura 19). En este caso se utilizó la plataforma analítica del equipo Luminex® 200 para su lectura.

El sistema Luminex® 200 es una combinación de tres tecnologías:

- La primera son las microesferas de poliestireno de tamaño micrométrico fluorescente que actúan como el identificador.

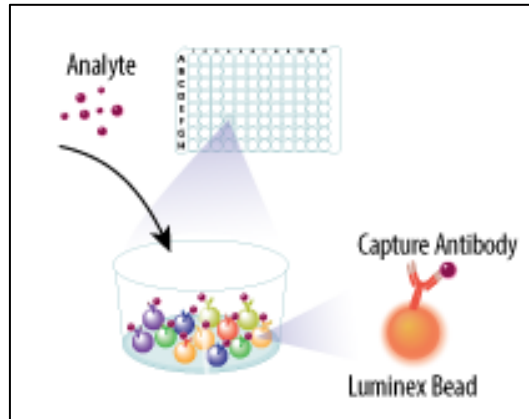


Figura 19, Representación de unión del anticuerpo seleccionado según proteína con “beads” del estudio Luminex®. Se observa cómo el analito es posicionado en el pocillo y se une con el anticuerpo específico que dará la fluorescencia.

- El segundo es el equipo, instrumento basado en citometría de flujo que integra los componentes claves de detección como láseres, óptica, fluidos y procesadores de señal de alta velocidad (Figura 20).

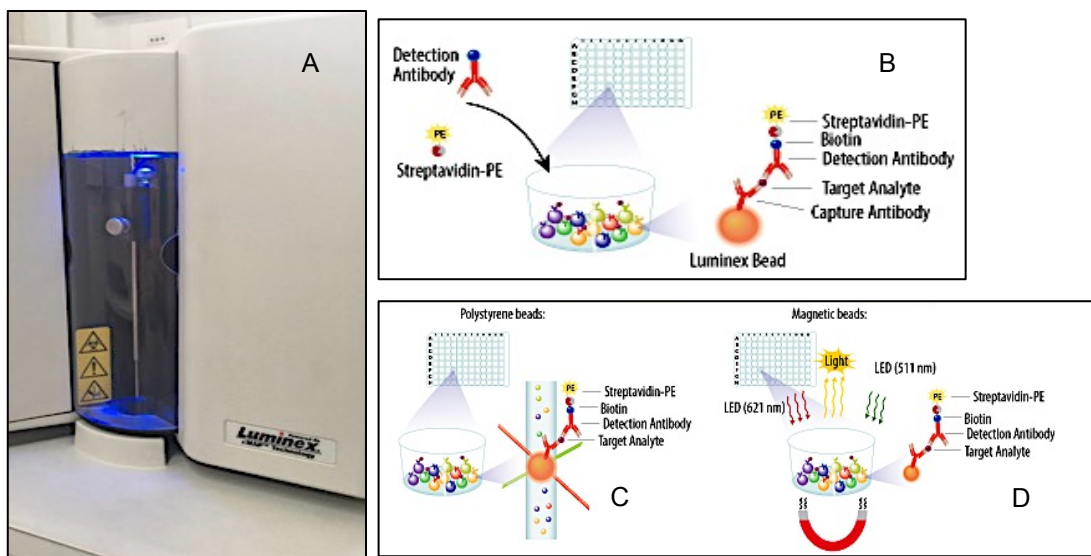


Figura 20, Láser del equipo Luminex® leyendo analitos. Proceso de medición antígeno – anticuerpo con láser bifásico. A: equipo Luminex® tomando la muestra para ser leída. B: representación de la unión antígeno-anticuerpo fotoactivada. C: representación antígeno-anticuerpo siendo desplazada por el tubo de lectura. D: gracias a un sistema de imán se produce el desplazamiento del analito.

- El tercero es el software xPONENT que lee los datos y los agrupa en “regiones” las cuales indican el analito a investigar, entregando los valores de fluorescencia obtenidos para cada muestra y curva estándar (Figura 21).

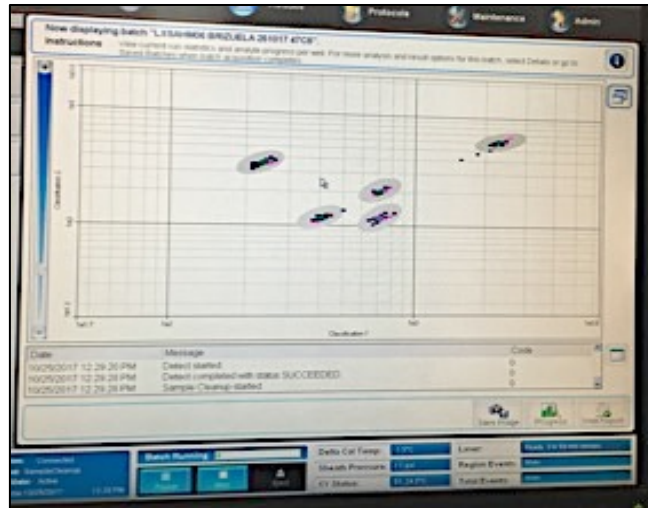


Figura 21, Software xPONENT y las regiones leídas según el analito a investigar. Se puede observar como los analitos leídos calzan dentro de las regiones.

El protocolo de los 14 analitos medidos se describe en el sitio web de la compañía (<http://www.RnDSystems.com/Products/LXSAHM>). La elusión de las muestras se realizó en 350µL buffer PBS x1Tween 0,05. Este volumen se determinó en un estudio paralelo del mismo grupo investigador con MICRO BCA (Micro BCA Assay kit, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Con este ensayo piloto se logró el mejor rendimiento del papel.

Previo al ensayo Luminex®:

- Se construyeron las curvas estándares haciendo una dilución seriada de un estándar que viene incluido en el kit según las recomendaciones del fabricante (Figuras 22-23).

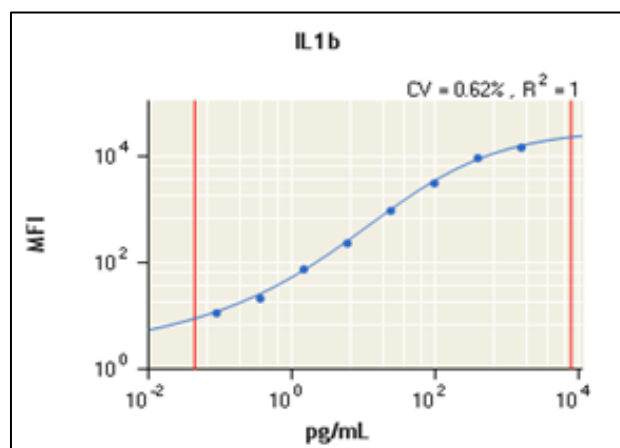


Figura 22, La curva se construye tomando los valores de MFI (fluorescencia) vs Expected (valor esperado para cada punto).

Expected pg/mL(i)	MFI(i)	MFI	CV	pg/mL(i)	pg/mL	Recovery
0	9	9.5	7.44%	0,047	0.053	
	10			0,06		
0.085	11.5	11.75	3.01%	0,082	0.086	101 %
	12			0,09		
0.342	21.5	23.75	13.4%	0,269	0.317	93 %
	26			0,365		
1.37	75.5	78.75	5.84%	1,543	1.623	119 %
	82			1,702		
5.47	229	220.25	5.62%	5,262	5.052	92 %
	211.5			4,842		
21.9	926	888.75	5.93%	22,012	21.093	96 %
	851.5			20,178		
87.5	3009.5	3027.5	0.84%	82,316	82.929	95 %
	3045.5			83,544		
350	8880.5	8452.5	7.16%	426	387	111 %
	8024.5			351		
1400	13888	14347.75	4.53%	1227	1352	97 %
	14807.5			1491		

Figura 23, Tabla entregada por el fabricante para los puntos de construcción de la curva específica para cada kit

Día 1 del ensayo Luminex®:

- Las muestras fueron descongeladas e incubadas 30 minutos a temperatura ambiente y luego incubadas con agitación (Agitador Vortex Marca Grant Instruments - Uk, Modelo Pv1) por 15 minutos.
- Posteriormente las muestras fueron centrifugadas (Centrifuga Heal Force modelo Neofuge 13R) por 5 minutos a 10.000 rpm para desprender las proteínas del papel Durapore®.
- Las muestras y curva estándar de cada kit fueron agregadas a una placa de 96 pocillos, junto con la mezcla de micro esferas e incubadas toda la noche a 4°C con agitación a 500 rpm en un agitador de placas (Agitador Vortex marca Labnet modelo VX100).

Día 2 del ensayo Luminex®:

- Las muestras fueron lavadas tres veces con el buffer de lavado y posteriormente se agregó el anticuerpo de detección biotinilado y se incubó por una hora a temperatura ambiente con agitación en el agitador de placas (Agitador Vortex marca Labnet modelo VX100).
- Luego se agregó estreptavidina-ficoeritrina (revelador) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- Finalmente, las muestras fueron lavadas tres veces con buffer de lavado.
- Las muestras fueron resuspendidas con buffer de lavado antes de leer y posicionadas en la plataforma de Luminex® 200 para su cuantificación (Figura 24).
- Para obtener los resultados de las muestras se utilizó el método de regresión logística de 5 parámetros del software Milliplex Analyst 3.5 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA USA).
- xPONENT es el software del equipo Luminex 200 que mide la fluorescencia de cada muestra.
- Milliplex Analyst realizó la regresión logística e interpoló en la curva estándar para obtener el resultado final.



Figura 24, Muestras posicionadas y láser de lectura listo para medición de analitos

Este valor fue obtenido gracias al software “Milliplex Analyst” utilizando el método de regresión logística de 5 parámetros, que es el método indicado en el inserto del kit para analizar los resultados.

5.18 Plan de análisis estadístico

Para cada objetivo se utilizaron pruebas estadísticas distintas que se explicarán a continuación.

- **Relación de los diagnósticos clínicos obtenidos con las pruebas de sensibilidad versus la prueba vitalidad utilizando láser Doppler**

Para cada paciente, se calculó el promedio y mediana de las unidades de perfusión de las dos mediciones realizadas (mediciones en duplicado), tanto para la pieza a evaluar como para su respectivo control. Luego se procedió a calcular el porcentaje de unidades de perfusión de la pieza a evaluar con respecto a su control, mediante una regla de tres:

$$\% \text{ de unidades de perfusión} = \frac{\text{UP media diente a evaluar} \times 100}{\text{UP media diente control}}$$

Para relacionar los resultados de Unidades de Perfusión de la prueba de vitalidad pulpar con los diagnósticos clínicos se utilizó la prueba estadística de Kruskal Wallis con un intervalo de confianza de un 95% ($p < 0.05$).

- **Determinación de la concentración de proteínas en muestras de fluido dentinario de dientes humanos con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática**

Para realizar este análisis estadístico se utilizó el test de Shapiro-Wilk para conocer la distribución de los datos en relación a la concentración de proteínas. Para establecer diferencias significativas entre la variable diagnóstico pulpar y la concentración de proteínas se utilizó el test de Kruskal–Wallis. Se consideró un intervalo de confianza de un 95% ($p < 0.05$).

- **Exploración un perfil diferencial entre biomarcadores inflamatorios obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática**

Las variables cuantitativas (concentraciones de biomarcador) se describieron con la medida de tendencia central y dispersión en cada grupo estudiado. Se evaluó las diferencias entre grupos con el test de Kruskal Wallis y la asociación entre la concentración de cada biomarcador y el outcome final como variable dicotómica

(pulpitis reversible/pulpitis irreversible sintomática), a través de un modelo de regresión logística. Reportándose el Odds Ratio (OR) y su respectivo intervalo de 99% de confianza. Se evaluó la capacidad predictiva del modelo a través de una curva ROC (área bajo la curva). Determinándose un score con aquellos biomarcadores que resulten tener buena capacidad de predicción, para obtener la mayor sensibilidad y especificidad. La elección se realizó mediante la comparación descriptiva del área bajo la curva (ROC). Esta área posee un valor comprendido entre 0.5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0.5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. Para efectos de este estudio se consideraron los siguientes valores recomendados por Hosmer (134):

- Excepcional comportamiento, sobresaliente discriminación: si AUC es mayor o igual a 0.9.
- Buen comportamiento, excelente discriminación: si AUC es mayor o igual a 0.8 y menor a 0.9.
- Regular comportamiento, aceptable discriminación: si AUC es mayor o igual 0.7 y menor a 0.8.
- Mal comportamiento, no discriminación: si AUC es mayor o igual a 0.50 y menor que 0.7.

El software utilizado para el análisis de los datos fue STATA 14.2.

Resultados



6 RESULTADOS

6.1 Relación entre pruebas de sensibilidad y de vitalidad

Del total de las muestras estudiadas ($n=70$), el 32,9% se diagnosticó como pulpa normal ($n=23$), el 34,3% como pulpitis reversible ($n=24$) y el 32,9% como pulpitis irreversible sintomática ($n=23$). El 21,4% eran hombres ($n=15$) y el 78,6% mujeres ($n=55$) (Tabla 2).

Característica	<i>n</i>	%
Muestra	70	100
Sexo		
Hombre	15	21,4%
Mujer	55	78,6%
Diagnóstico		
Pulpa normal	23	32,9%
Pulpitis reversible	24	34,3%
Pulpitis irreversible	23	32,9%

Tabla 2. Distribución de muestra según sexo y diagnóstico según los resultados de las pruebas de sensibilidad pulpar.

La edad mínima de los pacientes fue de 12 años y la máxima de 68 años. La edad media fue de 30,7 años (Tabla 3).

Edad	
Media	30,70
Desviación estándar	16,646
Mínimo	12
Máximo	68
P25	14,75
P50	26,50
P75	41,25

Tabla 3. Distribución de la muestra según edad.

Los porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control en los dientes fueron aumentando desde el estado basal de pulpa normal, siguiendo por pulpitis reversible y siendo más alto en pulpitis irreversible. Ver tabla 4.

	Diagnóstico	n	Mín - Máx	Promedio ± SD
% UP Media	Normal	23	48.08-172.88	103.97 ± 30.74
	Pulpitis reversible	24	69.2- 786.49	222.98 ± 159.92
	Pulpitis irreversible	23	80.78-786.49	238.06 ± 193.85
% UP Mediana	Normal	23	51.06-177.19	105.15 ± 32.16
	Pulpitis reversible	24	70.40-891.43	237.52 ± 203.68
	Pulpitis irreversible	23	74.56-891.43	267.96 ± 261.00

Tabla 4. Distribución de las UP según diagnóstico.

Al hacer el análisis estadístico entre los grupos, del porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control en los dientes con diagnóstico de pulpitis reversible fue mayor que las de pulpa normal, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un valor $p=0,0001$ (Tabla 5).

UP por Diagnóstico	Pulpa Normal versus pulpitis reversible	Pulpa Normal versus pulpitis reversible
	% UP Media Respecto Control	% UP Mediana Respecto Control
U de Mann-Whitney	82,000	84,000
Valor-p	0,000	0,0001

Tabla 5. UP de Pulpa normal vs pulpitis reversible.

El porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control en los dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible fue mayor que el de pulpa normal, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un valor $p=0,0001$ (Tabla 6).

%UP por Diagnóstico	Pulpa Normal versus pulpitis irreversible	Pulpa Normal versus pulpitis irreversible
	% UP Media Respecto Control	% UP Mediana Respecto Control
U de Mann-Whitney	101,000	105,000
Valor-p	0,0001	0,0001

Tabla 6. UP de Pulpa normal vs Pulpitis Irreversible.

El porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control en los dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible fue mayor que el de pulpitis reversible, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7).

%UP por Diagnóstico	Pulpitis Reversible versus pulpitis irreversible	Pulpitis Reversible versus pulpitis irreversible
	% Up Media Respecto Control	% Up Mediana Respecto Control
U de Mann-Whitney	258,000	257,000
Valor-p	0,702	0,686

Tabla 7. UP de Pulpitis Reversible vs Pulpitis Irreversible.

6.2 Determinación de la concentración total de proteínas

Del total de las muestras recolectadas ($n=33$), el 76% (25 dientes) correspondieron a pacientes del sexo femenino y 24% (8 dientes) a sexo masculino (Tabla 8). La mediana de edad fue de 24 años, siendo el mínimo de 12 años y el máximo a 65 años de edad. En relación al tipo de dientes el 9,09% (3 dientes) fueron caninos, 15.1% (5 dientes) fueron incisivos, 18.1% (6 dientes) fueron premolares y 57,5% (19 dientes) fueron molares (Tabla 9).

Sexo	Distribución según sexo	
	n	Porcentaje (%)
Femenino	25	76%
Masculino	8	24%
Total	33	100%

Tabla 8. Distribución de los pacientes según sexo.

Diente	Distribución según diente	
	n	Porcentaje (%)
Incisivo	5	15,1%
Canino	3	9,09%
Premolar	6	18,1%
Molar	19	57,5%
Total	33	100%

Tabla 9. Distribución de los pacientes según tipo de diente.

En relación a los diagnósticos de las muestras recolectadas el 30.3% (n=10) correspondieron a diagnósticos de pulpa normal, 24.2% (n=8) a pulpitis reversible y 45.4% (n=15) a pulpitis irreversible sintomática, tal como se puede observar en la tabla 10.

Diagnóstico del diente	Distribución según diagnóstico	
	n	Porcentaje (%)
Pulpa Normal	10	30,30%
Pulpitis Reversible	8	24,24%
Pulpitis Irreversible Sintomática	15	45,45%
Total	33	100%

Tabla 10. Distribución de los datos según diagnóstico sus frecuencias y porcentajes.

En relación a la concentración de proteínas, la mediana en los tres grupos estudiados fue de 8.57 $\mu\text{g/mL}$. El grupo de pulpa normal obtuvo una mediana de 9.57 $\mu\text{g/mL}$, pulpitis reversible 4.59 $\mu\text{g/mL}$ y el grupo de pulpitis irreversible 16.06 $\mu\text{g/mL}$. En la tabla 11 se resumen promedios, desviaciones estándar, medianas, mínimos y máximos de los tres grupos de estudio.

Diagnóstico del diente	Promedio	Desviación estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	Total
Pulpa normal	8.96	6.81	9.57	1.17	21.88	10
Pulpitis reversible	4.26	2.60	4.59	0.16	8.58	8
Pulpitis irreversible	19.609	16.75	16.06	0.44	53.72	15

Tabla 11. Resumen de promedios, medianas, mínimos y máximos de la concentración de proteínas según diagnóstico del diente. Valores medidos en $\mu\text{g/mL}$.

Se utilizó Shapiro-Wilk para determinar qué tipo de distribución tenían los datos, al no tener una distribución normal se utilizó medianas (P50) y rango intercuartílico (IQR) para análisis posteriores.

Para establecer la existencia de diferencias significativas entre los tres grupos de estudio se utilizó el test de Kruskal–Wallis, que determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre el diagnóstico pulpar y la concentración de proteínas, generándose esta diferencia entre el grupo de pulpitis reversible e irreversible con un valor $p=0.020$. La representación gráfica de estos resultados se puede observar en el gráfico 1.

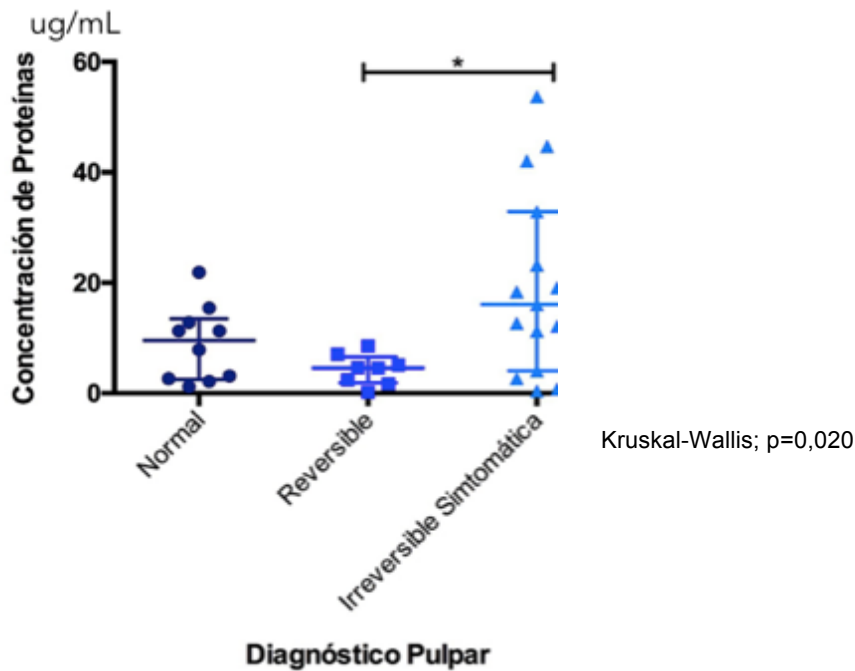


Gráfico 1. Gráfico Scatter dot que muestra distribución de los datos de los tres grupos de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible en relación a la concentración de proteínas expresadas en $\mu\text{g/mL}$.

6.3 Relación entre los diagnósticos clínicos versus histología

Análisis Cualitativo:

El diagnóstico clínico de pulpa normal coincidió con el diagnóstico histológico en 17 muestras (81%) y no existió coincidencia en 4 muestras (19%), de un total de 21 pulpas evaluadas (Anexo 26). Se muestran imágenes representativas de ambos grupos a continuación de los casos en que existió coincidencia. En los cortes de pulpa normal se observó un tejido conectivo laxo con un gran número de núcleos con morfología fusiforme bien conservados correspondiente a fibroblastos, en algunos casos se pudo observar en la periferia del tejido células con morfología cilíndrica formando una empalizada, características que corresponden al tipo celular de odontoblasto (Figura 25).

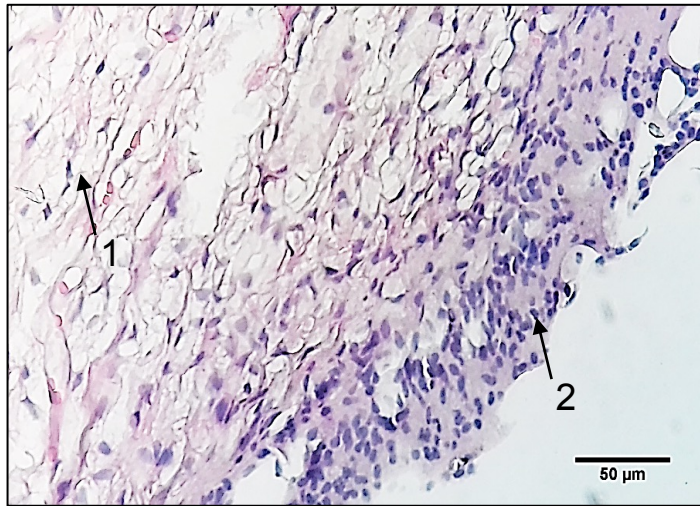


Figura 25, Corte de pulpa normal aumento 40X tinción de HE. Se observó presencia de núcleos de fibroblastos (flecha 1). También se identificaron núcleos de células cilíndricas correspondientes a odontoblastos (flecha 2).

