



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

**Propiedades del Hipoclorito de Sodio y EDTA sobre la dentina, en
procesos endodonticos regenerativos.**

(Revisión Bibliográfica)

Autor: Andreina Curiel

Tutor: Diana Dorta

Valencia Junio 2019



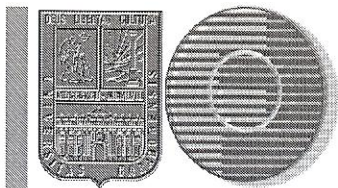
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

**Propiedades del Hipoclorito de Sodio y EDTA sobre la dentina, en
procesos endodonticos regenerativos.**

(Revisión Bibliográfica)

Proyecto de Investigación presentado por Od. Andreina Curiel,
titular de la C.I. V-18.747.585, como credencial de mérito para optar
al título de Especialista en Endodoncia.

Valencia Junio 2019



ACTA DE DISCUSION TRABAJO DE ESPECIALIZACION

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127,128,137,138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado Designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Odontología, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Especialización titulado:

"PROPIEDADES DEL HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE LA DENTINA, EN PROCESOS ENDODONTICOS REGENERATIVOS"

Presentado para optar al grado de **ESPECIALISTA en ENDODONCIA** por el (la) aspirante:

CURIEL A., ADREINA B.
C.I. V.- 18.747.585

Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO.**

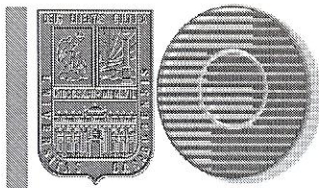
En Valencia, a los tres días del mes de Octubre del año dos mil diecinueve.

Prof. **LILIANA C. JIMENEZ A.**
C.I. **7097433**
Fecha: **03-10-2019**

Prof. **DIANA DORTA**
C.I.: **12606219**
Fecha: **03/10/2019**
03/10/2019 /Vg.



Prof. **YOMINSIMAR CARPAVIRE**
C.I.: **V-11.116.413**
Fecha: **03-10-2019**



MENCION HONORIFICA

El día de hoy, Tres (3) del mes de Octubre del año dos mil diecinueve a las 10:30 Am reunidos en _____ de la Universidad de Carabobo, se reunió el Jurado integrado por **LILIANA C., JIMENEZ A.**; titular de cedula de identidad numero 7.047.433 (en calidad de Presidente del jurado), **DIANA DORTA** titular de cedula de identidad numero 12.606.219 y **YOMINSIMAR CARPAVIRE**; titular de cedula de identidad numero V-11.116.417 (en calidad de miembros del Jurado) para evaluar el Trabajo Especial de Grado Titulado **"PROPIEDADES DEL HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE LA DENTINA EN PROCESOS ENDODONTICOS REGENERATIVOS"** presentado por el (la) Odontólogo **CURIEL A., ANDREINA B.**, titular de la cédula de identidad No. **18.747.585**, como requisito para optar al grado de **ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**.

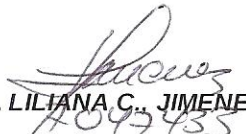
Realizada como fue el caso la presentación del Trabajo Especial de Grado titulado **"PROPIEDADES DEL HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA SOBRE LA DENTINA EN PROCESOS ENDODONTICOS REGENERATIVOS"** de acuerdo con el reglamento de Postgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, se da fe que el Trabajo presentado reúne los requisitos para ser **APROBADA** con **MENCION HONORIFICA**.

Los integrantes de este Jurado, hacemos constar que dicho Trabajo Especial de Grado, reúne plenamente, a nuestro juicio, las condiciones señaladas en los Artículos 4 y 5 de dichas normas, por cuanto satisface los criterios en ellos señalados, y en consecuencia se determina:

- 1.- La consistencia argumental del trabajo cumple las exigencias del nivel de Especialización en el cual se discute.
- 2.- Se evidencia en toda la estructura del Trabajo, el dominio de los métodos empleados que sirven de soporte al Trabajo Especial de Grado y la consolidan como una investigación de proyección científica relevante.
- 3.- El trabajo, producto de un estudio individual y con una temática original, constituye un aporte al conocimiento inédito y novedoso, lo cual amplía y satisface la Academia en la Magna Universidad de Carabobo.
- 4.- La amplitud bibliográfica y su profundidad son un autentico soporte para el discurso desarrollado y transitado por el investigador.

En Bárbula, firmamos conforme.


Prof. DIANA DORTA
C.I. 12606219


Prof. LILIANA C., JIMENEZ A.
C.I. 7047433




Prof. YOMINSIMAR CARPAVIRE
C.I. V-11.116.417



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

Constancia de Culminación

En mi carácter de tutor de contenido del trabajo especial de grado titulado **Propiedades de las sustancias irrigadoras (Hipoclorito de Sodio y EDTA) en los procesos de regeneración endodóntica, su eficacia, beneficios y desventajas sobre la dentina.(Revisión Bibliográfica)**, presentado por la ciudadana Andreina B. Curiel A., titular de la CI 18.747.585, como requerimiento para optar al título de Especialista en Endodoncia, considero que dicho trabajo fue realizado bajo rigor metodológico, y reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a consideración, presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe. En la ciudad de Valencia, a los 8 días del mes de Agosto 2019.

Diana Dorta
CI:12.606.219
Od. Especialista en Endodoncia

DEDICATORIA

A mi familia por apoyar el resultado final
de lo que inició solo siendo una idea, por la certeza
con la que creen en todos mis proyectos.

Agradecimientos

A Dios por darme la persistencia de trazar metas y lograr objetivos.

A mi familia por motivarme constantemente a culminar todo propósito.

A Juan por mantenerse firme, a mi lado, apoyándome siempre contra todo pronóstico.

A mi profesora Diana Dorta hoy y siempre, por ser docente, amiga, ejemplo, futura colega, dedicándome tiempo de enseñanza y reflexión.

A la profesora Liliana Jiménez por exigir desde el primer momento compromiso y amor por este postgrado.

Al profesor Francisco Farias por resaltar la importancia de la coherencia en todo tratamiento que realicemos.

A mis compañeras de la IX Cohorte, quienes me hicieron crecer en el ámbito profesional y personal.

A Lisseth Morales por ser madre e hija en este logro académico.

A la Facultad de Odontología por conservar espacios de formación académica en estos tiempos tan duros.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

Propiedades del Hipoclorito de Sodio y EDTA sobre la dentina, en procesos endodónticos regenerativos. (Revisión Bibliográfica)

Línea de Investigación: Biología Humana

Temática: Crecimiento y Desarrollo

Subtemática: Embriología, Fisiología, Histología y/o Ultra estructura de tejidos sanos y patológicos (Endodoncia)

Fecha: Agosto, 2019

Autor: Andreina Curiel

Tutor: Diana Dorta

RESUMEN

La desinfección del Sistema de Conductos Radiculares (SCR) en los procesos endodónticos regenerativos resulta de la combinación del uso de irrigantes y medicación intraconducto. La evidencia científica resalta la influencia del volumen, tiempo y concentración de los irrigantes dentro del SCR. *Estudios In vitro e In Vivo* han demostrado el efecto negativo de la concentración al 6% del NaOCl, reduciendo la expresión de células madres de la papila apical. Actualmente se considera un volumen de 20ml, tiempo comprendido entre 3-5min del irrigante en contacto con la superficie dentinaria, y una concentración de 1,5%. Además el uso del EDTA al 17% condiciona un ambiente óptimo para la liberación y exposición de factores de crecimiento en la superficie dentinaria. En la actualidad no hay protocolo definido para la desinfección del conducto radicular en procedimientos regenerativos. El objetivo de esta investigación fue estudiar las propiedades del Hipoclorito de Sodio y EDTA en los procesos de RE, su eficacia, beneficios y desventajas sobre la dentina. Se desarrollará una investigación de tipo documental y diseño bibliográfico, presentada bajo modalidad de monografía, basada en fuentes como artículos de revistas científicas especializadas y libros de texto especializados. Conclusión: El proceso de desinfección se ha convertido en un modulador crítico de la regeneración. El Hipoclorito de sodio es el irrigante de elección en RE, adicionalmente el EDTA al 17% contribuye a exponer los componentes bioactivos incluidos en la dentina, por tanto podría emplearse como parte del protocolo de irrigación en éstos procedimientos.