No se observaron células inflamatorias como linfocitos ni polimorfos nucleares. Las fibras colágenas estaban organizadas en pequeños haces distribuidos homogéneamente por todo el tejido formando una fina red. También se observó que la pulpa normal estaba irrigada, encontrando lúmenes de vasos sanguíneos de pequeño diámetro (Figura 26).

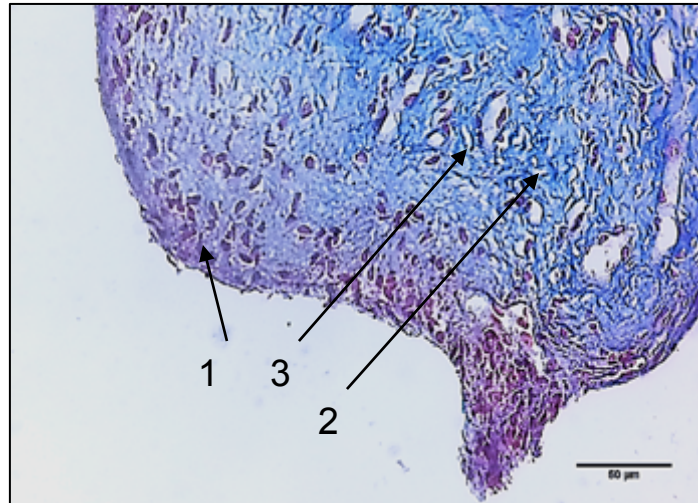


Figura 26. Corte de pulpa normal aumento 40X tinción T de Masson: Se observó tejido conectivo laxo con un gran número de núcleos de fibroblastos (flecha 1). Las fibras colágenas se encontraban en su mayoría en el centro del tejido en forma de pequeñas fibras onduladas (flecha 2). Además se observaron vasos sanguíneos de pequeño lumen (flecha 3).

Finalmente no se observaron signos de licuefacción (Figura 27).

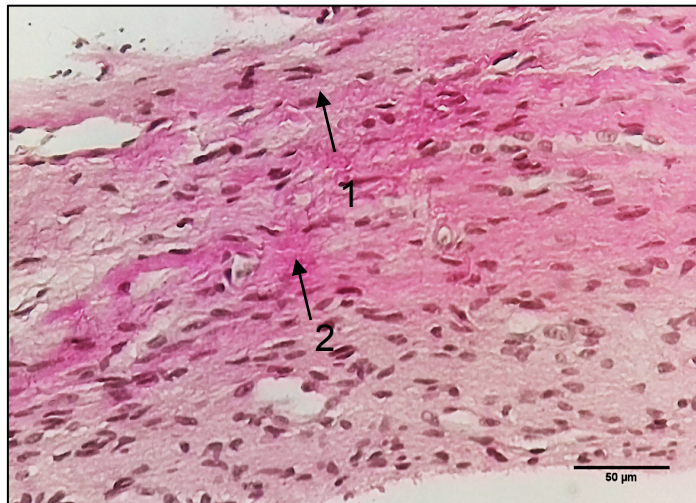


Figura 27. Corte de pulpa normal aumento 40X tinción de Van Gienson: Se observó tejido conectivo laxo con un alto número de núcleos fusiformes correspondientes a fibroblastos (flecha 1). Las fibras colágenas se concentraban en el centro de tejido (flecha 2), las cuales se observaban de forma ordenadas y organizadas en fibras delgadas. No se observan signos de licuefacción.

En el caso del diagnóstico clínico de pulpitis irreversible coincidió con el diagnóstico histológico en 17 muestras (85%) y no existió coincidencia en 3 muestras (15%) de un total de 20 pulpas evaluadas (Anexo 26). Se muestran los cortes de las pulpas que sí tuvieron coincidencia. En estas 3 pulpas inflamada se observó un tejido conectivo laxo más denso con un gran número de núcleos con morfología fusiforme, algunos bien conservados, correspondiente a fibroblastos. Las fibras colágenas estaban organizadas en grandes manojos en forma unidireccional (Figura 28).

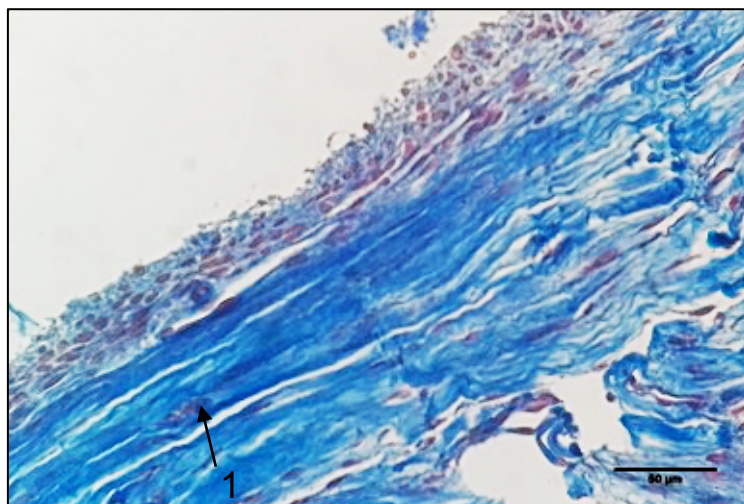


Figura 28. Corte de pupitis Irreversible aumento 40X, teñida T Masson: Se observaron grandes manojos de fibras colágenas (flecha 1).

Una característica frecuente fue encontrar signos de licuefacción, donde se destaca la pérdida de sustancia fundamental en todo el tejido o bien la degradación total de éste (Figuras 29-31). Otra característica importante fue la presencia de cariólisis en la mayor parte de los núcleos, en diferentes grados, ya sea viendo la cromatina levemente granulada o con la pérdida total del núcleo.

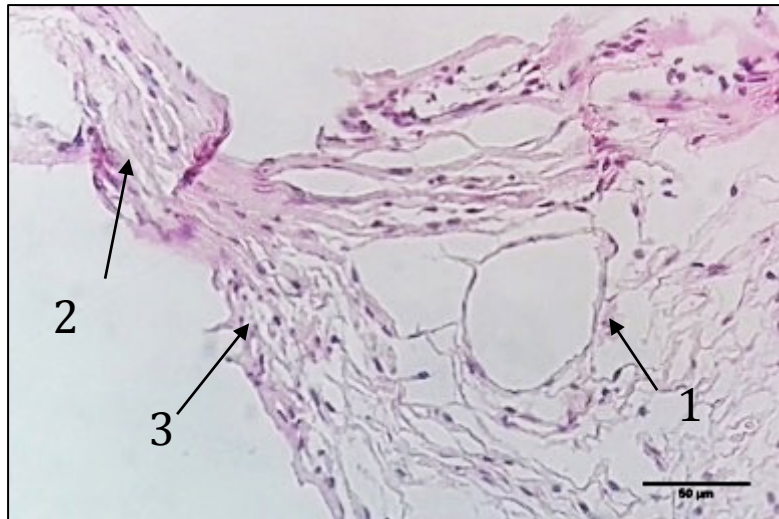


Figura 29. Corte de pupitis Irreversible aumento 40X, teñida con HE. Se observó el tejido pulpar con zonas de licuefacción donde existía pérdida de la matriz extracelular y signos de cariólisis (flecha 1) y otras zonas con tejido laxo conservado (flecha 2). Además se observaron núcleos con morfología circular muy pequeños compatibles con linfocitos (flecha 3).

También se observó que la pulpa inflamada estaba muy irrigada, reconociéndose vasos sanguíneos con lúmenes voluminoso (Figura 30).

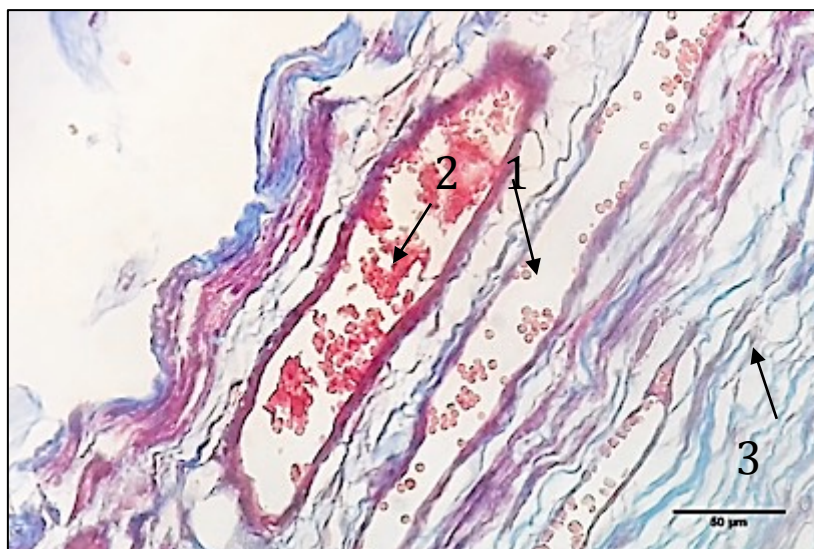


Figura 30. Corte de pupitis Irreversible aumento 40X, teñida con T Masson. Se observó un tejido pulpar muy vascularizado (flecha 1), estos vasos aún conservaban sus glóbulos rojos (flecha 2), además se evidencia la presencia de fibras colágenas abundantes (flecha 3).

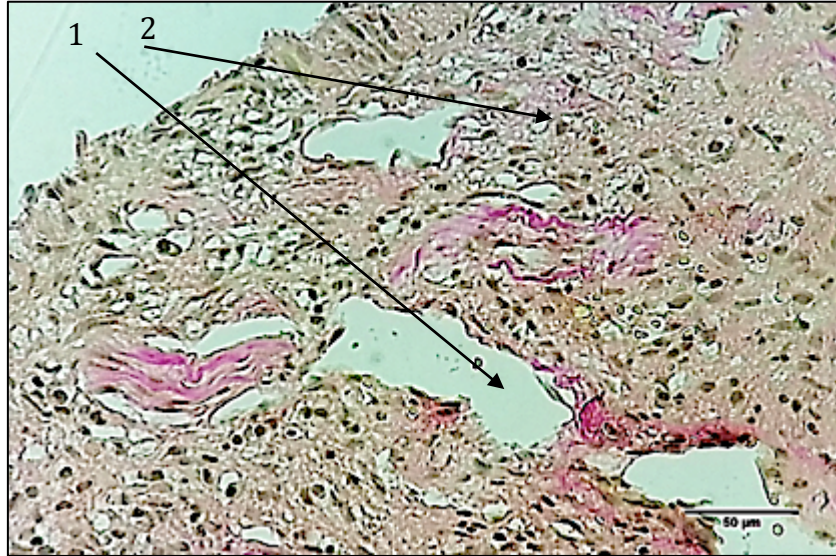


Figura 31. Corte de pupitis Irreversible aumento 40X, teñida con Van Gieson. Se observó un tejido conectivo con signos de licuefacción (flecha 1). También hubo presencia de núcleos de fibroblastos bien conservados (flecha 2).

Según estos resultados, desde el punto de vista cualitativo, existió una relación entre el diagnóstico clínico e histológico de pulpa normal y de pulpitis irreversible sintomática.

6.4 Determinación de los biomarcadores

En cuanto a la caracterización de la muestra se puede observar que del total de 64 pacientes un 76.56% (n=46) fueron mujeres y un 23.44% (n=15) fueron hombres. Si se analiza su distribución por grupo de diagnóstico, se puede observar que en el grupo de pulpa normal un 71.43% (n=15) son mujeres y un 28.57% (n=6) son hombres. Para el grupo de pulpitis reversible un 69.57% (n=16) fueron mujeres y un 30.43% (n=7) fueron hombres. Finalmente para el grupo de pulpitis irreversible sintomática un 90% (n=18) fueron mujeres y un 10% (n=2) fueron hombres. Ver tabla 12.

Sexo	Pulpa normal n/%	Pulpitis reversible n/%	Pulpitis irreversible sintomática n/%	Total n/%
Mujer	15	16	18	46
%	71.43%	69.57%	90%	76.56%
Hombre	6	7	2	15
%	28.57%	30.43%	10%	23.44%
Total	21	23	20	64
%	100%	100%	100%	100%

Tabla 12. Distribución de la muestra según sexo y diagnóstico.

En cuanto a la distribución de la muestra según tipo de diente podemos observar que de los 64 dientes evaluados 11 fueron incisivos que corresponde al 17.19%, 4 caninos (6.25%), 40 premolares (62.5%) y 9 fueron molares (14.06%). Ver tabla 13. Al evaluar estos datos asociados a los diagnósticos, podemos observar que en el grupo de pulpa normal se evaluaron 21 premolares (100%), en el grupo de pulpitis reversible fueron 7 incisivos (39.43%), 9 premolares (39.13%) y 7 molares (30.43%). Por último, al analizar el grupo de pulpitis irreversible sintomática se observa que 4 fueron incisivos (20%), 4 caninos (20%), 10 premolares (50%) y 2 fueron molares (10%). Ver tabla 13.

Diente	Pulpa normal n/%	Pulpitis reversible n/%	Pulpitis irreversible sintomática n/%	Total n/%
Incisivo	0	7	4	11
%	0%	30.43%	20%	17.19%
Canino	0	0	4	4
%	0%	0%	20%	6.25%
Premolar	21	9	10	40
%	100%	39.13%	50%	62.5%
Molar	0	7	2	9
%	0%	30.43%	10%	14.06%
Total	21	23	20	64
%	100%	100%	100%	100%

Tabla 13. Caracterización de la muestra según tipo de diente evaluado y diagnóstico.

Los resultados en cuanto a la concentración de cada biomarcador, fueron expresados en pg/mL. Los rangos de las curvas estándares son específicos para cada biomarcador y son los indicados por el fabricante, tanto en su valor de detección mínimo como máximo. En el análisis de los resultados se consideró el Límite de detección (LOD Limit of Detection por su sigla en inglés) descrito por el fabricante y el límite de cuantificación (LOQ Limit of Quantification por su sigla en inglés) al valor correspondiente al primer punto de la curva estándar experimental. Ver tabla 14.

Nombre del biomarcador/LOD-LOQ	LOD	LOQ
	pg/mL	pg/mL
IL1b	0,18	0,34
TNF α	0,54	0,72
IL8	0,08	0,72
IL6	0,31	0,98
IL4	2,54	6,91
PDGF-BB	0,2	13,42
IL12p40	35,2	375
TIMP-1	3,42	53,09
CXCL10	1,18	2,85
IL1a	0,9	5,09
VEGF A	2,1	8,37
FGF Acid	4,88	8,81
MMP3	5,3	77,27
MMP9	13,6	131

Tabla 14. Se observa el LOD y LOQ de cada biomarcador expresados en pg/mL entregado por el fabricante según cada kit.

LOQ: Limit of quantification. Límite de cuantificación.

LOD: Limit of detection. Límite de detección.

Los resultados de este estudio exploratorio reflejan que fue posible detectar un perfil diferencial de biomarcadores inflamatorios, obtenidos de fluido dentinario con membrana de Durapore® en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis irreversible sintomática y pulpitis reversible por medio de análisis de tecnología Lúminex. Fueron detectados 10 de 14 biomarcadores sobre el LOD y LOQ y no fueron detectados 4 de 14 biomarcadores, que estuvieron bajo el LOD y LOQ, en muestras de fluido dentinario. Los biomarcadores que fueron detectados sobre LOQ y LOD para los 3 diagnósticos fueron los siguientes; IL 1b, TNF α , IL4, L1a, VEGF- α , FGF Acid. Ver Tabla 15.

Número de biomarcador	Nombre de biomarcador/ diagnóstico	Mínimo	Máximo	Promedio	Mediana
		pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
1	IL1b				
	NF	0,33	10,3	0,815	0,34
	IF	0,34	79,75	8,25	1,2
	RF	0,06	57,763	4,169	0,34
2	TNF α				
	NF	0,66	1,21	0,924	0,93
	IF	0,73	2,56	1,154	1,07
	RF	0,79	1,63	1,01	0,93
3	IL4				
	NF	14,27	20,38	17,094	17,11
	IF	14,11	23,03	17,697	17,3
	RF	15,53	18,97	16,604	16,72
4	IL1a				
	NF	8,7	22,3	12	11,2
	IF	11,15	152	23,85	15,2
	RF	1,26	198	21,85	13,6
5	VEGF α				
	NF	12,06	22,91	14,64	14,09
	IF	10,07	28,14	16,6	17,18
	RF	2,52	20,8	13,2	14,09
6	FGF Acid				
	NF	7,65	14,97	10,57	10,9
	IF	9,41	39,11	15,02	12,7
	RF	2,44	14,33	9,73	10,6

Tabla 15. Resultados de cada biomarcador obtenidos de las muestras analizadas sobre LOD y LOQ para los tres diagnósticos. Se considera el valor mínimo, máximo promedio y mediana, para cada diagnóstico.

NF: Muestras de fluido grupo pulpa normal

IF: Muestras de fluido grupo pulpitis irreversible sintomática

RF: Muestras de fluido grupo pulpitis reversible

Los biomarcadores que fueron detectados sobre LOQ y LOD para los diagnósticos de pulpitis reversible y pulpitis irreversible y sin embargo, no fueron detectados en pulpa normal, fueron los siguientes; IL8, TIMP-1 y MMP9. Ver tabla 16.

Número de biomarcador	Nombre de biomarcador/ diagnóstico	Mínimo	Máximo	Promedio	Mediana
		pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
1	IL8				
	NF	0,06	2,12	0,37	0,15
	IF	0,05	92,91	8,706	1,125
	RF	0,1	42	3,159	0,36
2	TIMP-1				
	NF	1,07	32,91	9,31	6,07
	IF	0,76	834	137	37,8
	RF	0,27	311	59,8	19,6
3	MMP9				
	NF	18,42	668	121	50,5
	IF	32,08	> 31790	>31790	12,71
	RF	12,05	> 31790	8873	283

Tabla 16. Resultados de los biomarcadores IL8, TIMP-1 y MMP9 obtenidos de las muestras analizadas, que se expresaron en pulpitis reversible e irreversible sobre LOD y LOQ. Se considera el valor mínimo, máximo promedio y mediana, para cada diagnóstico.

NF: Muestras de fluido grupo pulpa normal, bajo el límite de detección

IF: Muestras de fluido grupo pulpitis irreversible sintomática

RF: Muestras de fluido grupo pulpitis reversible

El biomarcador que fue detectado sobre límite de cuantificación (LOQ) y sobre el límite de detección (LOD) para el diagnóstico de pulpitis irreversible, sin embargo, no fue detectado en pulpa normal y pulpitis reversible, fue la IL6. Ver tabla 17.

Número de biomarcador	Nombre de biomarcador/ diagnóstico	Mínimo	Máximo	Promedio	Mediana
		pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
1	IL6				
	NF	0,22	0,76	0,576	0,62
	IF	0,76	42,96	3,036	0,69
	RF	0,5	2,26	0,737	0,62

Tabla 17. Resultados de IL-6 siendo detectado sólo en pulpitis irreversible en las muestras analizadas. Se considera el valor mínimo, máximo promedio y mediana, para cada diagnóstico.

NF: Muestras de fluido grupo pulpa normal, bajo el límite de detección

IF: Muestras de fluido grupo pulpitis irreversible sintomática

RF: Muestras de fluido grupo pulpitis reversible, bajo el límite de detección

Los biomarcadores que no se detectaron en ningún diagnóstico fueron 4; PDGF-BB, IL12p40, CXCL10 y MMMP3, que estuvieron bajo el límite de cuantificación. Ver tabla 18.

Número de biomarcador	Nombre de biomarcador/ diagnóstico	Mínimo	Máximo	Promedio	Mediana
		pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
1	PDGF-BB				
	NF	< 0,2	< 0,2	ND	ND
	IF	<0,2	< 0,2	ND	ND
	RF	< 0,2	< 0,2	ND	ND
2	IL12p40				
	NF	98,7	135	114	111
	IF	98,7	148	124	123
	RF	64,2	141	104	105
3	CXCL10				
	NF	0,58	1,2	0,77	0,71
	IF	0,35	2,7	1,06	0,96
	RF	0,11	2,03	0,86	0,71
4	MMP3				
	NF	0,05	0,65	0,35	0,26
	IF	0,26	94,81	11,7	0,715
	RF	0	52,2	4,16	0,43

Tabla 18. Biomarcadores bajo el LOQ.

LOQ: *Limit of quantification*. Limite de cuantificación

NF: Muestras de fluido grupo pulpa normal

IF: Muestras de fluido grupo pulpitis irreversible sintomática

RF: Muestras de fluido grupo pulpitis reversible

Al analizar cada biomarcador según el diagnóstico y evaluar si había diferencias estadísticamente significativas se observa que al evaluar a FGF-acid, se puede detecta que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpa normal (G1) y pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.001 y entre los grupos de pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.0002. Esto no ocurre entre los grupos de pulpa normal (G1) y pulpitis reversible (G2) con un p -value de 0.35. Ver gráfico 2.

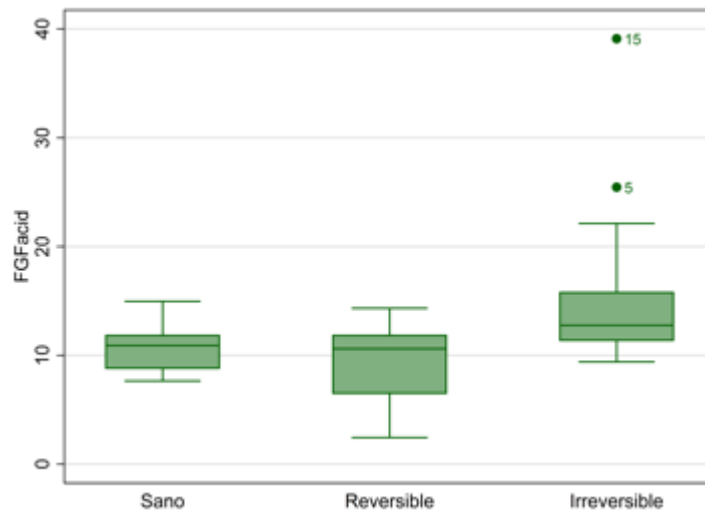


Gráfico 2. Concentración de FGF -acid en grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

Para la IL-1 α se pudo observar un comportamiento similar a FGF -acid presentando diferencias estadísticamente significativas entre pulpa normal (G1) y pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.0004. En el caso de pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3), también hubo diferencias estadísticamente significativas con un p -value de 0.004. Finalmente, entre pulpa normal (G1) y pulpitis reversible (G2) no hubo diferencias estadísticamente significativas con un p -value de 0.21. Ver gráfico 3.