Palabras Claves: Regeneración Pulpar, Factores de Crecimiento, Irrigantes, Condicionamientos dentinario.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

Properties of the Sodium Hypochlorite and EDTA over dentin, in the processes of endodontic regeneration (Review)

Line of Research: Human Biology

Thematic: Growth and Development

Sub-thematic: Embryology, Physiology, Histology and Ultrastructure of healthy and pathological tissues (Endodontics)

Date: August, 2019

Author: Andreina Curiel

Advisor: Diana Dorta

ABSTRACT

Disinfection of the Root Canal System in (RCS) regenerative endodontic processes results from the combination of the use of irrigantes and intraconduct medication. Scientific evidence highlights the influence of the volume, time and concentration of the irrigants within the RCS. In vitro and In Vivo studies have shown the negative effect of concentration at 6% of NaOCl, reducing the expression of apical papilla stem cells. Currently it is considered a volume of 20ml, a time between 3min-5min of the irrigator in contact with the dentin surface, and a concentration of 1.5%. In addition, the use of 17% EDTA conditions an optimal environment for the release and exposure of growth factors in the dentin surface. Currently there is no defined protocol for the disinfection of the root canal in immature permanent tooth units with a diagnosis of necrosis pulp. The objective of this study will be to study the properties of Sodium Hypochlorite and EDTA in RE processes, their efficacy, benefits and disadvantages on dentin. Documentary and bibliographic design research will be developed, presented under monograph, based on sources such as articles from specialized scientific journals, specialized textbooks and postgraduate papers published. Conclusion: The disinfection process has become a critical modulator of regeneration. Sodium Hypochlorite is the irrigator of choice in RE; in addition 17% EDTA contributes to expose the bioactive components included in dentin.

Keywords: Pulp Regeneration, Growth Factors, Irrigantes, Teething.

Índice General

Acta de Aprobación.....	iii
Constancia de Culminación del Tutor de Contenido.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	8
Principios en Endodoncia Regenerativa (RE).....	8
- Células Madre (Stem-Cells).....	11
- Factores de Crecimiento (FC).....	21
Importancia de la Dentina como fuente endógena de FC.....	24
- Andamios.....	26
- Importancia de la Angiogénesis en Endodoncia Regenerativa.....	32
Consideraciones sobre la Infección en RE.....	34
Microambiente para la Regeneración del Complejo Pulpo-Dentinario.....	37
Dentina como Campo para la RE.....	39

Soluciones Irrigadoras en Endodoncia Regenerativa.....	47
- Hipoclorito de Sodio.....	47
- Hipoclorito de Sodio en RE.....	49
- ÁcidoEtilendiaminotetraacético (EDTA).....	55
- Efecto del EDTA sobre el Coagulo Sanguíneo.....	59
Discusión.....	61
Conclusiones.....	66
Recomendaciones.....	69
Referencias.....	70

Índice de Tabla e Imágenes

Tipos de células madre en estructuras y tejidos bucales. (Tabla1).....	12
Factores de Crecimiento aislados en matriz dentinaria (Tabla 2).....	19
Triada de la Ingeniería Tisular (Figura 1).....	28

Introducción

La Endodoncia regenerativa (RE) tiene como objetivo reestablecer funcional y estructuralmente al Complejo pulpo dentinario. Las proteínas endógenas secuestradas en la matriz extracelular de la dentina humana juegan un papel decisivo en este proceso, en la actualidad algunos estudios han evaluado la liberación de estos factores de crecimiento y el papel que desempeñan las soluciones irrigadoras al ser responsables de presentar su biodisponibilidad en la superficie dentinaria.¹⁻³ La Regeneración Pulpar tiene sus raíces en los Principios de Ingeniería Tisular (IT); la cual establece una triada imperativa en su práctica; presentación de células con capacidad de diferenciación, liberación de factores de crecimiento y un andamio que actúa como vehículo bioactivo en la unión de los anteriores.^{4,5} Estos tres elementos deben estar acompañados de la inducción del proceso de angiogénesis para proveer oxígeno y nutrientes con el objetivo de mantener el metabolismo y supervivencia celular. Actualmente no se puede hablar de regeneración pulpar sin resaltar la importancia de la desinfección del conducto radicular necesario para inducir una correcta regeneración/reparación de los tejidos, eliminando toda actividad microbiana presente en el medio.^{1,4-8} En la RE la principal solución irrigadora es el Hipoclorito de Sodio, promoviendo su

capacidad de eliminación de la colonia bacteriana, degradación de tejidos orgánicos, con posible repercusión sobre las células del ligamento periodontal y células madre de la pulpa y papila apical.⁹⁻¹¹ En efecto la sustancia auxiliar en los procesos de RE que aparece como una constante es el ácido etilediaminotetraacético (EDTA) al 17%, su capacidad de liberar los FC inmersos en la dentinaria es aún tema de interés y discusión. . La presencia de estas proteínas (FC) capaces de inducir una diferenciación celular sería la clave para alcanzar el éxito en RE.¹²⁻¹⁸