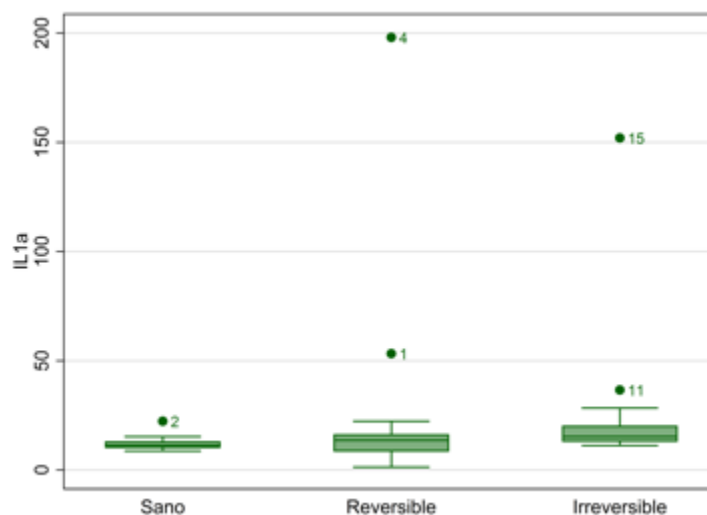


Gráfico 3. Concentración de IL-1 α en grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

En el caso de VEGF- α se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los grupos de pulpa sana (G1) al compararlo con pulpitis reversible (G2), obteniendo un p -value de 0.38. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de pulpa normal (G1) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) observando un p -value de 0.016. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo de pulpitis reversible (G2) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.006. Ver gráfico 4.

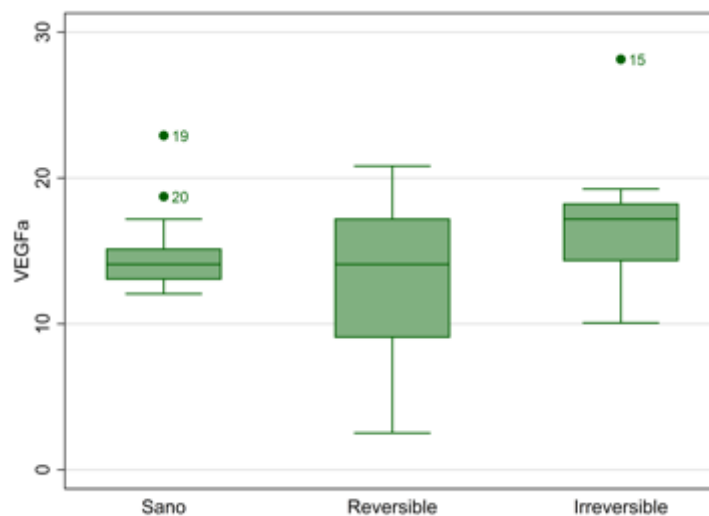


Gráfico 4. Concentración de VEGF- α de grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

Ocurre lo contrario a lo que sucede con VEGF- α cuando se analiza IL-8, en donde sí hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y pulpitis reversible (G2) observando un p -value de 0.002 y además entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) obteniendo un p -value de 0.00001. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el grupo de pulpitis reversible (G2) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) observando un p -value de 0.060. Ver gráfico 5.

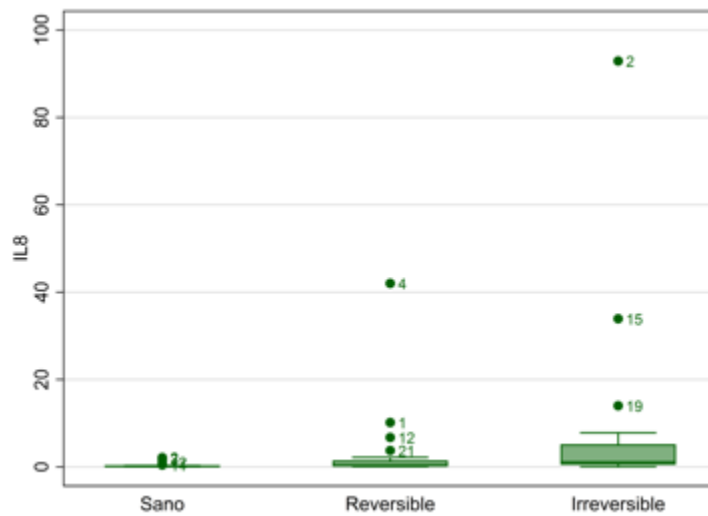


Gráfico 5. Concentración de IL -8 de grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

En el caso de MMP-9 sí hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis reversible (G2) con un p -value de 0.002 y también entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3), observando un p -value de 0.000004. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpitis reversible (G2) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) midiendo un p -value de 0.03. Ver gráfico 6.

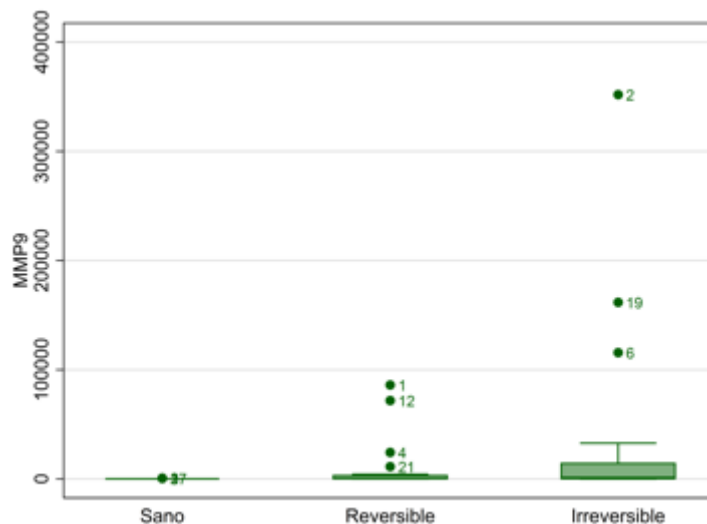


Gráfico 6. Concentración de MMP-9 de grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

Al analizar TNF $-\alpha$, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis reversible (G2)

obteniendo un p -value de 0.09, así como tampoco entre el grupo de pulpitis reversible (G2) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.036. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.001. Ver gráfico 7.

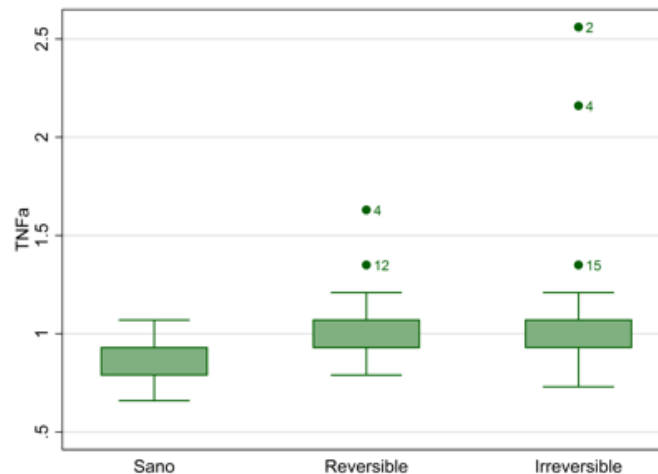


Gráfico 7. Concentración de TNF α de grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

Un patrón similar a lo que se observa con TNF- α ocurre al analizar IL -1 β , en el que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis reversible (G2) obteniendo un p -value de 0.016 como tampoco cuando se compara el grupo de pulpitis reversible (G2) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) observando un p -value de 0.07. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) con un p -value de 0.0002. Ver gráfico 8.

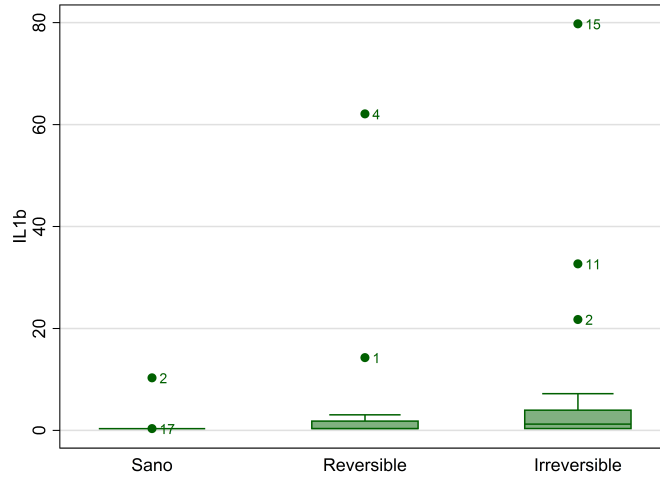


Gráfico 8. Concentración de IL -1 β de grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

Al observar lo que ocurre con TIMP-1 se puede ver que tiene el mismo comportamiento que TNF- α , no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) al compararlo con el grupo de pulpitis reversible (G2), observando un p -value de 0.016. Tampoco cuando se compara el grupo de pulpitis reversible (G2) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) obteniendo un p -value de 0.20. Sin embargo, sí se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de pulpa normal (G1) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3) midiendo un p -value de 0.002. Ver gráfico 9.

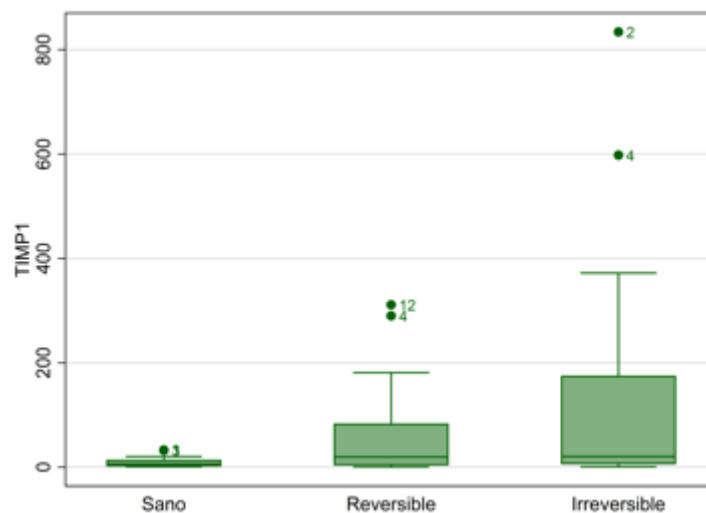


Gráfico 9. Concentración de TIMP -1 grupos experimentales: pulpa normal (G1), pulpitis reversible (G2) y pulpitis irreversible sintomática (G3).

A continuación, se muestra un resumen con los todos los analitos y su asociación con cada grupo y *p*-value respectivo. Ver tabla 19.

Molécula	G1 -G2 <i>p</i> -value	G1-G3 <i>p</i> -value	G2-G3 <i>p</i> -value
FGF-acid	0.35	0.001	0.0002
Significancia	NS	S	S
IL -1 α	0.21	0.0004	0.004
Significancia	NS	S	S
VEGF - α	0.38	0.016	0.0067
Significancia	NS	NS	S
IL -8	0.002	0.00001	0.060
Significancia	S	S	NS
MMP -9	0.0028	0.000004	0.03
Significancia	S	S	NS
TNF - α	0.09	0.001	0.036
Significancia	NS	S	NS
IL -1 β	0.016	0.0002	0.073
Significancia	NS	S	NS
TIMP -1	0.016	0.002	0.20
Significancia	NS	S	NS

Tabla 19. *p*-value por cada analito según grupo experimental .

G1: Grupo 1, pulpa normal

G2: Grupo 2, pulpitis reversible

G3: grupo 3, pulpitis irreversible sintomática

S: *Significance*. Estadísticamente significativo, *p* -value < 0.01

NS: *No significance*. No estadísticamente significativo, *p* -value > 0.01

Al analizar los biomarcadores que sí fueron detectados y establecer discriminación entre el diagnóstico de pulpitis reversible versus irreversible, podemos determinar que el mejor comportamiento lo tuvieron la asociación de dos biomarcadores (IL-1 α + FGF acid), con un AUC de 0.83. Un biomarcador tuvo un buen comportamiento (FGF acid) con un AUC 0.8. Cinco biomarcadores tuvieron un regular comportamiento con un AUC mayor o igual a 0.7 (IL-1 α , VEGF- α , FGF acid, IL-8, MMP-9, TNF- α). Tres biomarcadores tuvieron un mal comportamiento con un AUC de 0.60 (IL -1 β , IL-4 y TIMP-1) Ver tabla 20.

Molécula/analito/ biomarcador	Curva ROC (AUC)	Clasificación según comportamiento/discriminación entre pulpitis reversible e irreversible sintomática
IL -1 α + FGF acid	0.8	Buen comportamiento/excelente discriminación
FGF acid	0.8	Buen comportamiento/excelente discriminación
IL -1 α	0.7	Regular comportamiento/ aceptable discriminación
VEGF - α	0.7	Regular comportamiento/ aceptable discriminación
IL -8	0.7	Regular comportamiento/ aceptable discriminación
MMP -9	0.7	Regular comportamiento/ aceptable discriminación
TNF - α	0.7	Regular comportamiento/ aceptable discriminación
IL -1 β	0.6	Mal comportamiento/ no discriminación
IL -4	0.6	Mal comportamiento/ no discriminación
TIMP -1	0.6	Mal comportamiento/ no discriminación

Tabla 20. Muestra el detalle del comportamiento según Curva ROC (AUC).

A continuación, se muestran gráficamente las curvas ROC para cada Biomarcador.

FGF -acid:

En el gráfico 10 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.78 (se realizó aproximación a 0.8), lo cual es considerado buen comportamiento, es decir excelente discriminación, según los parámetros seleccionados para este estudio.

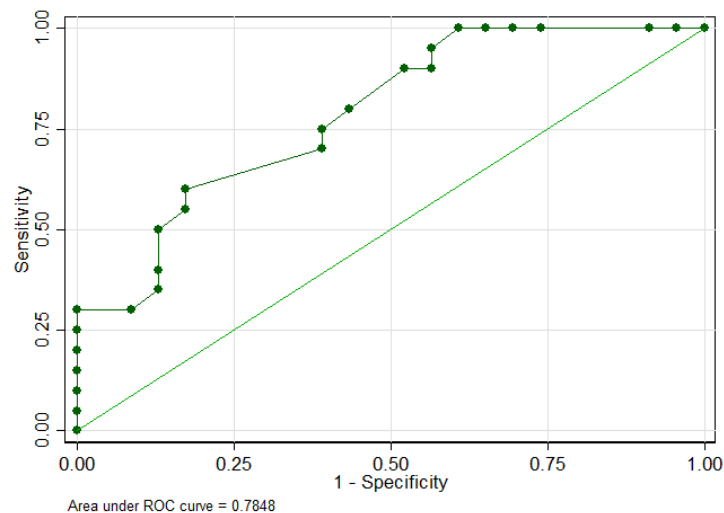


Gráfico 10. Curva ROC para FGF -acid.

IL -1 α :

En el gráfico 11 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.69 (se realizó aproximación a 0.7), lo cual es considerado regular comportamiento, es decir aceptable discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

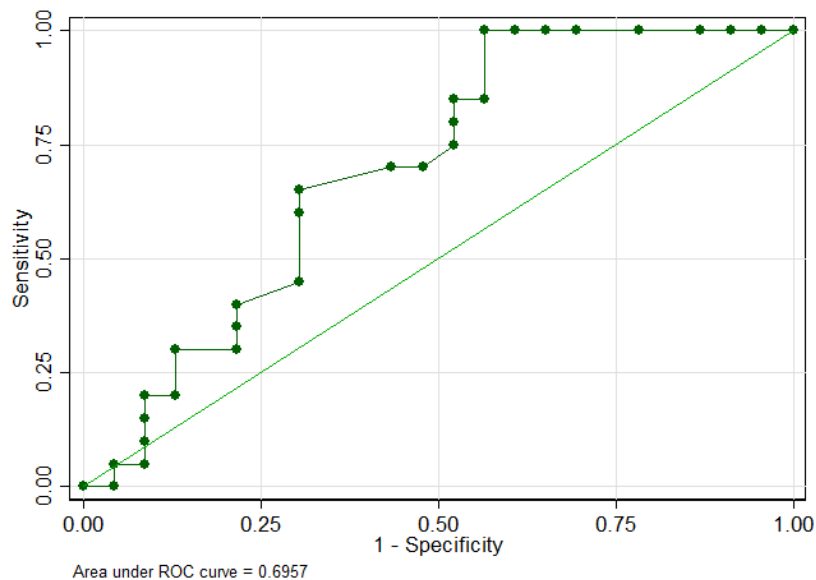


Gráfico 11. Curva ROC para IL -1 α .

VEGF- α :

En el gráfico 12 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.69 (se realizó aproximación a 0.7), lo cual es considerado regular comportamiento, es decir aceptable discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

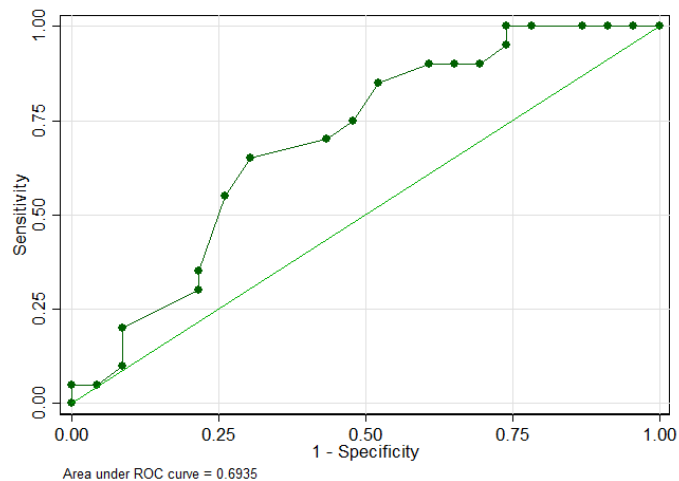


Gráfico 12. Curva ROC para VEGF - α .

IL -8:

En el gráfico 13 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.67 (se realizó aproximación a 0.7), lo cual es considerado regular comportamiento, es decir aceptable discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

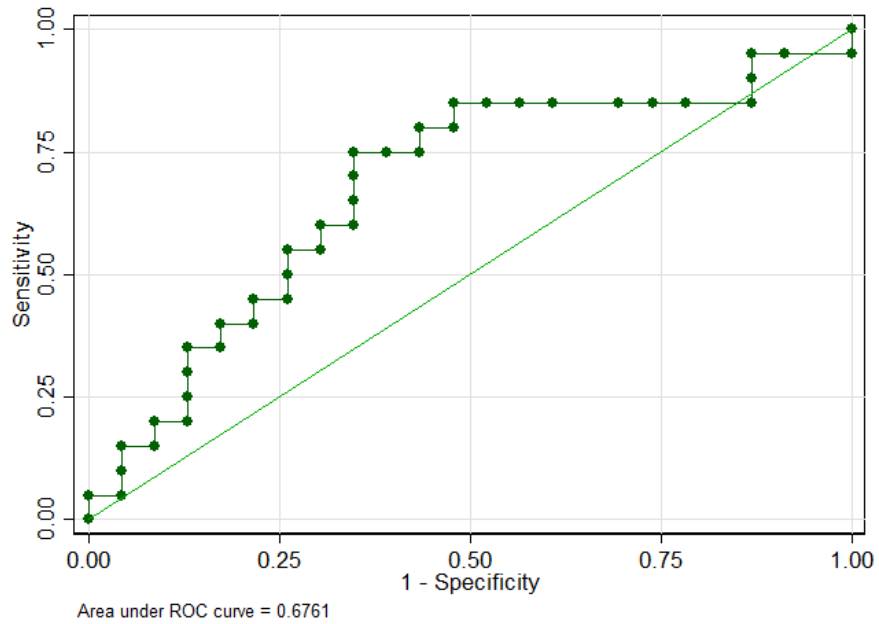


Gráfico 13. Curva ROC para IL-8.

MMP-9:

En el gráfico 14 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.67 (se realizó aproximación a 0.7), lo cual es considerado regular comportamiento, es decir aceptable discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

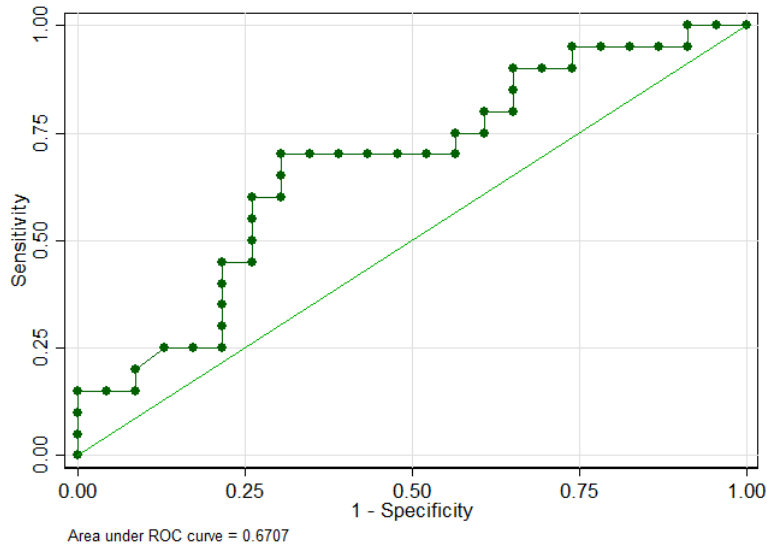


Gráfico 14. Curva ROC para MMP -9.

TNF- α :

En el gráfico 15 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.669 (se realizó aproximación a 0.7), lo cual es considerado regular comportamiento, es decir aceptable discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

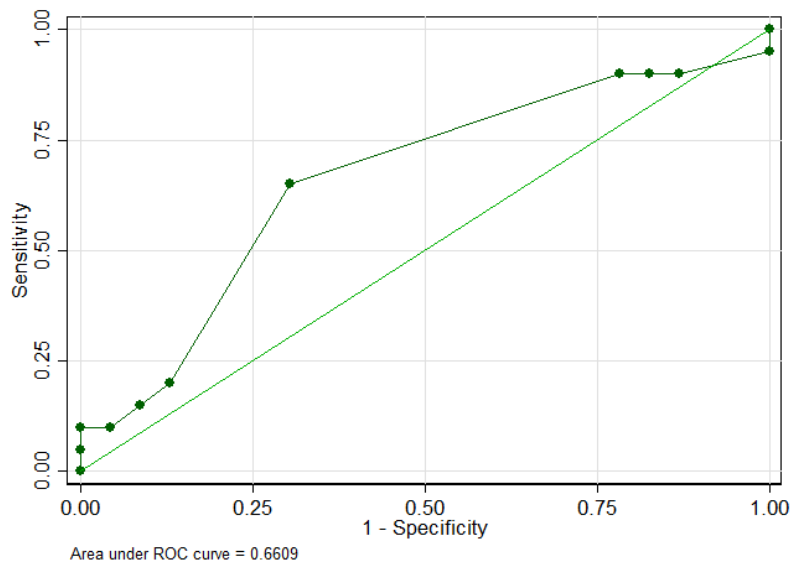


Gráfico 15. Curva ROC para TNF - α .

IL- 1 β :

En el gráfico 16 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.63 (se realizó aproximación a 0.6), lo cual es

considerado mal comportamiento, es decir no discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

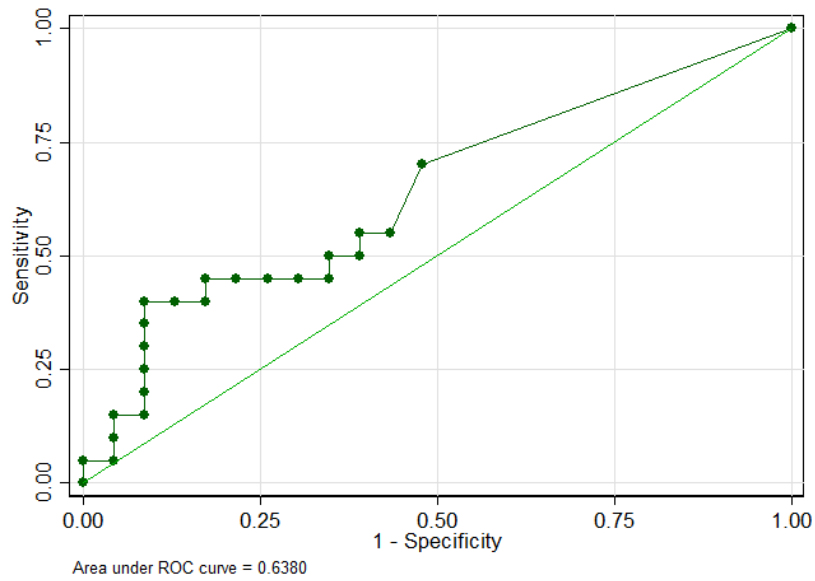


Gráfico 16. Curva ROC para IL- 1β.

TIMP -1:

En el gráfico 17 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.57 (se realizó aproximación a 0.6), lo cual es considerado mal comportamiento, es decir no discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

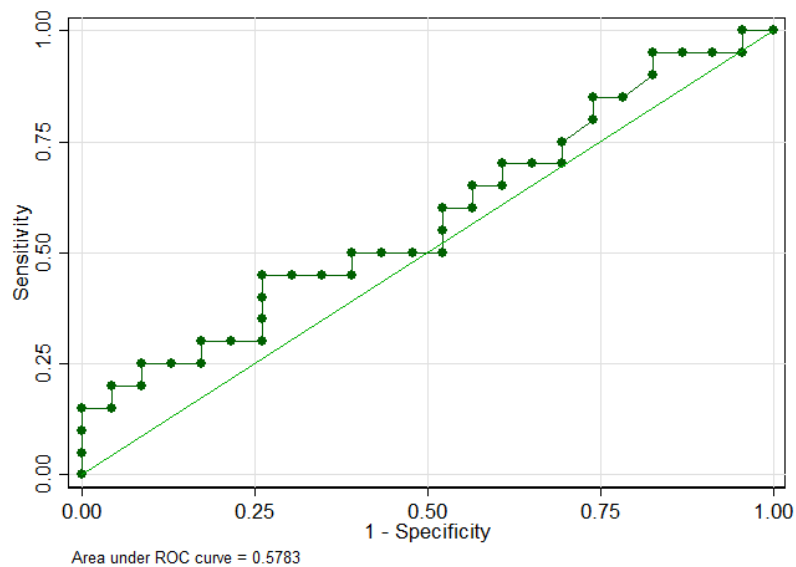


Gráfico 17. Curva ROC para TIMP-1.

IL-4:

En el gráfico 18 se observa la ROC y el área bajo ella (AUC). En este caso se observa un valor de curva ROC de 0.59 (se realizó aproximación a 0.60), lo cual es considerado mal comportamiento, es decir no discriminación según los parámetros seleccionados para este estudio.

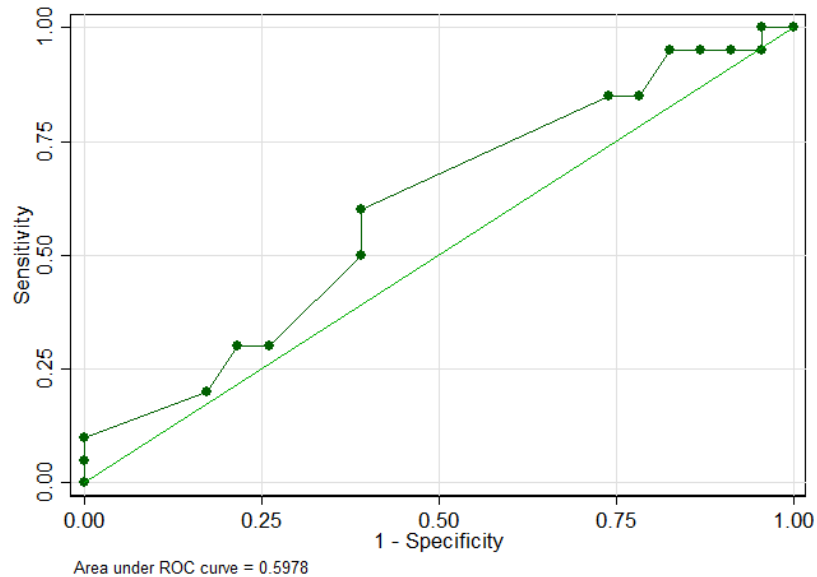


Gráfico 18. Curva ROC para IL -4

FGF Acid + IL -1 α :

En el gráfico 19 de curva ROC se puede apreciar la combinación de dos biomarcadores; IL-1 α en conjunto con FGF-acid, lo que da un valor de curva ROC de 0.83 (aproximado a 0.8), el cual es mejor que cada analito por separado. Esto es considerado buen comportamiento, es decir excelente discriminación. Esto podría permitir recomendar un pool de biomarcadores como propuesta para un posible kit diagnóstico.

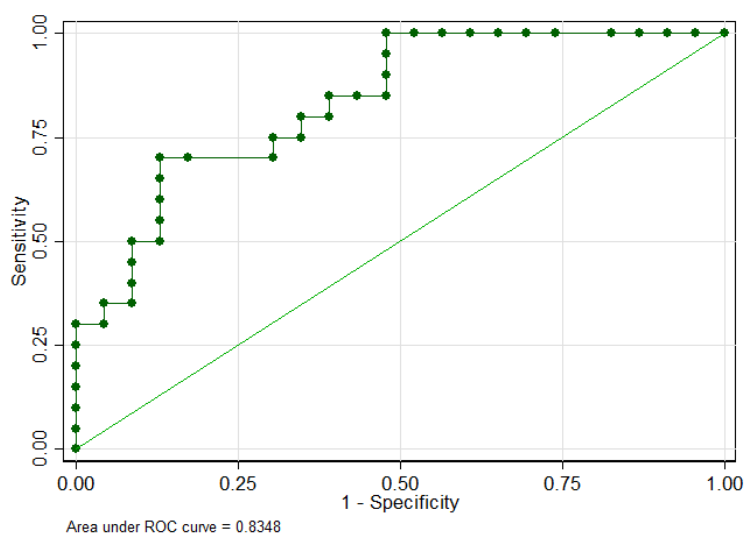


Gráfico 19. Curva ROC para FGF Acid + IL -1 α :

Discusión



7 DISCUSIÓN

El diagnóstico actual de la patología pulpar en odontología es muy tardío y las herramientas utilizadas son principalmente clínicas, imprecisas y subjetivas, es decir, sólo miden la respuesta nerviosa pulpar y no el flujo sanguíneo de la pulpa, que es lo que realmente define la vitalidad (3,5). Entendiendo esta problemática es que Zanini el año 2017 realizó una revisión sistemática que tuvo como objetivo ejecutar una exhaustiva búsqueda de la literatura sobre la expresión inflamatoria de mediadores, en el contexto del diagnóstico clínico pulpar (95). Como conclusiones este autor reportó que la pulpitis irreversible está relacionada con niveles específicos de expresión de mediadores inflamatorios. La diferencia en la expresión entre pulpitis reversible e irreversible fue tanto cuantitativa como cualitativa. Finalmente, este artículo recomienda que la cuantificación *in situ* de los mediadores inflamatorios puede ayudar en la distinción clínica entre la pulpitis reversible e irreversible. De esta forma el desarrollo de un método diagnóstico innovador y objetivo más sensible y específico, podría ayudar al odontólogo frente a la disyuntiva del diagnóstico pulpar. El desarrollo de las pruebas de diagnóstico en el último tiempo, ha sido muy dinámico y rápido. Por ejemplo, en la actualidad se han realizado diversos estudios que han comprobado la gran utilidad de la flujometría láser doppler, como una herramienta diagnóstica para evaluar la vitalidad pulpar, demostrando ser muy precisa para discriminar entre un diente vital de uno no vital . Sin embargo, no existen estudios que hayan investigado si el láser doppler puede ser útil para discriminar entre los distintos diagnósticos de pulpas vitales, como son los casos de las pulpas normales, pulpitis reversibles y pulpitis irreversibles. Es importante tener claro que existe una gran variación en las unidades de perfusión entre los distintos dientes de un mismo paciente, como también entre distintos pacientes cuando es evaluado un mismo tipo de diente (73). Esto hace que sea difícil poder realizar comparaciones de flujo sanguíneo pulpar, sobretodo cuando se intenta saber si el láser doppler puede ser utilizado como una herramienta diagnóstica útil para discriminar entre distintos diagnósticos pulpares. Es por esta razón, que en la presente investigación no se utilizaron los resultados de las unidades de perfusión de manera aislada, ya que este dato bruto no entrega información muy precisa. Por ejemplo, en un paciente con un diente con diagnóstico de pulpa normal puede entregar un flujo sanguíneo de 50 unidades de perfusión y en otro paciente esas mismas 50 unidades de

perfusión pueden ser medidas, en un diente con un estado inflamatorio pulpar muy avanzado. Debido a esto, es que en este estudio se utilizó el porcentaje de unidades de perfusión con respecto a su diente control. De esta forma, se puede evaluar de una manera más real las fluctuaciones de perfusión sanguínea existentes entre dos dientes de un mismo paciente y entre distintos pacientes. En el presente estudio, los dientes con diagnóstico de pulpa normal presentaron menores porcentajes de unidades de perfusión con respecto al control, que cuando se compararon con los dientes con diagnóstico de pulpitis reversible. Lo mismo se observó al comparar los dientes con diagnóstico de pulpa normal y pulpitis irreversible, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Esto se puede explicar, debido a que en estados inflamatorios la pulpa dentaria experimenta una vasodilatación y un aumento del flujo sanguíneo pulpar (135). Sin embargo, al comparar el porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control en los dientes con pulpitis reversible e irreversible, se pudo apreciar que en los casos de pulpitis irreversible existía un mayor porcentaje de unidades de perfusión con respecto al control, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto se podría explicar debido a que los equipos de láser doppler presentan una relación lineal entre la salida de la señal al equipo y la velocidad del flujo sanguíneo, para todas las fracciones de volumen inferiores al 1% (concentración de un soluto en un disolvente). En los casos de pulpitis irreversible, aumenta la vascularización de la pulpa y la concentración de glóbulos rojos está por encima del 1%. Este aumento en el flujo sanguíneo pulpar puede dar como resultado una disminución en la señal, no representando fielmente el real aumento del flujo sanguíneo, con el correspondiente aumento de la señal (136). Otra explicación para este fenómeno, es la transición que existe en los dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible a necrosis pulpar. En el estudio de Ricucci y cols (167), se reportó que las muestras histológicas de pulpitis irreversible, en la zona coronal, próxima a las lesiones de caries, existían focos de infección por licuefacción que avanzaban hacia el tejido pulpar, además estas áreas estaban fuertemente colonizadas por bacterias y rodeadas por grandes concentraciones de neutrófilos. Sin embargo, esto nunca se observó en pulpas normales o con pulpitis reversible. Estas zonas de necrosis y su consecuente falta de irrigación sanguínea, podría explicar la disminución de la señal de flujo pulpar en los dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible. De esta forma según los

resultados de este estudio, el láser doppler no logró discriminar entre los diagnósticos clínicos de pulpitis reversible e irreversible sintomática y es precisamente entre estos diagnósticos donde los dentistas encuentran mayor dificultad. Es por este motivo, que el complemento con el diagnóstico molecular pudiera dar una respuesta a esta disyuntiva, siendo un eslabón más que complementaría la cadena del diagnóstico.

En este estudio se utilizó la categorización clínica propuesta por la AAE. Desafortunadamente, esta clasificación tiene limitaciones ya que algunos autores reportan que las observaciones histológicas no muestran ninguna correlación entre el diagnóstico clínico y el estado pulpar in situ (42,43). Estos resultados reportados los años por Seltzer el año 1963 (43) y Dummer el año 1980 (42) no coinciden con el estudio realizado por Ricucci y cols el año 2017 en donde comparan el diagnóstico clínico pulpar propuesto por la AAE y el diagnóstico histológico de los dientes, concluyen que en los diagnósticos de pulpa normal y pulpitis reversible existía una correspondencia con la histología en el 96,6% de los casos, además, en los casos de pulpitis irreversible esta concordancia ocurría en el 84.4% de los casos (80). De esta forma se puede concluir que la clasificación del diagnóstico clínico propuesto por la AAE, sí tiene una correlación con el estado histológico de la pulpa, permitiendo de esta forma validar esta clasificación. Esto es relevante ya que en la práctica endodóntica cotidiana, no es factible realizar el análisis histológico pulpar, como un método para confirmar el diagnóstico clínico realizado mediante las pruebas de sensibilidad. En este estudio, al igual que en el de Ricucci, se observó una relación entre los diagnósticos clínicos e histológicos de pulpa normal y también en los de pulpitis irreversible. Esto permite al menos para estos dos diagnósticos, validar el estado pulpar para efectos de este estudio.

Tal como fue aclarado anteriormente en el marco teórico, distintos tipos de proteínas pueden estar presentes en la pulpa dentaria humana, como respuesta inflamatoria e inmune frente a la invasión bacteriana. Estas proteínas podrían utilizarse como biomarcadores para realizar un diagnóstico endodóntico a nivel molecular (91).

Nuevas pruebas se han elaborado con mejores tecnologías, para optimizar los resultados de las ya existentes. Los resultados de los estudios de pruebas diagnósticas incompletos y mal diseñados podrían generar una prematura difusión

de éstos y llevar a los clínicos a tomar decisiones de tratamiento incorrectas (137). Un prolijo y riguroso proceso de evaluación y validación de las pruebas de diagnóstico es imprescindible, antes de considerar introducir éstas en la práctica clínica en humanos (137). La selección de marcadores apropiados es vital para ser utilizada en la predicción de una enfermedad, además de requerir de su validación. Uno de los requisitos que debe cumplir, es el desarrollo y estandarización de protocolos que consideren la adquisición, almacenamiento y procesamiento de la muestra (138). De esta manera, como una forma de desarrollar y estandarizar un protocolo que considere los aspectos antes señalados, uno de los objetivos de este estudio fue determinar la concentración de proteínas totales presentes en el fluido dentinario en pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática, utilizando Durapore como material de recolección y ensayo de micro BCA para su determinación.

Los resultados de este estudio muestran que la membrana Durapore y el método de adquisición, almacenamiento y tiempo de manejo de la muestra son adecuados, para medir la concentración de proteínas total del fluido dentinario a través test de Micro BCA. Siendo este estudio el primero en reportar que es posible medir la concentración de proteínas totales presentes en el fluido dentinario, utilizando el test de micro BCA, como un método válido y reproducible. En este trabajo de investigación queda demostrado que existen diferencias significativas entre la concentración de proteínas y el diagnóstico clínico pulpar ($p=0.02$). Esto permite relacionar la concentración de proteínas del fluido dentinario con el diagnóstico pulpar y por ende podría dar luces del proceso inflamatorio que está ocurriendo a ese nivel.

Los posibles mecanismos que explican la expresión de proteínas en el fluido dentinario, se describen en el estudio de Goldberg, que relata el proceso inflamatorio e inmune que ocurre en la pulpa frente a una noxa (139). En condiciones normales, existe un pequeño número de células inmunes presentes en la pulpa, por el contrario, cuando esta pulpa es afectada por la invasión bacteriana, comienzan cambios vasculares, además de un aumento de estas células, las cuales liberan y expresan distintos mediadores inflamatorios y proteínas (91,140,141). Debido a lo anterior es que nace la búsqueda por parte de diversos autores para encontrar biomarcadores que nos permitan llegar a un diagnóstico endodóntico a nivel molecular. Algunos estudios han intentado

determinar concentraciones de proteínas específicas de fluido dentinario relacionadas al diagnóstico pulpar (82,95,107), pero ninguno de estos compara la concentración total de proteínas presentes.

El uso de esta membrana de papel coincide con el estudio realizado por Zehnder, quién evaluó la expresión de la MMP-9 presente en el fluido dentinario, como biomarcador de la inflamación pulpar, a través de Durapore como un material para la recolección del fluido dentinario a través de un ensayo de fluorescencia. Este equipo de investigación concluyó que es posible detectar la MMP-9 en el fluido dentinario (122). Sin embargo, de las 19 muestras obtenidas sólo 7 reportaron la presencia de MMP-9, probablemente debido a un pequeño tamaño muestral, a la técnica de recolección de éstas y a la técnica de elución utilizada para su procesamiento. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, en el que se observó la detección de proteínas en todas las muestras procesadas, probablemente debido a una diferente técnica de adquisición, mantención, almacenamiento y procesamiento de las muestras. El presente estudio además utilizó un tamaño muestral mayor que el de Zehnder, con un total de 33 versus 19 muestras.

Tal como mencionamos anteriormente, uno de los requisitos que debe cumplir el desarrollo de una prueba diagnóstica, es la creación y estandarización de protocolos que consideren la adquisición, almacenamiento y tiempo de manejo de la muestra (137) y esto es precisamente uno de los objetivos de esta investigación. El mismo autor en el año 2013 realizó un estudio donde comparó la efectividad de distintas membranas de celulosa, con una membrana de PVDF con un tamaño del poro de 0,45 μm en capacidad para absorber agua y liberar proteínas (MMP-2) de dentinas expuestas en dientes sanos durante procedimientos de cambio de restauraciones, utilizando un ensayo de ELISA (107). El tiempo de recolección de la muestra utilizada por el autor fue de 30 segundos por diente y su almacenamiento fue a -20°C . Además, el buffer utilizado para la elución fue 330 μL de PBS pH 7,2 centrifugando las muestras a 2000 g por 30 minutos a 4°C . Con este estudio se concluyó que las membranas de celulosa con tamaños de poro mayores (12 a 15 μm), absorben significativamente más agua que la membrana de PVDF estudiada, con un valor $p < 0,05$. Finalmente concluye que el uso de membranas de celulosa con tamaño del poro mayores, pueden recolectar cantidades medibles de MMP-2 de la dentina de dientes sanos

en 9 de 13 casos, en comparación a las membranas de PVDF que sólo lo lograron en 1 de 13 casos, con diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$. Los resultados anteriores no coinciden con los de este estudio, donde sí se pudo determinar la concentración de proteínas de todas las muestras recolectadas. La explicación de esta diferencia, obedece posiblemente al método utilizado para la adquisición de la muestra, debido a que en este estudio se estandarizó el tiempo de toma en 2 minutos por diente, como también a la mantención y almacenamiento de las muestras, que fue a -80°C . Además esta diferencia podría deberse al procesamiento de las muestras, ya que en este estudio se utilizó un buffer distinto de 1:PBS1X + 0,1% de detergente Tween 20, manteniendo las muestras en reposo por 30 minutos y luego fueron centrifugadas para la obtención de las proteínas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C . Probablemente este método permitió una mejor liberación de las proteínas. Finalmente, es posible que el análisis para la determinación de la concentración de proteínas utilizado en este estudio, correspondiente al ensayo de micro BCA, sea un factor relevante en las diferencias obtenidas por ambos estudios. Esto ya que comparado con otros métodos, el ensayo de micro BCA es uno de los más sensibles y puede detectar proteínas en concentraciones tan bajas como $0.5 \mu\text{g/mL}$ hasta un máximo de $20 \mu\text{g/mL}$ (142).

Finalmente, y respondiendo el objetivo principal de este estudio, los resultados muestran que fue posible detectar un perfil diferencial de biomarcadores inflamatorios obtenidos de fluido dentinario con membrana de Durapore® en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis irreversible sintomática y pulpitis reversible por medio del análisis de tecnología Lúminex®. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

Es relevante destacar que en esta investigación se utilizó para evaluar este objetivo la “Curva ROC”, ya que es una medida global e independiente del punto de corte. El análisis de la “Curva ROC” se relaciona de forma directa y natural con el análisis del coste/beneficio, en la toma de decisiones diagnósticas. Por esto, en el ámbito sanitario, las curvas ROC también se denominan curvas de rendimiento diagnóstico (143) y son una herramienta estadística utilizada en el análisis de la capacidad discriminativa de una prueba diagnóstica dicotómica. Para efectos de este estudio se quería lograr discriminar entre los diagnósticos de pulpitis

irreversible de reversible. Dentro de las moléculas encontradas estuvieron los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-acid) que presentó un buen comportamiento, es decir excelente capacidad de discriminación y el factor de crecimiento vascular endotelial alfa (VEGF- α), con un regular comportamiento, es decir tiene una aceptable capacidad de discriminación entre pulpitis irreversible de reversible. En el caso del factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-acid), si bien es un factor poco reportado en la literatura a nivel pulpar, los resultados de esta investigación coinciden con los de Abd-Elmeguid, quien encontró diferencias estadísticamente significativas con un p-value <0,001 para el grupo de pulpitis reversible versus irreversible (144). La explicación de estos hallazgos se pueden entender según lo reportado por Zhang (2009) (145), quien en su estudio describió que el FGF-acid, es un factor de crecimiento secretado por los fibroblastos, con marcadas acciones mitógenas ya que permite la diferenciación de células madre pulpares en fibroblastos y células endoteliales proliferativas para una neoangiogénesis en las zonas afectadas. Además de tener una acción muy marcada en las células del endotelio, esta molécula tiene mucha relación con la fisiología de la VEGF (146). Jeanneau (2017) (146), mostró la importancia de estas dos moléculas en los procesos reparativos de la pulpa, describiendo que luego de una noxa a las 6 horas ya se puede ver la expresión de factores de crecimiento, como las moléculas responsables de desencadenar las primeras reacciones de inflamación-reparación. Es importante destacar que FGF-acid tuvo un buen comportamiento según la curva ROC (0.8), cuando fue medido en forma aislada así como también cuando fue medido en conjunto a IL-1 α . Por otro lado como complemento la aceptable capacidad de discriminación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF- α), se puede explicar según lo que Hahn y cols. han reportado en su estudio, debido a que los odontoblastos al ser los primeros en enfrentarse con los antígenos de la caries, inducen la producción VEGF- α . Este factor de crecimiento en una primera instancia durante la respuesta innata, sería un estimulador de la angiogénesis y la permeabilidad vascular e induciría a las células pulpares cuando son invadidas por el ácido lipoteicoico de los Gram positivos (84).

El VEGF- α es una glicoproteína con la capacidad de incrementar la proliferación vascular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo cual en un inicio ayuda a la reparación gracias a la quimiotaxis de las células al sitio inflamado. De esta forma el VEGF es probablemente un factor implicado en la etiología y progresión de la pulpitis. Sin embargo, posteriormente se produce un desbalance entre reparación e inflamación, que tiene directa relación con la etiología de la pulpitis, al atraer una elevada concentración de células inflamatorias. Artese el año 2002, (88) reportó que el punto crítico del paso de pulpitis reversible a irreversible, ocurre donde hay aumento de la presión osmótica al interior de la cámara pulpar en una cavidad inextensible, lo que produce la inevitable hipoxia, lisis de células y posterior necrosis. Esto explicaría la alta y gradual expresión de VEGF- α en pulpitis reversible e irreversible y posteriormente una disminución en la medida que se acerca a la necrosis. Es por esto que sería acertado pensar en dicho factor como biomarcador de la inflamación pulpar irreversible.

Un segundo tipo de moléculas encontradas en esta investigación corresponden al grupo de las interleuquinas, entre ellas la IL-1 α y la IL-8, ambas con un regular comportamiento, es decir, con una aceptable capacidad de discriminación. Éstas tienen acciones quimiotácticas que son fundamentales para la progresión de la inflamación. Nuestros hallazgos coinciden en parte con los reportados en la literatura (84). La explicación racional de la expresión de la IL-8 se debe a que según lo que explica Hahn (2007), es producida por varias células pulpares, incluidos los macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células endoteliales (84). Huang y cols reportaron que en condiciones *in vitro*, las células odontoblasticas exhiben un bajo nivel de expresión de IL-8 y que aumenta significativamente con la estimulación del patrón molecular asociado a patógenos, especialmente lipopolisacáridos (147). Esta expresión aumentada de IL-8, se correlaciona con un aumento de neutrófilos polimorfo nucleares (PMN) dentro de la pulpa, debido a que la IL-8 induce la quimiotaxis de neutrófilos y la liberación de enzimas de degradación durante la desgranulación (147). Por lo tanto, la IL-8 a menudo se describe como la principal molécula reguladora en la respuesta inflamatoria aguda y los niveles elevados pueden perpetuar y exacerbar la respuesta inflamatoria aguda. Esta actividad puede explicar los hallazgos de esta investigación, sobre la expresión aumentada de IL-8 en el tejido de la pulpa con pulpitis reversible versus

la pulpa normal, encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, esto no ocurrió entre pulpitis reversible e irreversible. Es posible que las diferencias de este estudio con las de Huang (2007) se deba principalmente a la clasificación de pulpa inflamada, ya que en su caso es más amplia y se refiere a inflamación como un término amplio, sin especificar si es reversible o irreversible. La presente investigación es más precisa y se divide en dos tipos de inflamación pulpar, reversible e irreversible, ambos basados en la clasificación utilizada y recomendada por la AAE (23).

Si bien, la documentación acerca de marcadores biológicos específicos en la inflamación pulpar es escasa y aún falta mucho por dilucidar, las líneas de investigación están más enfocadas a las metaloproteinasas como biomarcadores. Zehnder y cols, han estudiado la MMP-9 para este fin. La MMP-9, es una metaloproteinasa de sub tipo de las gelatinasas, la cual se ha logrado medir en fluido dentinario de dientes con lesión de caries activa, ya que, según la literatura, tienen una acción proteolítica importante (148). Se sabe además, que el fluido dentinario es una fuente importante de MMP-9, incluso en dientes sanos porque los túbulos dentinarios tienen una acción gelatinásica (degradan colágeno y elastina) (149).

Un estudio prospectivo realizado por Mente y cols, determinaron el nivel de MMP-9 en muestras de sangre colectadas de pulpas asintomáticas con caries comunicantes, en dientes con pulpitis reversible e irreversible. Este autor confirmó una elevada presencia de dicha metaloproteinasa en cuanto más sintomática se encontraba la pieza dentaria, por lo que determinó un grado de relación entre inflamación/destrucción de la pulpa y presencia de MMP-9 (119).

En el presente estudio se encontraron niveles elevados de dicha metaloproteinasa, pero estos no fueron lo suficientemente precisos, según el análisis con curva ROC, teniendo un valor de 0.67, inferior al obtenido por FGF - acid (0.78), IL -1 α (0.7), VEGF - α (0.69) e IL -8 (0.68). La posible explicación de este hallazgo tendría que ver con que la MMP-9 es una gelatinasa almacenada por los neutrófilos y los eosinófilos y tiene un papel importante en la degradación final del colágeno (150), una vez que éste ha sido modificado inicialmente por otras colagenasas, por lo tanto al parecer estaría más presente en diagnósticos más cercanos a la necrosis pulpar.

Otro punto interesante encontrado en esta investigación es que la interleuquina que presentó un valor de curva ROC más favorable (0,69) fue la IL -1 α , siendo la IL -1 β la más reportada en la literatura. Se sabe en términos generales que IL -1 α , es la iniciadora de la respuesta inmune celular, ya que es secretada por monocitos y macrófagos activados. Además produce liberación de prostaglandina y estimulación de fibroblastos (144), por lo que al comparar lo reportado en la literatura con los resultados obtenidos en esta investigación, vuelven a tomar importancia los fibroblastos como precursores de la respuesta inmuno-inflamatoria a nivel pulpar. Por otro lado Wisithphrom y cols reportaron en su estudio que la IL-1 α puede inducir la destrucción de la pulpa regulando en forma diferencial las MMPs y TIMPs (113).

Si se suman los resultados obtenidos de la IL -1 α con el FGF acid y se realiza una curva ROC, se ven potenciados ambos efectos y el poder diagnóstico aumentó a 0.83, siendo el valor más elevado y considerado favorable según la presente investigación. Esto coincide con lo reportado en la literatura, acerca de que la respuesta inmuno-inflamatoria no depende de un solo analito en particular, sino de la combinación de ellos, entendiendo la respuesta inflamatoria e inmune como un proceso (97). Es por esto que en esta investigación, se decidió estudiar estos 14 analitos simultáneamente, en vez de cada uno de ellos por separado, para de esta forma, tener un mejor entendimiento e información de esta respuesta a nivel pulpar.

Al comparar los grupos experimentales entre sí, se encontró que efectivamente existe un perfil diferencial diagnóstico entre ellos. De esta forma, se observa que la IL-1 α y FGF-acid, está aumentada significativamente entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis irreversible (G3), pero además se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpitis reversible (G2) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3). Esto sin embargo, no ocurre entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis reversible (G2), por lo que es posible inferir que son biomarcadores que están más aumentados en las etapas finales de la inflamación y por lo mismo, estarían más relacionados con el paso de pulpitis reversible a irreversible. Coincidentemente esos dos biomarcadores, son los que tuvieron los resultados de curvas ROC más altos (0.8 y 0.70 respectivamente).

VEGF- α tiene una interpretación paradójica, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis reversible (G2) y tampoco cuando se comparó el grupo de pulpa normal (G1) con el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3). Sin embargo, sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpitis reversible (G2) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3), es decir, en ambos estadios de la inflamación, pero no entre inflamación y pulpa normal. Esto se puede explicar porque ciertas moléculas durante el proceso de la inflamación, tiene acciones duales y antagónicas, por un lado pro inflamatorias y por otro anti inflamatorias. De esta forma, estarían aumentadas en la etapa más cúlmine de la inflamación. Cuando se analiza su potencial diagnóstico con la curva ROC, podemos observar un buen comportamiento con un valor de 0.7.

Para IL-8 y MMP-9 se pueden identificar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pulpa normal (G1) y el grupo de pulpitis irreversible sintomática (G3), lo que indica su escasa participación en el estado basal de la pulpa, es decir en pulpa normal. Ocurre lo mismo al comparar los grupos de pulpa normal (G1) y pulpitis reversible (G2), por lo que se puede inferir que son analitos que ayudan al asentamiento de la inflamación. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, ya que la IL -8 es una interleuquina del sub tipo quimioquina, es decir, atrae a las células inmuno-inflamatorias al sitio de infección (95). Además como fue mencionado anteriormente, la MMP-9 produce la degradación del colágeno y elastina, etapa importante en el desequilibrio y avance hacia necrosis pulpar. Ambos analitos tienen comportamientos considerados regulares en cuanto a eficiencia diagnóstica, con valores de curvas ROC 0.68 y 0.67 respectivamente. Con respecto a TNF- α e IL-1 β , podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpa normal (G1) y pulpitis irreversible sintomática (G3), es decir, son analitos que aumentan gradualmente desde el estado de pulpa normal al estado de pulpitis irreversible sintomática. Estos resultados coinciden con la literatura ya que son interleuquinas capaces de mantener la respuesta inmune y acrecentar la respuesta inflamatoria (125,151). Son comunes para variados tipos de inflamación y sus efectos son ampliamente reportados. Siguiendo con lo observado anteriormente, ambas están en segundo

lugar en su potencial diagnóstico y posteriores a IL -8 y MMP -9 con valores de curvas ROC de 0.66 para TNF - α y 0.64 para IL-1 β .

En cuanto a TIMP -1 se puede observar que sigue el mismo patrón de los analitos anteriores, es decir, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpa normal (G1) y pulpitis irreversible sintomática (G3) únicamente, pero su potencial diagnóstico es menos considerable siendo el valor de curva ROC de 0.58. Sin embargo, no es extraño el hecho de que se encuentren en menos proporción, dado que la TIMP -1 tiene como acción biológica, inhibir a las metaloproteinasas en la inflamación y por lo tanto, actuaría como molécula anti-inflamatoria, sólo de un grupo celular involucrado en dicha respuesta. En un estudio reciente realizado por Chang (2017) (152), se observó la relación que existe entre las TIMP-1 y el FGF, identificando que dicho factor aumenta la concentración de las TIMP-1 en estadios inflamatorios, para lograr contrarrestar la acción de la metaloproteinasas en su degradación de colágeno y por ende colapso tisular. Por lo tanto, dicha investigación coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Para los biomarcadores que estuvieron bajo el límite de cuantificación (LOQ), es decir, MMP -3, PDGF-bb, CXCL -10 y IL12p40, se puede considerar, utilizar un kit de medición de mayor sensibilidad en una futura investigación, ya que en algunos casos su comportamiento discriminativo como método diagnóstico fue interesante. Este es el caso de la MMP-3, la cual estuvo bajo el LOQ, sin embargo algunas muestras lograron ser cuantificadas en diagnóstico de púlpitis irreversible.

Para lograr determinar los biomarcadores específicos de la respuesta pulpar inflamatoria, se comparó cuáles se encuentran en estado "basal", es decir, con un estado pulpar normal y cuales se encuentran en los diferentes estados de pulpitis, ya que sabemos que ciertos biomarcadores, como las metaloproteinasas y factores de crecimiento, se encuentran adosadas en la dentina desde el desarrollo de esta y que se ha visto que también, tienen un rol fundamental en la progresión de la caries (148). Este conocimiento, nos da un acercamiento hacia una mejor comprensión acerca de cuáles biomarcadores se encuentran presentes en la dentina durante el proceso de formación, y cuáles son secretados por la pulpa a modo de defensa.

Al comparar este estudio observacional transversal analítico de diagnóstico con lo reportado en la literatura, gana validez el hecho de haber medido

simultáneamente 14 analitos de 64 muestras, debido a que generalmente se observan mediciones de un analito o dos, pero no se han reportado 14. Esto es muy relevante, dado que actualmente se entiende la reacción inmuno-inflamatoria, como una confluencia de acciones simultáneas entre muchos tipos celulares.

7.1 Limitaciones del estudio

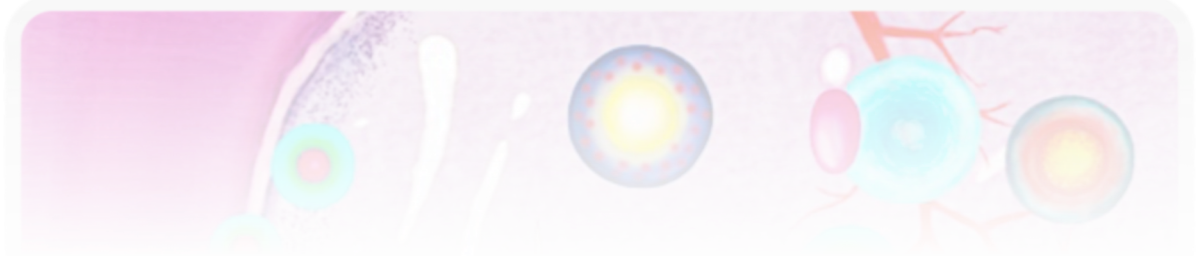
Una de las limitaciones de este estudio fue la curva de aprendizaje necesaria para poder manipular correctamente el láser doppler, debido a que es un equipo muy sensible al existir muchos factores que pueden alterar la medición del flujo sanguíneo pulpar como por ejemplo; la estabilidad de la sonda, los movimientos involuntarios del paciente y el ruido ambiental entre otros. Para evitar estos inconvenientes, todas las mediciones de flujometría láser doppler fueron realizadas por el mismo operador calibrado para esta tarea, siguiendo siempre todos los protocolos previamente establecidos (Anexo 10).

Otra de las limitaciones fue que en el análisis histológico para validar el diagnóstico clínico, no fueron considerados los diagnósticos de pulpitis reversible, esto ya que por motivos éticos no fue posible hacer la extirpación pulpar. Ahora bien, tal como se mencionó anteriormente, Ricucci concluyó que en los diagnósticos de pulpitis reversible existía una correspondencia con la histología en el 96,6% de los casos (80). Sin embargo, este autor agrupó los diagnósticos de pulpa normal y pulpitis reversible porque representaban condiciones similares en términos de pronóstico. Esto podría ser un sesgo en términos de coincidencia del diagnóstico clínico con el histológico.

En relación a la determinación de la concentración de proteínas una de las limitaciones para lograr este objetivo fue el bajo tamaño muestral, el cual fue seleccionado de forma arbitraria por conveniencia debido a la ausencia de estudios previos respecto al tema, que permitan calcular a través de un método probabilístico. Es fundamental aumentar el tamaño muestral, para obtener resultados más representativos y extrapolables y darle mayor validez externa a esta investigación. Esto es algo que en la actualidad se está llevando a cabo.

Finalmente la concentración obtenida de fluido dentinario es escasa, lo que la hace una técnica muy sensible, dependiente del operador, del papel con el cuál se toma la muestra y del tipo de análisis cuantitativo/cualitativo que se realice (104). El fluido que puede ser colectado de la dentina expuesta, es apenas suficiente para lograr realizar un análisis del estado general de la pulpa (107). Sin embargo, para compensar esta limitación se realizó una estandarización de la adquisición de la muestra, almacenamiento y conservación de ésta, así como también de su lectura, para validar así el método. Además se utilizó la tecnología Lúminex, como un ensayo de alta sensibilidad que compensaría la baja concentración de proteínas recolectada en el fluido dentinario.

Conclusiones



8 CONCLUSIONES

En relación a los objetivos planteados en esta investigación se reportan las siguientes conclusiones:

1. Existe un perfil diferencial entre los biomarcadores inflamatorios obtenidos en fluido dentinario en dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática.
2. Existe relación entre el diagnóstico clínico obtenido con las pruebas de sensibilidad pulpar versus la prueba de vitalidad pulpar utilizando láser Doppler. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpa normal versus pulpitis reversible, así como pulpa normal versus pulpitis irreversible con un valor $p=0,0001$. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos pulpitis reversible y pulpitis irreversible.
3. Existe relación entre el diagnóstico clínico de pulpa normal y pulpitis irreversible sintomática versus el histológico cuando se utilizaron los criterios definidos.
4. Es posible determinar la concentración de proteínas en muestras de fluido dentinario de dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática, utilizando una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Durapore® a través de ensayo de micro BCA. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpitis reversible y pulpitis irreversible.
5. Es posible detectar con tecnología Luminex en el fluido dentinario de dientes con diagnóstico de pulpa normal, pulpitis reversible y pulpitis irreversible sintomática la expresión de los siguientes biomarcadores: IL -1 α , VEGF - α , FGF -acid, IL -1 β , TNF - α , IL -8, MMP -9, IL -4 y TIMP -1.
6. El grupo de factores de crecimiento VEGF- α , FGF-acid, junto con las interleuquinas IL -1 α y IL -8, fueron las que tuvieron un buen comportamiento en el proceso inflamatorio de los diferentes grupos experimentales, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Además, este mismo grupo de moléculas tuvo un potencial discriminativo mayor, en cuanto a sensibilidad y especificidad de cada diagnóstico. Por lo tanto, se

podrían considerarse como un pool molecular para el diagnóstico diferencial de entre los diagnósticos de pulpitis reversible e irreversible.

Finalmente y a modo de resumen debido a las limitaciones de la precisión de las pruebas de diagnóstico clínico, muchas veces los resultados de la terapia pulpar vital son impredecibles. Las estrategias de diagnóstico basadas en moléculas (diagnóstico molecular) son prometedoras y pueden ser relevantes para determinar indicaciones clínicas adecuadas para terapias pulpares vitales y optimizar de esta forma el pronóstico.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Con esta innovadora investigación se espera sentar las bases para darle validez interna a una prueba diagnóstica, que logre establecer un perfil diferencial de biomarcadores específicos y asociarlos con los diagnósticos pulpares. Las perspectivas futuras apuntan a desarrollar un kit diagnóstico certero basado en un enfoque molecular, que podría permitir ayudar a la distinción clínica entre pulpitis reversible de una pulpitis irreversible. Un ejemplo de esto son los tests inmunocromatográficos que se basan en la captura inmunológica de un coloide coloreado, durante su paso a través de una membrana sobre la que se ha inmovilizado un anticuerpo o un antígeno. Se trata de un proceso rápido, sencillo, fiable y de fácil interpretación. La idea del futuro kit diagnóstico está graficado en la Figura 32.

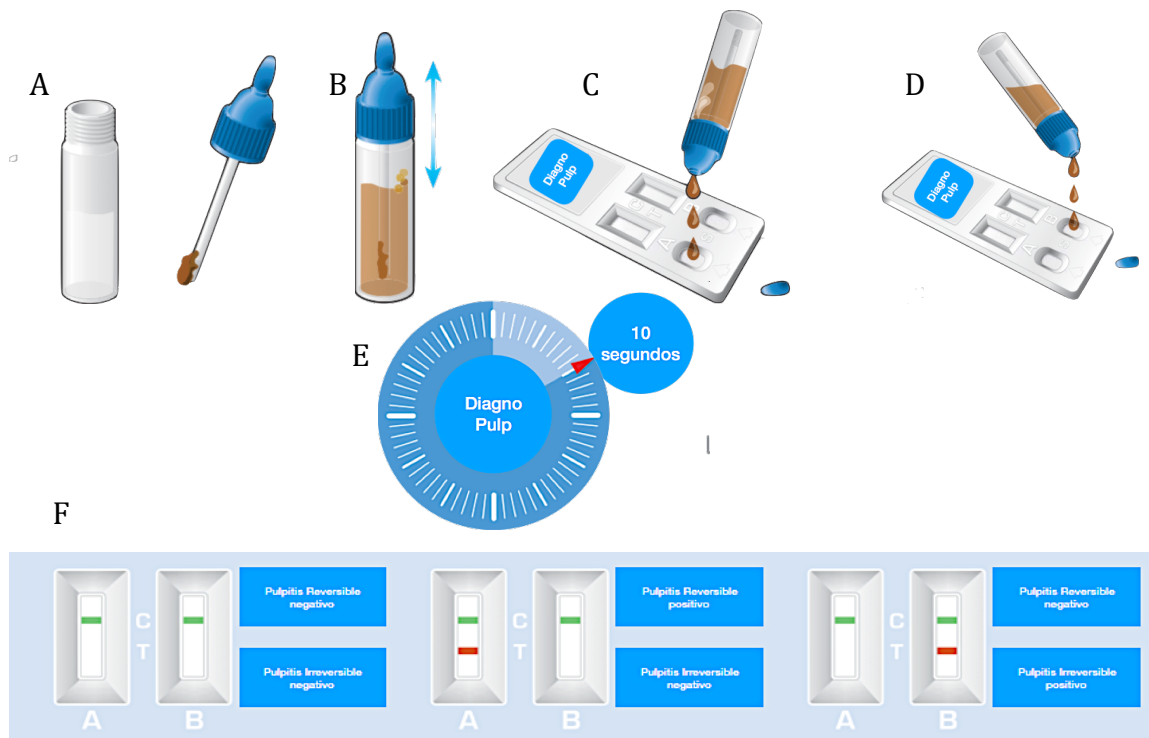


Figura 32 de posible kit diagnóstico "DiagnoPulp". A: abrir el tubo para dilución y con el dispensador, tomar una muestra de fluido dentinario. B: introducir el dispensador en el diluyente, cerrando el tubo. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra. C: romper la punta del vial. Depositar exactamente 3 gotas en la ventana circular "A" marcada con una flecha. D: depositar exactamente 3 gotas en la ventana circular "B" marcada con una flecha. E: leer el resultado a los 10 segundos. F: interpretación de los resultados.

De esta forma un correcto diagnóstico podría mejorar la tasa de éxito de la terapia pulpar vital.

Finalmente, los biomarcadores para el diagnóstico molecular de patologías en endodoncia son el futuro hacia a donde apunta la odontología del siglo XXI. Esta tecnología permitiría objetivar el diagnóstico pulpar, por medio de un test diagnóstico, con una toma de muestra poco invasiva.

10 FUENTE DE FINANCIAMIENTO

- **Financiamiento de exámenes y otros procedimientos:** las radiografías periapicales, pruebas de sensibilidad y vitalidad fueron financiados con financiamiento propio.
- **Coste para los participantes:** este proyecto no tuvo coste para los sujetos que decidieron participar en el estudio.
- **Pagos por participar en el estudio:** los sujetos que decidieron participar en el estudio, no recibieron un pago monetario por participar en él. El paciente solo financió el tratamiento endodóntico que debió ser realizado por indicación previa, en el caso de diagnóstico de pulpitis irreversible.
- **Conflictos de Interés:** el investigador y los co-investigadores declaran no tener conflicto de interés en este proyecto de investigación.
- **Proyecto de mejora institucional (PMI):** Postulación y adjudicación de recursos internos de la Universidad de los Andes, estos son fondos del proyecto de mejora institucional (Anexo 14).

11 DATOS RELEVANTES DURANTE EL PERIODO DE DESARROLLO DEL PROYECTO

- Presentación de póster XXVIII Reunión anual de IADR División Chile, 8 al 9 de agosto de 2016-Santiago-Chile.
- 2017 Presentación de póster en ESE (European Society Endodontology. Bruselas 2017). Título: “Inflamed pulp: a promising new source of functional mesenchymal stem cells. ACCEPTED for Original Scientific Abstracts at the. Carolina Inostroza, Claudia Brizuela, Ana Maria Vega, Flavio Carrión, Patricia Luz-Crawford and Maher Atari (Anexo 17).
- Presentación de póster en ESE (European Society Endodontology. Bruselas 2017). Título: “Cytokines as biomarkers in irreversible symptomatic pulpitis.” ACCEPTED for Original Scientific Abstracts at the Claudia Brizuela, Carolina Inostroza , Gastón Meza, Nicole Saint-Jean, Carlos Briceño, Montserrat Mercadé (Anexo 17).
- Expositora en la 1era Jornada de Endodoncia UDP, a llevarse a cabo el día viernes 09 de Junio de 2017, organizada por la Sociedad Científica de Estudiantes de Odontología de la Universidad Diego Portales (Anexo 18).
- Expositor en XIV JORNADAS CIENTÍFICAS INTERNACIONAL de la Facultad de Odontología tituladas “Caries, La Enfermedad, La Lesión y su Manejo Clínico”. Adjunto programa (Anexo 19).
- Postulación y adjudicación de recursos internos de la Universidad de los Andes, estos son fondos del Proyecto de mejora institucional (PMI) (Anexo 14).
- Presentación oral en las II Jornadas Científicas en Salud, realizadas en la Universidad de los Andes en agosto de 2017 (Anexo 27).
- Presentación Póster Presentación poster en International Association for Dental Research (IADR) Chile, 2017 “Determination of protein concentration in dental fluid in teeth with reversible pulpitis and irreversible pulpitis” (Anexo 20).

12 PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DURANTE EL DESARROLLO DEL PERIODO DOCTORAL

Durante el desarrollo del doctorado la postulante realizó cuatro publicaciones científicas en revistas indexadas, que se relacionan directa e indirectamente con esta tesis. Se enumeran los artículos a continuación:

- **Brizuela, C.**, Ormeño, A., Cabrera, C., Cabezas, R., Silva, C. I., Ramírez, V., & Mercade, M. (2017). Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *Journal of endodontics*, 43(11), 1776-1780 (153) (Anexo 21).
- Carrasco, P. A., **Brizuela, C. I.**, Rodríguez, I. A., Muñoz, S., Godoy, M. E., & Inostroza, C. (2017). Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study. *Forensic science international*, 279, 251-257 (154) (Anexo 23).
- Pinto, N., Harnish, A., Cabrera, C., Andrade, C., Druttman, T., & **Brizuela, C.** (2017). An Innovative Regenerative Endodontic Procedure Using Leukocyte and Platelet-rich Fibrin Associated with Apical Surgery: A Case Report. *Journal of endodontics*, 43(11), 1828-1834 (155) (Anexo 24).
- Ioannis Angelopoulos, Claudia Brizuela, and Maroun Khoury. (2018). Gingival Outperform Haploidentical Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation Rate, Migration Ability and Angiogenic Potential. *Cell Transplantation*. DOI:10.1177/0963689718759649 journals.sagepub.com/home/cll (Anexo 25).

13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. *J Dent Res* [Internet]. 29 de mayo de 2013; Disponible en: <http://jdr.sagepub.com/content/early/2013/05/23/0022034513490168.abstract>
2. Urzua I, Mendoza C, Arteaga O, Rodríguez G, Cabello R, Faleiros S, et al. Dental caries prevalence and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. *Int J Dent*. 2012;2012.
3. Mejare I, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, et al. Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review. *Int Endod J*. 2012;45(7):597-613.
4. SDSR-2006D - 2005-06 Survey of Dental Services Rendered - Downloadable (SC) [Internet]. [cited 2018 Jan 30]. Available f.
5. Jafarzadeh H, Abbott P. Review of pulp sensibility tests. Part I: general information and thermal tests. *Int Endod J*. 2010;43(9):738-62.
6. Jafarzadeh H, Abbott P. Review of pulp sensibility tests. Part II: electric pulp tests and test cavities. *Int Endod J*. 2010;43(11):945-58.
7. Schwendicke F, Frencken J, Bjørndal L, Maltz M, Manton D, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res*. 2016;28(2):58-67.
8. Kidd E, Fejerskov O. Essentials of dental caries. Oxford University Press; 2016.
9. Bjørndal L, Ricucci D. Pulp Inflammation: From the Reversible Pulpitis to Pulp Necrosis During Caries Progression. En: *The Dental Pulp*. Springer; 2014. p. 125-39.
10. Maltz M, Henz S, de Oliveira E, Jardim J. Conventional caries removal and sealed caries in permanent teeth: a microbiological evaluation. *J Dent*. 2012;40(9):776-82.
11. Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: part 1. Clinical and diagnostic implications. *J Can Dent Assoc*. 2009;75(1).
12. Bender I. Pulpal pain diagnosis—a review. *J Endod*. 2000;26(3):175-9.
13. Gunji T. Morphological research on the sensitivity of dentin. *Arch Histol Jpn*. 1982;45(1):45-67.
14. Walton RE, Nair PR. Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1995;80(6):710-9.
15. Curro FA. Tooth hypersensitivity in the spectrum of pain. *Dent Clin North Am*. 1990;34(3):429-37.
16. Krauser JT. Hypersensitive teeth. Part I: etiology. *J Prosthet Dent*. 1986;56(2):153-6.
17. BERGEMHOLTZ G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Eur J Oral Sci*. 1977;85(2):122-9.
18. Brännström M. Sensitivity of dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;21(4):517-26.
19. Brännström M. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod*. 1986;12(10):453-7.
20. Rechenberg D, Zehnder M. Molecular diagnostics in endodontics. *Endod Top*. 2014;30(1):51-65.
21. McClannahan SB, Baisden MK, Bowles WR. Endodontic diagnostic terminology update. *Northwest Dent*. 2011;90(5):25-7.
22. Abu-Tahun I, AL RABAB'AH M, Khraisat A. A review of the questions and needs in endodontic diagnosis. *trauma*. 2012;6:8.

23. Glickman GN. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives. *J Endod.* 2009;35(12):1619-20.
24. Levin LG, Law AS, Holland G, Abbott PV, Roda RS. Identify and define all diagnostic terms for pulpal health and disease states. *J Endod.* 2009;35(12):1645-57.
25. Sigurdsson A. Pulpal diagnosis. *Endod Top.* 2003;5(1):12-25.
26. Rôças IN, Alves FR, Rachid CT, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, et al. Microbiome of deep dentinal caries lesions in teeth with symptomatic irreversible pulpitis. *PloS One.* 2016;11(5):e0154653.
27. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges J, Cuturi M, et al. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *J Dent Res.* 2015;0022034515612086.
28. Estrela C, Guedes OA, Silva JA, Leles CR, Estrela CR de A, Pécora JD. Diagnostic and clinical factors associated with pulpal and periapical pain. *Braz Dent J.* 2011;22(4):306-11.
29. Alghaithy R, Qualtrough A. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. *Int Endod J.* 2017;50(2):135-42.
30. Levin LG. Pulp and periradicular testing. *J Endod.* 2013;39(3):S13-9.
31. Pitt Ford TR, Patel S. Technical equipment for assessment of dental pulp status. *Endod Top.* 2004;7(1):2-13.
32. Miller SO, Johnson JD, Allemang JD, Strother JM. Cold testing through full-coverage restorations. *J Endod.* 2004;30(10):695-700.
33. Jones VR, Rivera EM, Walton RE. Comparison of carbon dioxide versus refrigerant spray to determine pulpal responsiveness. *J Endod.* 2002;28(7):531-3.
34. Jespersen JJ, Hellstein J, Williamson A, Johnson WT, Qian F. Evaluation of dental pulp sensibility tests in a clinical setting. *J Endod.* 2014;40(3):351-4.
35. Gopikrishna V, Tinagupta K, Kandaswamy D. Comparison of electrical, thermal, and pulse oximetry methods for assessing pulp vitality in recently traumatized teeth. *J Endod.* 2007;33(5):531-5.
36. Dastmalchi N, Jafarzadeh H, Moradi S. Comparison of the efficacy of a custom-made pulse oximeter probe with digital electric pulp tester, cold spray, and rubber cup for assessing pulp vitality. *J Endod.* 2012;38(9):1182-6.
37. Peters DD, Baumgartner JC, Lorton L. Adult pulpal diagnosis. I. Evaluation of the positive and negative responses to cold and electrical pulp tests. *J Endod.* 1994;20(10):506-11.
38. Weisleder R, Yamauchi S, Caplan DJ, Trope M, Teixeira FB. The validity of pulp testing: a clinical study. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(8):1013-7.
39. Chen E, Abbott PV. Evaluation of accuracy, reliability, and repeatability of five dental pulp tests. *J Endod.* 2011;37(12):1619-23.
40. Lin J, Chandler N. Electric pulp testing: a review. *Int Endod J.* 2008;41(5):365-74.
41. Villa-Chávez CE, Patiño-Marín N, Loyola-Rodríguez JP, Zavala-Alonso NV, Martínez-Castañón GA, Medina-Solís CE. Predictive values of thermal and electrical dental pulp tests: a clinical study. *J Endod.* 2013;39(8):965-9.
42. Dummer P, Hicks R, Huws D. Clinical signs and symptoms in pulp disease. *Int Endod J.* 1980;13(1):27-35.
43. Seltzer S, Bender I, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963;16(7):846-71.

44. Tyldesley W, Mumford J. Dental pain and the histological condition of the pulp. *Dent Pract Dent Rec.* 1970;20(10):333.
45. Jafarzadeh H, Udoye CI, Kinoshita J-I. The application of tooth temperature measurement in endodontic diagnosis: a review. *J Endod.* 2008;34(12):1435-40.
46. Diccionario de la Lengua Española. 23.a ed. 2014. En.
47. Karayilmaz H, Kirzioğlu Z. Comparison of the reliability of laser Doppler flowmetry, pulse oximetry and electric pulp tester in assessing the pulp vitality of human teeth. *J Oral Rehabil.* 2011;38(5):340-7.
48. Todea C, Canjau S, Miron M, Vitez B, Noditi G. Laser Doppler Flowmetry Evaluation of the Microcirculation in Dentistry. En: *Microcirculation Revisited-From Molecules to Clinical Practice.* InTech; 2016.
49. Gazelius B, Olgart L, Edwall B, Edwall L. Non-invasive recording of blood flow in human dental pulp. *Dent Traumatol.* 1986;2(5):219-21.
50. Riva CE. Basic principles of laser Doppler flowmetry and application to the ocular circulation. *Int Ophthalmol.* 2001;23(4-6):183-9.
51. Jafarzadeh H. Laser Doppler flowmetry in endodontics: a review. *Int Endod J.* 2009;42(6):476-90.
52. Albrecht H-E, Damaschke N, Borys M, Tropea C. *Laser Doppler and phase Doppler measurement techniques.* Springer Science & Business Media; 2013.
53. <https://www.moor.co.uk/product/moorvms-pc-moorvms-pc/50>.
54. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J.* 2000;33(3):173-85.
55. Roebuck E, Evans D, Stirrups D, Strang R. The effect of wavelength, bandwidth, and probe design and position on assessing the vitality of anterior teeth with laser Doppler flowmetry. *Int J Paediatr Dent.* 2000;10(3):213-20.
56. Ingólfsson ÆR, Tronstad L, Hersh EV, Riva CE. Efficacy of laser Doppler flowmetry in determining pulp vitality of human teeth. *Dent Traumatol.* 1994;10(2):83-7.
57. Histan M, Daigle R, Miller C, McLeod F. Proceedings: Evaluation of the pulsed Doppler with a Fast Fourier Transform. *Biomed Sci Instrum.* 1974;10:61-6.
58. Polat S, Er K, Polat NT. Penetration depth of laser Doppler flowmetry beam in teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(1):125-9.
59. Chandler NP, Love RM, Sundqvist G. Laser Doppler flowmetry An aid in differential diagnosis of apical radiolucencies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;87(5):613-6.
60. Ikawa M, Komatsu H, Ikawa K, Mayanagi H, Shimauchi H. Age-related changes in the human pulpal blood flow measured by laser Doppler flowmetry. *Dent Traumatol.* 2003;19(1):36-40.
61. Watson A, Pittford T, McDonald F. Blood flow changes in the dental pulp during limited exercise measured by laser Doppler flowmetry. *Int Endod J.* 1992;25(2):82-7.
62. Ahn J, Pogrel MA. The effects of 2% lidocaine with 1: 100,000 epinephrine on pulpal and gingival blood flow. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1998;85(2):197-202.
63. Fernieini EM, Bennett JD, Silverman DG, Halaszynski TM. Hemodynamic assessment of local anesthetic administration by laser Doppler flowmetry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):526-30.
64. Goodis HE, Winthrop V, White JM. Pulpal responses to cooling tooth temperatures. *J Endod.* 2000;26(5):263-7.

65. Mavropoulos A, Endal U, Aars H, Brodin P. Effects of mandibular nerve block on heat-or cold-induced changes in pulpal blood flow in man. *Dent Traumatol.* 1995;11(6):284-7.
66. Sano Y, Ikawa M, Sugawara J, Horiuchi H, Mitani H. The effect of continuous intrusive force on human pulpal blood flow. *Eur J Orthod.* 2002;24(2):159-66.
67. Harada K, Sato M, Omura K. Blood-flow and neurosensory changes in the maxillary dental pulp after differing Le Fort I osteotomies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2004;97(1):12-7.
68. Emshoff R, Moschen I, Strobl H. Treatment outcomes of dental injury diagnoses as related to blood flow measurements from teeth. *J Oral Rehabil.* 2008;35(3):209-17.
69. Yanpiset K, Vongsavan N, Sigurdsson A, Trope M. Efficacy of laser Doppler flowmetry for the diagnosis of revascularization of reimplanted immature dog teeth. *Dent Traumatol.* 2001;17(2):63-70.
70. Akpınar KE, Er K, Polat S, Polat NT. Effect of gingiva on laser doppler pulpal blood flow measurements. *J Endod.* 2004;30(3):138-40.
71. Hartmann A, Azerad J, Boucher Y. Environmental effects on laser Doppler pulpal blood-flow measurements in man. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):333-9.
72. Sasano T, Onodera D, Hashimoto K, Iikubo M, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, et al. Possible application of transmitted laser light for the assessment of human pulp vitality. Part 2. Increased laser power for enhanced detection of pulpal blood flow. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):37-41.
73. Norer B, Kranewitter R, Emshoff R. Pulpal blood-flow characteristics of maxillary tooth morphotypes as assessed with laser Doppler flowmetry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;87(1):88-92.
74. Verdickt GM, Abbott PV. Blood flow changes in human dental pulps when capsaicin is applied to the adjacent gingival mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(5):561-5.
75. Pogrel M, Yen CK, Taylor RC. Studies in tooth crown temperature gradients with the use of infrared thermography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;67(5):583-7.
76. Bruno KF, Barletta FB, Felipe WT, Silva JA, de Alencar AHG, Estrela C. Oxygen saturation in the dental pulp of permanent teeth: a critical review. *J Endod.* 2014;40(8):1054-7.
77. Roth D, Herkner H, Schreiber W, Hubmann N, Gamper G, Laggner AN, et al. Accuracy of noninvasive multiwave pulse oximetry compared with carboxyhemoglobin from blood gas analysis in unselected emergency department patients. *Ann Emerg Med.* 2011;58(1):74-9.
78. Brown A, Goldberg M. Surface temperature and temperature gradients of human teeth in situ. *Arch Oral Biol.* 1966;11(10):973-82.
79. Stoops LC, Scott Jr D. Measurement of tooth temperature as a means of determining pulp vitality. *J Endod.* 1976;2(5):141-5.
80. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014;40(12):1932-9.
81. Anderson D, Langeland K, Clark G, Galich J. Diagnostic Criteria for the Treatment of Caries-Induced Pulpitis. *NAVAL DENTAL RESEARCH INST GREAT LAKES IL;* 1981.
82. Rechenberg D-K, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PloS One.* 2016;11(11):e0167289.

83. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
84. Hahn C-L, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.
85. Hahn C-L, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod.* 2007;33(3):213-9.
86. Hahn C-L, Best A. The pulpal origin of immunoglobulins in dentin beneath caries: an immunohistochemical study. *J Endod.* 2006;32(3):178-82.
87. Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod.* 1995;21(3):131-6.
88. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2002;28(1):20-3.
89. Calland JW, Harris SE, Carnes Jr DL. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *J Endod.* 1997;23(8):485-9.
90. Lepinski AM, Hargreaves KM, Goodis HE, Bowles WR. Bradykinin levels in dental pulp by microdialysis. *J Endod.* 2000;26(12):744-7.
91. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J.* 2013;46(6):573-80.
92. Mousavi S, Talebi A, Kianoosh S. Immunohistochemical Assessment of Natural Killer cells in normal and inflamed Dental Pulps. *J Res Med Sci.* 2006;11(2):119-21.
93. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, and transforming growth factor- β 1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod.* 2006;32(9):853-61.
94. Arango SS. Biomarkers for the evaluation of human health risks. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2012;30(1):75-82.
95. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod.* 2017;
96. Paris S, Wolgin M, Kielbassa AM, Pries A, Zakrzewicz A. Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2009;35(4):520-3.
97. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression—part of host defence in pulpitis. *Cytokine.* 2003;22(3-4):84-8.
98. Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(5):527-32.
99. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 β production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* 1997;23(1):39-42.
100. Barkhordar R, Hayashi C, Hussain M. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Dent Traumatol.* 1999;15(1):26-7.
101. Nibali L, Fedele S, D’Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18(3):236-43.
102. Trowbridge HO. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J Endod.* 1990;16(2):54-61.
103. Geraldini S, Li Y, Hogan MM, Tjaderhane LS, Pashley DH, Morgan TA, et al. Inflammatory mediators in fluid extracted from the coronal occlusal dentine of trimmed teeth. *Arch Oral Biol.* 2012;57(3):264-70.

104. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Arch Oral Biol.* 1994;39(3):185-90.
105. Liu F, Hashim NA, Liu Y, Abed MM, Li K. Progress in the production and modification of PVDF membranes. *J Membr Sci.* 2011;375(1-2):1-27.
106. Kang G, Cao Y. Application and modification of poly (vinylidene fluoride)(PVDF) membranes–A review. *J Membr Sci.* 2014;463:145-65.
107. Zehnder M, Rechenberg D-K, Bostanci N, Sisman F, Attin T. Comparison of vehicles to collect dentinal fluid for molecular analysis. *J Dent.* 2014;42(8):1027-32.
108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=biological+marker>.
109. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127(2):117-26.
110. Oliveira CMB de, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):260-5.
111. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27.
112. Tani-Ishii N, Wang C, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Mol Oral Microbiol.* 1995;10(4):213-9.
113. Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 α alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. *J Endod.* 2006;32(3):186-92.
114. Chang Y-C, Yang S-F, Huang F-M, Tai K-W, Hsieh Y-S. Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod.* 2003;29(2):114-7.
115. Shimauchi H, Takayama S, Imai-Tanaka T, Okada H. Balance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions. *J Endod.* 1998;24(2):116-9.
116. Garrido M, Dezerega A, Bordagaray MJ, Reyes M, Vernal R, Melgar-Rodríguez S, et al. C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod.* 2015;41(4):464-9.
117. Jain A, Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: an overview. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2015;5(3):212-8.
118. O'Boskey FJ, Panagakos FS. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J Endod.* 1998;24(1):7-10.
119. Mente J, Petrovic J, Gehrig H, Rampf S, Michel A, Schürz A, et al. A prospective clinical pilot study on the level of matrix metalloproteinase-9 in dental pulpal blood as a marker for the state of inflammation in the pulp tissue. *J Endod.* 2016;42(2):190-7.
120. Angosto MC, Álvarez-Gómez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. En 2010.
121. Shin S-J, Lee J-I, Baek S-H, Lim S-S. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* 2002;28(4):313-5.
122. Zehnder M, Wegehaupt FJ, Attin T. A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation. *J Endod.* 2011;37(1):17-20.
123. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407(6801):242.

124. Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodontol Res.* 1999;34(5):244-50.
125. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor α in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res.* 2002;33(5):482-4.
126. Hall B, Zhang L, Sun Z, Utreras E, Prochazkova M, Cho A, et al. Conditional TNF- α overexpression in the tooth and alveolar bone results in painful pulpitis and osteitis. *J Dent Res.* 2016;95(2):188-95.
127. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235.
128. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Skorska M, Marlicz W, Calabretta B, Pletcher Jr CH, et al. Effect of basic (FGF-2) and acidic (FGF-1) fibroblast growth factors on early haemopoietic cell development. *Br J Haematol.* 1996;93(4):772-82.
129. Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod.* 2013;39(2):228-35.
130. Matsuzaka K, Muramatsu T, Katakura A, Ishihara K, Hashimoto S, Yoshinari M, et al. Changes in the homeostatic mechanism of dental pulp with age: expression of the core-binding factor alpha-1, dentin sialoprotein, vascular endothelial growth factor, and heat shock protein 27 messenger RNAs. *J Endod.* 2008;34(7):818-21.
131. Mattuella LG, Bento LW, de Figueiredo JAP, Nör JE, de Araujo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod.* 2007;33(5):524-30.
132. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod.* 2008;34(7):773-88.
133. Data Sheet "Millidisk® Barrier Filter". Durapore®, Millipore, Bedford, MA.
134. Hosmer Jr DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. Applied logistic regression. Vol. 398. John Wiley & Sons; 2013.
135. Fristad I, Bletsa A, Byers M. Inflammatory nerve responses in the dental pulp. *Endod Top.* 2007;17(1):12-41.
136. Vongsavan N, Matthews B. Some aspects of the use of laser Doppler flow meters for recording tissue blood flow. *Exp Physiol.* 1993;78(1):1-14.
137. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(1):68-73.
138. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Bmj.* 2015;351:h5527.
139. Goldberg M, Farges J-C, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):137-47.
140. Kokkas A, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J.* 2007;40(3):198-203.
141. Karapanou V, Kempuraj D, Theoharides TC. Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis. *J Endod.* 2008;34(2):148-51.

142. Reyes EF, Cejudo AG. 27. Métodos para la cuantificación de proteínas.
143. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit Lett*. 2006;27(8):861-74.
144. D'Souza R, Brown L, Newland J, Levy B, Lachman L. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. *Arch Oral Biol*. 1989;34(5):307-13.
145. Zhang W, Yelick PC. Vital Pulp Therapy—Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization. *Int J Dent [Internet]*. 2010 [citado 24 de junio de 2013];2010:1-9. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ijd/2010/856087/>
146. Jeanneau C, Lundy FT, El Karim IA. Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *J Endod*. 2017;43(9):S17-24.
147. Huang GT-J, Potente AP, Kim J-W, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88(2):214-20.
148. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay F, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015;94(2):241-51.
149. Mazzoni A, Nascimento F, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012;91(5):467-72.
150. Pugin J, Widmer M-C, Kossodo S, Liang C-M, Preas H, Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(3):458-64.
151. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):185-91.
152. Chang Y-C, Chang M-C, Chen Y-J, Liou J-U, Chang H-H, Huang W-L, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Regulates Gene and Protein Expression Related to Proliferation, Differentiation, and Matrix Production of Human Dental Pulp Cells. *J Endod*. 2017;43(6):936-42.
153. Brizuela C, Ormeño A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramírez V, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017;43(11):1776-80.
154. Carrasco PA, Brizuela CI, Rodriguez IA, Muñoz S, Godoy ME, Inostroza C. Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study. *Forensic Sci Int*. 2017;279:251-7.
155. Pinto N, Harnish A, Cabrera C, Andrade C, Druttman T, Brizuela C. An Innovative Regenerative Endodontic Procedure Using Leukocyte and Platelet-rich Fibrin Associated with Apical Surgery: A Case Report. *J Endod*. 2017;43(11):1828-34.

14 ANEXOS

14.1 ANEXO 1. Aprobación de la Comisión Académica de Doctorado.

Universitat Internacional
de Catalunya

Campus Barcelona
Immaculada, 22
08017 Barcelona, Spain
T: +34 932 541 800
www.uic.es




**ESCUELA DE DOCTORADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMUNICADO RESOLUCIÓN SOLICITUD DE ADMISIÓN**

Barcelona, 24 de marzo de 2016

Apreciada Claudia Brizuela,

Por la presente le comunico que, en relación al Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, desde la dirección de la línea de *investigación básica y aplicada en odontología*, de acuerdo a los criterios de valoración de las solicitudes de admisión (integración en la línea de investigación, CV del candidato, trayectoria académica del solicitante y número de plazas disponibles), ha resuelto ADMITIR su solicitud a los estudios de doctorado para el curso 15-16.

 Universitat Internacional
de Catalunya
Escola de Doctorat 

Sònia Soriano
Secretaria Escuela de Doctorado

14.2 ANEXO 2. CER proyecto de tesis.



APROVACIÓ PROJECTE PEL CER/ APROBACIÓN PROYECTO POR EL CER

Codi de l'estudi / Código del estudio: REC-ELB-2018-01
Versió del protocol / Versión del protocolo: 1.0
Data de la versió / Fecha de la versión: 15/04/2018
Títol / Título: Biomarcadores para el diagnóstico molecular de patología pulpar en endodoncia

Sant Cugat del Vallès, 7 de maig de 2018

Investigadora: Claudia Isabel Brizuela Cordero
Director de Tesis: Dra. Montserrat Mercadé Bellido
Tutor: Dr. Lluís Giner Tarrida

Títol de l'estudi / Título del estudio: Biomarcadores para el diagnóstico molecular de patología pulpar en endodoncia

Benvolgut/da,

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, el contingut de la investigació, no implica cap inconvenient relacionat amb la dignitat humana, tracte ètic per als animals ni atempta contra el medi ambient, ni té implicacions econòmiques ni conflicte d'interessos, però **no s'han valorat els aspectes metodològics del projecte de recerca degut a que tal anàlisis correspon a d'altres instàncies.**

Per aquests motius, el Comitè d'Ètica de Recerca, **RESOLT FAVORABLEMENT**, emetre aquest **CERTIFICAT D'APROVACIÓ**, per que pugui ser presentat a les instàncies que així ho requereixin.

Em permeto recordar-li que, si en el procés d'execució es produís algun canvi significatiu en els seus plantejaments, hauria de ser sotmès novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,

Apreciada,

Valorado el proyecto presentado, el CER de la Universidad Internacional de Catalunya, considera que, el contenido de la investigación, no implica ningún inconveniente relacionado con la dignidad humana, trato ético para los animales, ni atenta contra el medio ambiente, ni tiene implicaciones económicas ni conflicto de intereses, pero no se han valorado aspectos metodológicos del proyecto de investigación debido a que tal análisis corresponde a otras instancias.

Por estos motivos, el Comité d'Ètica de Recerca, RESUELVE FAVORABLEMENTE, emitir este CERTIFICADO DE APROBACIÓN, para que pueda ser presentado a las instancias que así lo requieran.

Me permito recordarle que si el proceso de ejecución se produjera algún cambio significativo en sus planteamientos, debería ser sometido nuevamente a la revisión y aprobación del CER.

Atentamente,



Dr. Josep Argemí
President CER-UIC

14.3 ANEXO 3. Carta aceptación incorporación como tutor del Dr. Lluís Guiner.

Universitat Internacional
de Catalunya

Campus Barcelona
Immaculada, 22
08017 Barcelona, Spain
T. +34 932 541 800
www.uic.es

UIC
barcelona

Barcelona, a 30 de junio de 2016

Claudia Brizuela Cordero

Apreciada Claudia:

Por la presente te comunicamos que la Comisión Académica de Doctorado en Ciencias de la Salud ha aprobado la instancia en la que solicitas la incorporación del Dr. Lluís Guiner Tarrida como tutor de tu tesis doctoral.

Atentamente,

Universitat Internacional
Escola de Doctorado
Escola de Doctorat
Universitat Internacional de Catalunya

UIC
barcelona

14.4 ANEXO 4. Carta del departamento de Innovación y Desarrollo (I+D) de la Universidad de los Andes.



Universidad de
los Andes

Santiago, 2 de febrero de 2018

Atención: Universidad Internacional de Catalunya

Mediante la presente solicitamos tengan a bien considerar la autorización para la postergación de la publicación de la tesis "Biomarcadores para el diagnóstico pulpar en endodoncia" de la alumna Claudia Brizuela Cordero.

La tesis de la Sra. Brizuela es objeto de investigación en el marco de un proyecto institucional de la Universidad de los Andes, donde la Sra. Brizuela se desempeña como investigadora y académica de la Facultad de Odontología.

Debido a que necesitamos información más concreta, para cual requerimos la realización de como una mínimo una prueba de concepto y la comprobación de la hipótesis planteada para determinar con mayor certeza el potencial de patentabilidad de la invención, les solicitamos demorar la publicación de la tesis por un periodo de 12 meses.

Entendemos que la publicación, es requisito para la graduación por lo que quisiéramos solicitarles tengan a bien considerar realizar una excepción para que la alumna pueda graduarse sin efectuar la divulgación de su tesis, lo que afectaría la novedad la invención anulando la posibilidad de obtener una patente.

En tal caso, la defensa de la tesis deberá realizarse a puertas cerradas y la tesis deberá permanecer en algún lugar de acceso restringido al público.

Quedamos a la espera de vuestra respuesta.

Cordial saludo,

María Clara Zucchini Ocampo.

Abogado. Magister en Propiedad Intelectual.

Jefe de Propiedad Intelectual. Dirección de Innovación. Universidad de los Andes

14.5 ANEXO 5. Carta aprobación comité de ética Metropolitano Oriente.



Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 06 de Diciembre de 2016, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó definitivamente el Proyecto de Investigación, patrocinado por Universidad de los Andes, titulado:

“Estudio para diagnóstico pulpar y marcadores inflamatorios en jóvenes y adultos de la Comuna de San Bernardo”.

y que conducirá como Investigador Principal la **Dra. Claudia Brizuela Cordero** en el Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral (CIBRO) de la Universidad de Los Andes, ubicada en San Carlos de Apoquindo 2200, Las Condes, RM, Chile y la participación del Centro de Salud de San Bernardo ubicado en Abraham Prado 396, San Bernardo, RM, Chile.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Proyecto:

- Proyecto de Investigación in extenso “Estudio para diagnóstico pulpar y marcadores inflamatorios en jóvenes y adultos de la comuna de San Bernardo”.
- Resumen ejecutivo del proyecto.
- Carta Gant.
- Consentimiento Informado para el estudio “Estudio para diagnóstico pulpar y marcadores inflamatorios en jóvenes y adultos de la comuna de San Bernardo”, fechado por el CEC del S.S.M. Oriente el 06 de Diciembre de 2016.

Tomó conocimiento de:

- Carta dirigida a la Dra. Sara Chernilo de fecha 16 Noviembre 2016. Ref.: Solicitud de revisión proyecto de investigación.
- Autorización del Dr. Renzo Casanova Gianuzzi Jefe Servicio Clínico del Centro de Salud de San Bernardo, de fecha 11 Noviembre 2016.
- CV del Investigador Principal: Dra. Claudia Brizuela Cordero.

14.6 ANEXO 6. Carta aprobación comité de ética Centro de Salud Universidad de los Andes (CESA).



Santiago, 7 de septiembre de 2016

Informe del Comité de Ética Local del Centro de Salud Universidad de los Andes

Dra. Claudia Brizuela Cordero
Investigador principal.

Estimada Dra. Brizuela:

Junto con saludarla cordialmente, le informamos que teniendo en cuenta los antecedentes por Ud. aportados, el Comité de Ética Local del Centro de Salud (CESA) ha revisado el proyecto de investigación titulado: "Biomarcadores para el diagnóstico molecular de patología pulpar en endodoncia" y ha decidido aprobarlo.

Este Comité estima que el tema a tratar es relevante, y que el Consentimiento Informado es adecuado. No se vulneran los derechos de los pacientes. El procedimiento de toma de muestra no afecta el tratamiento en el paciente. Se especifican los objetivos del estudio, se señala la voluntariedad de la participación, la confidencialidad del manejo de la información, además de especificar la manera de ubicar al investigador responsable en caso de ser necesario.

Tomando en cuenta lo anteriormente enunciado, este Comité de Ética Local no presenta reparos éticos en la realización de este proyecto con pacientes del CESA

Sin otro particular, saludan atentamente.

Dr. Francisco Rodríguez Beaumont

Presidente

Dr. Jorge Landeta Parra

Secretario

14.7 ANEXO 7. Carta autorización jefe de servicio CESA.




Universidad de
los Andes

AUTORIZACIÓN ESTABLECIMIENTO

Mediante el presente, el Jefe del Servicio Clínico Odontológico del Centro de Salud de San Bernardo, ubicado en la calle Abraham Prado 396, en la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana, Chile; Dr. Renzo Casanova Gianuzzi, certifica que está informado del proyecto de investigación titulado "Biomarcadores para el diagnóstico molecular de patología pulpar en endodoncia", a cargo de la investigadora principal Dra. Claudia Brizuela Cordero. Este proyecto será realizado en las dependencias del centro.

Se extiende la presente autorización para ser presentada al comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Oriente.


Dr. Renzo Casanova Gianuzzi
Universidad de los Andes
Universidad de los Andes

Otorgado en Santiago, con fecha 11 de noviembre de 2016.

14.8 ANEXO 8. Consentimiento informado.



Universidad de
los Andes

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Estudio para diagnóstico pulpar y marcadores inflamatorios en jóvenes y adultos de la comuna de San Bernardo”.

Usted ha sido seleccionado para participar en una investigación relacionada con marcadores de la inflamación que podrían ayudar a mejorar el diagnóstico pulpar.

¿Cuál es el propósito del estudio?

- El objetivo explorar la relación entre el diagnóstico pulpar y los marcadores inflamatorios.

¿Existen estudios previos en esta materia?

- Pocos estudios han estudiado la relación entre marcadores inflamatorios y diagnóstico pulpar, por lo que este será estudio piloto.

¿Quién puede participar en este estudio? ¿En qué consiste mi participación?

- Los que pueden participar en este estudio son personas entre 14 y 35 años de la Provincia del Maipo, RM, Chile.
- Mi participación consiste en aceptar que tomen una muestra de dentina, líquido exudado de la pulpa dentaria y muestra de pulpa dentaria cuando me realice mi tratamiento endodóntico.

¿Por qué debiera yo considerar mi participación como sujeto de investigación en este estudio?

- Para contribuir al conocimiento del diagnóstico pulpar.

¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Puedo cambiar de opinión o retirarme?

- Su participación es completamente voluntaria y se le dará el tiempo para decidir si quiere o no participar. Tiene plena libertad en todo momento para decidir que no quiere seguir participando en este estudio piloto.

Si decido participar, ¿en qué consisten los controles del seguimiento del tratamiento?

- A todos los pacientes se les realizarán, los tratamientos, exámenes y procedimientos, diagnósticos habituales y necesarios en el centro odontológico de la Universidad de los Andes.

¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que estos se presenten?

- No existen riesgos extras al asociado al tratamiento dental, ya que la toma de muestra no afecta el tratamiento.

¿En que podría este estudio beneficiar a otros?

- Nuestro propósito es mejorar el diagnóstico pulpar para realizar tratamientos más indicados.

14.9 ANEXO 9. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de sensibilidad.



Protocolo pruebas de sensibilidad

Antes de realizar procedimiento de test pulpar hay que tener claro que pieza se analizara y también qué pieza se utilizara como control, en este estudio se utilizara la inmediatamente anterior a pieza a analizar. Ambas deben ser evaluadas radiográficamente para determinar motivo de análisis y también evidenciar que pieza control se encuentre libre de artefactos que puedan alterar la respuesta, tales como caries, enfermedad periodontal, restauraciones muy extensas o perdida de sustancia coronaria. En caso que dicha pieza tenga alguna de estas características descartarla como pieza control y seleccionar pieza anterior a esta.

Importante además que superficie se encuentre limpia y seca.

El siguiente protocolo describe secuencialmente la realización de test de sensibilidad pulpar:

Frío: 1,1, 1, 2- tetrafluoroetano

- Se uso comercialmente Endolce (Refrigerante Endo-Ice de Hygenic, -26, 2°C, ficha anexo 1) con adaptador plástico previamente posicionado
- Se selecciona pieza a tratar y como control se utiliza pieza inmediatamente anterior
- Se aísla de manera relativa con tómulas de algodón en vestíbulo
- Se seca la zona con jeringa triple por 20 segundos
- Se aplica silicona sólida en cara vestibular de pieza a tratar y pieza control
- Se aplica Endo Ice en tórula de algodón por 3 segundos
- Se pone tórula sobre superficie dental en tercio medio de cara vestibular
- Se espera a reacción por parte del paciente y se registran datos
- Si no se observa respuesta luego de 15 segundos se registra como “no responde”

14.10 ANEXO 10. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de vitalidad con láser doppler.

	CIBRO/ Centro de Investigación Biología Regenerativa Oral	SOP # 0001 v.1 Julio 2016
	Standar Operational Procedures	
FLUJOMETRÍA LÁSER DOPPLER		

FLUJOMERÍA LÁSER DOPPLER

TABLA DE CONTENIDOS

Pg

I-	OBJETIVO	1
II-	MARCO TEÓRICO	1
III-	EQUIPAMIENTO	2
IV-	MATERIALES	2
V-	PROCEDIMIENTO	2

First redaction: JULIO 2016		----- APPROVALS -----			
Last revision:	Next revision:	Submitted by Claudia Brizuela Gastón Meza	Approved by		
Are there controlled copies?	Yes	Location: CIBRO		PPP protocol	

I. OBJETIVO

Elaborar un documento, que permita estandarizar la medición de vitalidad pulpar mediante flujometría de láser doppler

II. MARCO TEÓRICO:

La técnica consiste en dirigir el rayo láser de baja energía, por una fibra óptica en la superficie del diente; la luz sigue la dirección de los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios hasta la pulpa. Se refleja cierta luz por el movimiento de los eritrocitos en los capilares pulpaes.

14.11 ANEXO 11. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de las pruebas de sensibilidad.



Protocolo Prueba Histológica

Antes de realizar procedimiento de toma de muestra histológica hay que tener claro que pieza se analizará.

Debe ser evaluada radiográficamente para determinar motivo de análisis y también evidenciar que encuentre libre de artefactos que puedan alterar la respuesta, tales como caries, enfermedad periodontal, restauraciones muy extensas o pérdida de sustancia coronaria. En caso que dicha pieza tenga alguna de estas características descartarla como pieza control y seleccionar pieza anterior a esta.

Importante además que superficie se encuentre limpia y seca.

Materiales:

- Tubos eppendorf estériles con 500µm de formalina
 - Fresas de carbide y diamante nº6 estériles
 - Limas endodónticas estériles finas
 - Extractores pulpares blanco-amarillo-rojo-azul-verde-negro
 - Suero fisiológico
 - Jeringa de irrigación estériles
1. Explicar claramente al paciente el tratamiento, resolver dudas y firmar consentimiento
 2. Realizar pruebas endodónticas de sensibilidad pulpar y vitalidad pulpar para confirmar diagnostico pulpar
 3. Confirmar radiográficamente y análisis de anatomía dental
 4. Realizar técnica anestésica correspondiente al caso
 5. Realizar aislamiento absoluto con goma dique. Sellar margen con opaldam en caso de ser necesario
 6. Seleccionar el punto de inicio en cavidad de acceso
 7. Con fresa de diamante nº 6 de alta velocidad realizar primera parte de cavidad de acceso en esmalte
 8. Eliminación de caries y restauraciones pre existentes
 9. Al llegar a dentina cambiar a fresa de carbide
 10. Realizar toma de muestra de exudado dentinario
 11. Seguir cavidad de acceso hasta lograr comunicación y realizar destechamiento
 12. Realizar irrigación con suero fisiológico
 13. Con limas endodónticas o extractores pulpares (color y diámetro adecuado al caso) sacar contenido pulpar
 14. Limpiar pulpa hemorrágica con suero
 15. Depositarla rápidamente en tubo eppendorf de 1.5ml estériles con 500µm de formalina
 16. Continuar con tratamiento endodóntico

14.12 ANEXO 12. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) de toma de muestra de Micro BCA.

Universidad de los Andes	CIBRO/ Centro de Investigación Biología Regenerativa Oral	SOP # 0001 v.1
	Standar Operational Procedures (SOPS)	ENERO 2017
MICRO BCA™		

INDICE

I. DESCRIPCIÓN	2
II. ESPECIFICACIONES	2
III. Características	2
IV. OBJETIVO:	3
V. MATERIALES:	3
VI. ALMACENAMIENTO	3
VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	4

14.13 ANEXO 13. Procedimiento Operativo Estándar (SOPS) toma de fluido dentinario.



Protocolo toma de muestra de fluido dentinario

Una vez identificado al paciente y seleccionada pieza a investigar y cumpliendo los criterios de inclusión de este estudio y firmado el consentimiento informado se realiza la toma de muestra de fluido dentinario para efectos de este estudio. El fluido dentinario a analizar fue de dentina afectada, la cual se define como la capa de dentina afectada por caries con desnaturalización de ésta en forma reversible. Es una dentina remineralizable y contiene poca cantidad de bacterias, encontrándose sensible y vital. Se aloja en los túbulos dentinarios y su composición incluye mediadores inflamatorios y compuestos vasoactivos asociados con la inflamación. Para la toma de muestra se deben seguir lo siguientes pasos:

- Se debe remover las restauraciones existentes y preparar una cavidad en dentina profunda. Se realiza el procedimiento clínico utilizando magnificación con lupas con un aumento de 3.5X y a una distancia de trabajo de 400 mm (EyeMag Modelo Pro F; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).
- Se utiliza anestesia (Clorhidrato de lidocaína al 2% con epinefrina 1: 80,000; Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Francia) con técnica infiltrativa o troncular según sea el caso.
- Se eliminan las restauraciones antiguas, caries o dentina infectada con turbina y fresas nuevas de alta velocidad de distintos tamaños (Kerr Beavers Dental, Morrisburg, Canadá), dejando expuesta dentina dura o tipo cuero (dentina afectada).
- Se aísla el diente de manera absoluta utilizando dique de goma (Hygienic; Coltene/Whaledent AG) y clamps adecuados, además se utilizó barrera de protección gingival (OpalDam® SDS) para lograr un mejor sellado marginal y evitar posibilidades de contaminación de la toma de muestra.
- Se desinfecta el dique de goma con gasa con alcohol al 70%.

14.14 ANEXO 14. Adjudicación PMI.

CONVENIO DE ADJUDICACIÓN "CUARTO CONCURSO PMI DE INNOVACIÓN" ENTRE

CLAUDIA BRIZUELA
Y
DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN

En Santiago de Chile, a 31 de Julio de 2017, entre la Dirección de Innovación de la Universidad de los Andes, representada para estos efectos por su Subdirector de Desarrollo y Comercialización, Sr. Anil Sadarangani, y por la Sra. Jazmín Jadue, Directora alterna del PMI y Claudia Brizuela, profesor/investigador de Facultad de Odontología, beneficiado con el Cuarto Concurso PMI de Innovación 2017, para acelerar la innovación basada en investigación aplicada en el ámbito del PMI de Innovación y financiar el proyecto de investigación: "Determinación no invasiva de biomarcadores moleculares para el diagnóstico temprano de patología pulpar."

Considerando

1-Que con el objeto de acelerar la innovación basada en investigación aplicada en la UANDES, a partir del financiamiento de actividades que permitan fortalecer la Propiedad Intelectual y mejorar la competitividad de las propuestas a financiar mediante fondos públicos la Universidad de los Andes ha lanzado su "Cuarto Concurso PMI de Innovación" con el que se propone financiar a los académicos/investigadores de la UANDES, interesados en llevar a cabo investigación aplicada en el ámbito del PMI de Innovación con el propósito de solventar el desarrollo de pruebas a la mínima escala posible, que permitan una validación de resultados y su posterior protección.

2- Que él investigador ha presentado su proyecto al "Cuarto Concurso PMI de Innovación" y ha sido seleccionado, adjudicándose el financiamiento solicitando en la postulación realizada con fecha Viernes 14 de Octubre de 2016.

En razón de todo ello, las Partes convienen celebrar el presente acuerdo, que se regirá por los siguientes artículos:

Artículo 1. Objeto

Seleccionar una solución tecnológica que permita resolver un problema, desafío u oportunidad, desarrollar para la solución seleccionada, pruebas de concepto que logren disminuir la incertidumbre tecnológica de la iniciativa y desarrollar una estrategia conjunta entre PMI, el investigador y la empresa, de gestión de propiedad intelectual, comercialización y transferencia de la solución tecnológica.

Artículo 2. Monto financiado

La Dirección de Innovación se compromete a asignar la cantidad máxima de CLP \$8.600.000 para el financiamiento del proyecto a ser desarrollado en un plazo máximo de seis meses desde el hito de inicio del proyecto, correspondiente a la recepción de los insumos/reactivos y/o fungibles indicados en el formulario de proyecto. Estos fondos deberán ser utilizados conforme se establece en el plan de trabajo, presupuesto y carta Gantt que figuran en el Anexo A y que son parte integrante del presente convenio. La fecha máxima de envío de solicitud de compras es el 30 de septiembre de 2017.

Todo cambio en los documentos mencionados deberá ser informado y autorizado por la Dirección.

14.15 ANEXO 15. Resumen IADR 2016.

Cytokines as biomarkers in irreversible symptomatic pulpitis

Claudia Brizuela ¹, Carolina Inostroza ¹, Gastón Meza* ¹, Nicole Saint-Jean ¹, Carlos Briceño¹, Montserrat Mercadé ².

¹ Faculty of Dentistry, University of los Andes, Santiago Chile.

² Faculty of Dentistry, University International of Catalunya, Barcelona España.

AIM: evaluate proteins levels as biomarkers from human exudate pulpar of teeth diagnosed with irreversible symptomatic pulpitis in comparison with samples from normal pulp.

METHODOLOGY: Exudate was obtained from pulp exposure sites using paper points. 21 samples were obtained from teeth diagnosed with normal pulp and 43 from irreversible symptomatic pulpitis teeth. Total protein concentration were analyzed with Micro BCA Assay kit and cytokines levels were determinate by high sensitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Data were statistically analyzed using test Wilcoxon rank-sum.

RESULTS: Preliminary results shows that the total concentration of protein were between 11 y 70ug/ml. Significantly high levels ($P=0,01$) of IL-6 were detected in pulpal exudates from irreversible symptomatic pulpitis teeth as compared to normal pulp teeth. Levels of IL-1beta were higher in pulpal exudates from irreversible symptomatic pulpitis teeth as compared to normal pulp teeth, with no significant difference ($P=0,06$).

CONCLUSION: IL-6 could be a potential biomarker for determining the pulpal inflammation from teeth with irreversible symptomatic pulpitis diagnosis. Future studies are required to evaluate a broader panel of cytokines.

14.16 ANEXO 16. Presentación Bruselas 2017.

European Society of Endodontology

This is to certify that

Mrs Claudia Brizuela

attended the Biennial Congress held in Brussels
14th - 16th September 2017
and received 19 hours of Continuing Professional Development



Professor Claus Löst
ESE President



Professor Paul Dummer
ESE Secretary



Certificate id: e02d7aa86c9e6f21042f12a937730280



ESE
2017
BRUSSELS
14 TO 16 SEPTEMBER



**ROOTED IN
THE HEART
OF EUROPE**

**ESE Wladimir Adlivankine Research Prize,
Education Prize
and Original Research Abstracts**

18th ESE Biennial Congress
Brussels, Belgium
14th-16th September 2017

14.18 ANEXO 18. Presentación Universidad Diego Portales (UDP).

udp Escuela de Odontología
FACULTAD DE SALUD Y ODONTOLÓGIA



Santiago, 15 de Mayo de 2017

Dra. **Claudia Brizuela Cordero**
Docente U. De los Andes.

Mediante la presente, le hacemos llegar una cordial invitación a participar en calidad de **Expositora** en la Iera Jornada de Endodoncia UDP, a llevarse a cabo el día viernes 09 de Junio de 2017, organizada por la Sociedad Científica de Estudiantes de Odontología de la Universidad Diego Portales.

Esperando contar con su valiosa presencia,
se despide

Ibar Villalobos Fuenzalida
Presidente
SOCEO UDP 2017

14.19 ANEXO 19. Presentación jornadas Universidad de los Andes 2016.



XIV JORNADAS CIENTÍFICAS INTERNACIONAL "Caries, La Enfermedad, La Lesión y su Manejo Clínico"

Programa día 1: Jueves 29 de septiembre 2016		
Lugar: Aula Magna Edificio Biblioteca / traducción simultánea		
Hora	Actividad/Tema	Expositor
8.30 - 9:00	Registro de los participantes.	
9:00 - 9:15	Bienvenida.	Dr. José Antonio Giménez Decano Facultad de Odontología - Universidad de los Andes.
Curso Internacional		
9:15 - 10:30	Comprendiendo el rol del <i>biofilm</i> dental en la caries	Dra. Bente Nyvad. Universidad de Aarhus, Dinamarca.
10:30 - 11:00	Café	
11:00 - 11:45	Detección de caries visual-táctil : "The Nyvad method".	Dra. Bente Nyvad Universidad de Aarhus, Dinamarca.
11:45 - 12:30	Control de caries en la práctica clínica.	
12:30 - 13:00	Preguntas.	
13:00 - 15:00	Horario para almuerzo	
Conferencias y discusión		
15:00 - 15:20	¿Son los probióticos una alternativa para el control o prevención de caries?	Dr. Gonzalo Rodríguez. Universidad de Chile.
15:20 - 15:30	Preguntas.	
15:30 - 15:50	Estrategias para el control de caries en el adulto mayor.	Dr. Rodrigo Giacaman. Universidad de Talca.
15:50 - 16:00	Preguntas.	
16:00 - 16:20	Relación entre detección visual e imagen radiográfica, su impacto en la decisión de restaurar o no restaurar.	Dr. Iván Urzúa. Universidad del Desarrollo, Universidad de Chile.
16:20 - 16:30	Preguntas.	
16:30 - 16:45	Comentarios.	Dra. Bente Nyvad. Universidad de Aarhus, Dinamarca.
16:45 - 17:15	Café.	
17:15 - 17:35	Decisiones de tratamiento en el manejo de lesiones de caries.	Dr. Rodrigo Cabello. Universidad de Chile, Universidad Diego Portales, Universidad del Desarrollo.
17:35 - 17:45	Preguntas.	
17:45 - 18:05	Tratamiento de lesiones proximales utilizando sellantes y/o infiltrantes versus tratamiento no operatorio.	Dr. Sergio Gómez. Universidad de Valparaíso.
18:05 - 18:15	Preguntas de los asistentes.	
18:15 - 18:30	Comentarios finales.	Dra. Bente Nyvad. Universidad de Aarhus, Dinamarca.

14.20 ANEXO 20. Resumen IADR 2017.

CONTROL ID: 2813196

TITLE: DETERMINATION OF PROTEIN CONCENTRATION IN DENTINAL FLUID SAMPLES IN TEETH WITH REVERSIBLE PULPITIS AND IRREVERSIBLE PULPITIS

Objectives: To determine the concentration of proteins in samples of dentinal fluid in teeth with reversible pulpitis and irreversible pulpitis.

Methods: 16 patients who met inclusion and exclusion criteria were recruited. Patients signed informed consent. They were separated in 2 groups; Reversible pulpitis (n=6) and irreversible pulpitis (n=10). The samples were obtained after caries removal, using Durapore® a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). They were stored at -80⁰ C until were processed. Samples were eluted with 350 uL 1:PBS1X Buffer plus 0.1% Tween 20 detergent and analyzed using Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). The results were analyzed estimating a logistic regression (Stata 14.2).

Results: Descriptively, proteins concentration level on reversible pulpitis group was 3.67 ug / mL (standard deviation [SD]: 2.96) and concentration on irreversible pulpitis group was 19.42 ug / mL (SD: 19.1). There were no association between concentration level and presence of irreversible pulpitis (OR=1.15; p = 0.165). The area under ROC curve was 0.73.

Conclusions: It is possible to find proteins in samples of dentinal fluid in teeth with reversible pulpitis and irreversible pulpitis diagnoses, using Durapore®. The level of proteins concentration was higher on irreversible group but not statistical significant. It is necessary to determine which proteins are present in the different diagnoses and explore with more sample size the relationship between level and diagnosis.

AUTHORS (FIRST NAME INITIAL LAST NAME): C. Briceño¹, C. Inostroza¹, G. Meza¹, I. Bravo¹, L. Castrillón¹, M. Mercadé⁴, A. Chaparro², V. Ramírez³, O. Ramírez³, C. Brizuela¹

INSTITUTIONS (ALL):

1. Endodontic, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.
2. periodonctics, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.
3. Universidad de los Andes, Santiago, Chile.
4. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

PRESENTER: Ignacia Bravo

PRESENTER (EMAIL ONLY): ignacia.bravo@gmail.com

PREFERRED PRESENTATION TYPE: Poster

Support: No

Support Funding Agency/Grant Number: (none)

AWARDS:

TABLE TITLE: (No Tables)

(no table selected)

(No Image Selected)

Declaration of Helsinki of the World Medical Association Compliance: Declaration of Helsinki of the World Medical Association Compliance

Financial Interest Disclosure - Account create: Carlos Briceño: No Answer. | Carolina Inostroza: No Answer. | Gaston Meza: No Answer. | Ignacia Bravo: No Answer. | Luis Castrillón: No Answer. | Montse Mercadé: No Answer. | Alejandra Chaparro: No Answer. | Valeria Ramírez: No Answer. | Ornella Ramírez: No Answer. | Claudia Brizuela: No Answer.

First Publishing/Presentation : First Publishing/Presentation Confirmation

Permission to Publish: Permission to Publish

Pre-Registration: Pre-Registration

Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial

Claudia Brizuela, DDS, MS, PhD,* Andrea Ormeño, DDS, MS, PhD,* Carolina Cabrera, DDS,* Roxana Cabezas, DDS, MS,* Carolina Inostroza Silva, BS, MS, PhD,* Valeria Ramírez, DDS, MS,* and Montse Mercade, DDS, MS, PhD[†]

Abstract

Introduction: Direct pulp capping treatment is intended to preserve pulp vitality, to avoid or retard root canal treatment, and, in cases with an open apex, to allow continued root development. Historically, calcium hydroxide (CH) was the gold standard material, but nowadays calcium silicate materials (CSMs) are displacing CH because of their high bioactivity, biocompatibility, sealing ability, and mechanical properties. However, more randomized clinical trials are needed to confirm the appropriateness of CSMs as replacement materials for CH in direct pulp capping procedures. **Methods:** A randomized clinical trial was conducted that included 169 patients (mean age, 11.3 years) from the Maipo district (Chile). The inclusion criterion was patients with 1 carious permanent tooth with pulpal exposure, a candidate for a direct pulp capping procedure. The patients were randomly allocated to one of the experimental groups (CH, Biodentine, or mineral trioxide aggregate [MTA]). Clinical follow-up examinations were performed at 1 week, 3 months, 6 months, and 1 year. The Fisher exact test was performed. **Results:** At the follow-up examination at 1 week, the patients showed 100% clinical success. At 3 months, there was 1 failure in the CH group. At 6 months, there were 4 new failures (1 in the CH group and 3 in the MTA group). At 1 year, there was another failure in the CH group. There were no statistically significant differences among the experimental groups. **Conclusions:** CSMs appear to be suitable materials to replace CH. Although no significant differences were found among the materials studied, Biodentine and MTA offered some advantages over CH. (*J Endod* 2017; ■:1–5)

Key Words

Biodentine, calcium hydroxide, direct pulp capping, mineral trioxide aggregate, randomized clinical trial

Treatment of pulpal exposure in permanent teeth is a challenge for clinicians. Traumatic injuries, anatomic anomalies, and extensive caries can cause inflammation of the pulp and arrested root development. Different strategies have been used for vital pulp therapy; these are indirect or direct pulp capping and pulpotomy. The main goal of vital pulp therapy is to preserve pulpal tissue, remove tissue that is contaminated by bacteria, and promote repair of the mineralized tissue barrier (dentin bridge). Direct pulp capping is a procedure wherein a small exposure of pulp is covered with a protective wound dressing (1). This treatment is intended to avoid future root canal treatment or at least postpone it until root formation is complete (2).

Numerous materials have been used throughout the years for pulp capping. Calcium hydroxide (CH) has been the gold standard in recent decades (3–5); however, calcium silicate materials (CSMs) have been used in more and more clinical applications since their development. Calcium hydroxide has some obvious drawbacks, including inflammation and necrosis of the pulp surface after pulp capping, high solubility in oral fluids, degradation over time, the formation of tunnel defects inside the dentin bridge, and low mechanical resistance, which might cause future microfiltration and failure of the treatment (6–9).

Mineral trioxide aggregate (MTA) was the first CSM to be marketed. Since its approval by the Food and Drug Administration in 1998, it has been used with increasing frequency, with very good clinical and *in vitro* results (10–12). In a systematic review with a meta-analysis that compared the effectiveness of MTA and CH as pulp capping materials in permanent human teeth, the conclusion was that MTA has a higher success rate and results in less pulpal inflammation and more predictable formation of a hard dentin bridge than CH (13). This conclusion demonstrates that MTA is a suitable material for direct pulp capping procedures and argues against the continuing recommendation of CH as the gold standard for such treatments. However, as the first CSM, MTA

Significance

This is the first clinical trial to compare the efficacy of the most frequently used and reported material for direct pulp capping in permanent teeth (CH) versus the new CSMs (MTA and Biodentine).

From the *Dental School, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile; and [†]Dental School, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
Address requests for reprints to Dr Claudia Brizuela, Universidad de los Andes, Facultad de Odontología, Av. Monseñor Álvaro del Portillo 12.455, Las Condes, Santiago, Chile. E-mail address: clau@cibrizuela.com
0099-2399/\$ - see front matter
Copyright © 2017 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.031>

14.22 ANEXO 22. Ficha registro pacientes.

HOJA DE REGISTRO INVESTIGACIÓN BIOMARCADORES

Nombre del paciente: _____

Edad: _____ Fono: _____ Mail: _____

Fecha de nacimiento: _____

Fecha toma de muestra: ___/___/_____ RUT: _____

Piso: _____ Box: _____

Alumno encargado de paciente: _____

Diente	Prueba de Frío		Prueba de Calor		Prueba Eléctrica	
	EVA	Segundos	EVA	Segundos	Intensidad	Segundos
Diente experimental						
Diente Control						

Diagnostico pulpar: _____

Escala de sintomatología: _____

Número de enrolamiento: _____ (3 últimos dígitos más el guion)

Nombre de persona que toma la muestra: _____

TABLA INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS

DIAGNÓSTICO	PRUEBA FRÍO	PRUEBA CALOR	PERCUSIÓN	RADIOGRAFÍA
Pulpa Normal	Normal ¹	Normal ¹	Responde normal	Ligamento periodontal normal
Pulpitis Reversible	Aumentado en intensidad, pero no en duración	Aumentado en intensidad, pero no en duración	Responde normal	Ligamento periodontal normal
Pulpitis Irreversible Sintomática	Aumentado en intensidad y en duración	Aumentado en intensidad y en duración	Puede estar aumentado en intensidad	Ligamento periodontal normal o engrosado
Pulpitis irreversible asintomática	Normal o disminuida en tiempo en intensidad	Normal o disminuida en tiempo en intensidad	Puede no responder o estar levemente aumentada	Ligamento periodontal normal o engrosado.
Necrosis Pulpar	No responde	No responde	No responde	Ligamento periodontal normal
Periodontitis apical sintomática	No responde	No responde	Aumentado en intensidad	Ligamento periodontal normal, engrosado o ausente por lesión periapical.

¹Normal: Las pruebas térmicas de sensibilidad endodóntica producen en las pulpas normales, una respuesta positiva, que es leve, y cesa casi inmediatamente después de retirar el estímulo.

14.23 ANEXO 23. Paper Forense.

Accepted Manuscript

Title: Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study

Authors: Patricio A. Carrasco, Claudia I. Brizuela, Ismael A. Rodriguez, Samuel Muñoz, Marianela E. Godoy, Carolina Inostroza



PII: S0379-0738(17)30343-2
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.001>
Reference: FSI 8977

To appear in: *FSI*

Received date: 22-3-2017
Accepted date: 1-9-2017

Please cite this article as: Patricio A.Carrasco, Claudia I.Brizuela, Ismael A.Rodriguez, Samuel Muñoz, Marianela E.Godoy, Carolina Inostroza, Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study, Forensic Science International <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.001>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

An Innovative Regenerative Endodontic Procedure Using Leukocyte and Platelet-rich Fibrin Associated with Apical Surgery: A Case Report

Nelson Pinto, MSc,^{*†} Alexandra Harnish, MSc,[†] Carolina Cabrera, MSc,[†]
Catherine Andrade, MSc,^{*} Tony Druttman, MSc,[‡] and Claudia Brizuela, MSc[‡]

Abstract

Regenerative endodontic procedures (REPs) associated with apical surgery could represent an alternative treatment strategy for patients whose teeth present incomplete root formation and extensive apical lesions. Leukocyte platelet-rich fibrin (L-PRF) has potential benefits in REPs; it could promote apical root formation and optimal bone healing. The aim of this case report was to describe innovative regenerative endodontic therapy using L-PRF in the root canal and an extensive apical lesion in an immature tooth with dens invaginatus and asymptomatic apical periodontitis. A healthy 20-year-old woman was referred to the dental clinic of the Universidad de Los Andes, Santiago, Chile, for endodontic treatment in tooth # 22 with incomplete root development and an extensive apical lesion. The diagnosis was asymptomatic apical periodontitis associated with dens invaginatus type II. The patient was treated with an innovative approach using L-PRF in REPs associated with apical surgery. Follow-ups were performed at 6 months and 1 year later. They included periapical radiographs, cone-beam computed tomographic imaging, sensitivity, and vitality tests. The clinical evaluations performed at 6 months and 1 year revealed an absence of symptoms. The radiographic evaluations showed that the apical lesion was resolved. The cone-beam images indicated that the root length increased and the walls had thickened. The sensitivity tests were positive, and the laser Doppler flowmetry showed positive blood flow after 1 year. The success of the results in this case report indicate that L-PRF can be used as a complement in apical surgery and REPs and could provide an innovative alternative treatment strategy for complex clinical cases like these. (*J Endod* 2017; ■:1–7)

Key Words

Dens in dente, endodontics, guided tissue regeneration, platelet-rich plasma

Teeth with incomplete root formation, thin dentin walls, and extensive apical lesions are usually a clinical problem of interest for dentists. In such scenarios, mechanical preparation of the root canal using conventional endodontic treatment may further

weaken the thin dentinal walls and increase the risk of tooth fracture (1). In addition, clinicians are unable to completely remove microorganisms because of the widened root canal (2). A good apical seal is difficult, and the filling material presents a high probability of extrusion (3). Even the apexification procedure cannot promote complete root formation, which is a desirable end point for this condition (4). On the other hand, regenerative endodontic procedures (REPs) could be a better solution; these are defined as biologically based procedures designed to replace damaged structures, with live viable tissues that preferably have the same origin and restore the normal physiological functions of the pulp-dentin complex (5, 6). Diogenes et al (7) found that dens evaginatus and dens invaginatus are the second most common etiology of pulp necrosis in immature teeth. REPs are based on 3 principles of bioengineering: mesenchymal stem cells (MSCs), scaffolds, and growth factors (6). MSCs are located in the apical papilla and migrate into the root canal, blood clots or fibrin are the scaffold to promote stem cell proliferation, and growth factors are proteins located in dentin walls and the matrix; they can promote MSC proliferation and differentiation (7). Currently, an increased understanding regarding the use of autologous platelet concentrates and their role in healing processes has led to the development of new approaches in different fields of dentistry. In particular, leukocyte platelet-rich fibrin (L-PRF) has several properties that could be positive for REPs, including its capacity to behave as scaffolds, provide growth and chemotactic factors, and induce different cells (8).

Significance

This case report supports scientific knowledge as a unique treatment approach using a regenerative endodontic procedure using leukocyte and platelet-rich fibrin associated with apical surgery. Therefore, it could promote new studies in order to support the results obtained and have a higher level of scientific evidence.

From the ^{*}Doctoral Training in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium; [†]Department of Periodontics and Implantology, Universidad de Los Andes, Las Condes, Santiago, Chile; and [‡]Private Practice, London, UK.

Address requests for reprints to Dr Claudia Brizuela, Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Universidad de Los Andes, Monseñor Álvaro del Portillo 12455, Las Condes, Santiago, Chile. E-mail address: clau@cibrizuela.com
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2017 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.002>



Original Article

Gingival Mesenchymal Stem Cells Outperform Haploidentical Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation Rate, Migration Ability, and Angiogenic Potential

Ioannis Angelopoulos^{1,2}, Claudia Brizuela³,
and Maroun Khoury^{1,2,4}

Cell Transplantation
1–12
© The Author(s) 2018
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0963689718759649
journals.sagepub.com/home/ctj

Abstract

High donor variation makes comparison studies between different dental sources dubious. Dental tissues offer a rare opportunity for comparing the biological characteristics of haploidentical mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the same donor. The objective was to identify the optimal dental source of MSCs through a biological and functional comparison of haploidentical MSCs from gingival (GMSCs) and dental pulp stem cells (DPSCs) focusing mainly on their angiogenic potential. The comparison study included (1) surface markers expression, (2) mesodermal differentiation capacity (chondrogenic, adipogenic, and osteogenic), (3) proliferation, (4) migration potential, (5) ability to form colony units, and (6) angiogenic potential *in vitro* and *in vivo*. Comparative analysis showed no difference in the immunophenotypic profile nor for the trilineage differentiation potential. Proliferation of GMSCs was higher than DPSCs at day 6 (2.6-fold higher, $P < 0.05$). GMSCs showed superior migratory capacity compared to DPSCs at 4, 8, and 12 h (2.1-, 1.5-, and 1.2-fold higher, respectively, $P < 0.05$). Furthermore, GMSCs formed a higher number of colony units for both cell concentrations (1.7- and 1.4-fold higher for 150 and 250 starting cells, respectively, $P < 0.05$). GMSCs showed an improved angiogenic capacity compared to DPSCs (total tube lengths 1.17-fold higher and 1.5-fold total loops, $P < 0.05$). This was correlated with an enhanced release of vascular growth factor under hypoxic conditions. Finally, in the plug transplantation assay evaluating the angiogenesis *in vivo*, the DPSC and GMSC hemoglobin content was 3.9- and 4-fold higher, respectively, when compared to the control (Matrigel alone). GMSCs were superior to their haploidentical DPSCs in proliferation, migration, and angiogenic potentials. This study positions GMSCs in the forefront of dental cell sources for applications in regenerative medicine.

Keywords

haploidentical, dental and gingival mesenchymal stem cells, migration, angiogenesis

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) hold great promise for revolutionizing the dental regeneration field^{1–3}. They can be derived from the bone marrow (BM)⁴, the adipose tissue⁵, the dental pulp⁶, the gingival tissue⁷, or the periodontal ligament (PDL)^{2,8}. MSCs are pluripotent cells that have the ability to differentiate into different type of cells (osteogenic, chondrogenic, and adipogenic)^{9–12}. Despite the various sources of MSCs, the bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) has been considered the gold standard and used extensively in cell therapy applications. One of the major drawbacks is the high invasiveness and low yield of their harvesting, making access to a large volume of BM from healthy donors very difficult^{13–15}.

¹ Laboratory of Nano-Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile

² Consorcio Regenero, Chilean Consortium for Regenerative Medicine, Santiago, Chile

³ Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral (CIBRO), Faculty of Dentistry, Universidad de los Andes, Chile

⁴ Cells for Cells, Santiago, Chile

Submitted: January 20, 2017. Revised: September 20, 2017. Accepted: September 25, 2017.

Corresponding Author:

Maroun Khoury, Laboratory of Nano-Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de Los Andes and Cells for Cells, Santiago Chile.
Email: mkhoury@uandes.cl



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

14.26 ANEXO 26. Tabla Histología.

Pulpitis Irreversible				Pulpa Normal			
Número de muestra	Identificación de las Muestra	Coincidencia en número	Coincidencia en %	Número de muestra	Identificación de las Muestra	Coincidencia en número	Coincidencia en %
1	9948	Eliminada		1	9127	1	
2	8110	1		2	8343	1	
3	7876	1		3	8130	2	
4	7734	1		4	7926	1	
5	7674	1		5	7779	1	
6	7228	2		6	7241	1	
7	6781	1		7	6948	1	
8	6329	1		8	6443	1	
9	6631	1					
10	6206	1					



**II JORNADAS
CIENTÍFICAS
EN SALUD**



Universidad de
los Andes