Adicionalmente, se han alcanzado estrategias donde el especialista busca un Scaffold o Andamio adecuado para el caso clínico que se presenta, lo que sugiere que parte de él contenga un sustrato endógeno 100% biocompatible durante el procedimiento como el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) o Fibrina rica en Plaquetas (PRF). La gran ventaja de esa terapéutica, además de tratarse de una técnica sencilla y económica, es que evita el rechazo inmunológico y la transmisión de gérmenes patógenos.¹⁹⁻²³

La RE para unidades dentarias inmaduras con diagnóstico de Necrosis y Periodontitis Apical siempre ha representado un reto para el Especialista. En el presente no hay protocolo definido para la desinfección del conducto radicular en este escenario clínico. Sin embargo, se han establecido posturas basadas en resultados clínicos considerados fiables. La fragilidad de las paredes dentinarias, delgadas y divergentes dificulta la preparación mecánica dentro del conducto radicular, hoy son muchos los investigadores

que se valen solo de soluciones irrigadoras para lograr la desinfección de conducto. El control microbiano es crucial en toda Terapéutica Endodóntica y los procedimientos Regenerativos no son la excepción. Sin embargo, el uso de estas soluciones irrigadoras compila una serie de principios previos a considerar.²⁴⁻²⁸

La idea de regenerar tejido a expensas de un diente sin vitalidad no es nueva. Nygaard-Ostby. B, precursor de la RE demostró; mediante la sobreinstrumentación y desinfección del conducto radicular, Neoformación de tejido en el tercio apical. Sin embargo, el análisis histológico arrojó evidencia de un proceso de reparación, sin observar regeneración del complejo dentino pulpar. En consecuencia, este hallazgo dio cabida a innumerables investigaciones que hoy sustentan la base de la ingeniería tisular.²⁹⁻³¹

En el siglo XX nace en la literatura científica reportes de caso con un enfoque biológico y regenerativo de la terapia endodóntica, fundamentándose en el propio criterio clínico. Iwaya. S en el 2001 califica como “revascularización” a un procedimiento donde no instrumenta el conducto, valiéndose solo de la desinfección con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, posteriormente medicado con una pasta de antibiótica (metronidazol y ciprofloxacina). El premolar inferior inmaduro con radiolucidez periapical y fístula asociada casi tres años después manifestó radiográficamente maduración completa del ápice, con engrosamiento de las paredes de la

estructura radicular. Conjuntamente el diente respondió positivamente a la prueba pulpar eléctrica.³²

Iwaya S, logró inspirar a muchos investigadores abriendo campo a los diferentes protocolos clínicos que cada especialista bajo su propio criterio decidió implementar. Uno de los casos más emblemáticos fue el de Bachs F y Trope M publicado en el 2004, los cuales aplicaron un tratamiento similar al de Iwaya S, otro premolar inferior donde utilizaron hipoclorito de sodio, clorhexidina y la colocación de una pasta triantibiótica (ciprofloxacina, minociclina, metronidazol) como medicación intraconducto, para desinfectar el canal radicular. El protocolo incluía la irritación apical del ápice inmaduro con un explorador endodóntico hasta crear un coágulo sanguíneo visible en el conducto. Al cabo de dos años la lesión periradicular reparó, se observó cierre apical y respuesta positiva a la prueba del frío. El éxito alcanzado en este abordaje clínico motivó a Trope M en el 2008 a publicar un apartado sobre el potencial regenerativo de la pulpa dental, probablemente con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre la temática y resaltar la importancia de salvar este tejido o incluso regenerarlo como procedimiento rutinario en la clínica del especialista en endodoncia.^{33,34}

La evolución en el campo de la RE ha permitido asegurar que el éxito del tratamiento es consecuencia de la supervivencia y diferenciación de las células madre disponibles en el tejido. En consecuencia, se ha ampliado la investigación sobre las repercusiones de los irrigantes que utiliza el

Endodoncista en los tratamientos convencionales como en los procedimientos regenerativos. Murray et al en el 2008 realiza una investigación donde compara los efectos de las diferentes soluciones irrigadoras sobre la adherencia y diferenciación celular en la dentina radicular. Evidenciando los efectos negativos del hipoclorito de sodio en altas concentraciones (6%) y del mismo modo resaltando los posibles beneficios de los quelantes intraconducto (EDTA) como solución promotora de la supervivencia de células madre de la pulpa dental en IT.³⁵

Sería ideal que existiera un criterio sobre el manejo o acondicionamiento dentinario para los procesos regenerativos en endodoncia, asegurando el éxito del tratamiento para el especialista. Muchos son los factores dispersamente estudiados y reportados en artículos actuales, sin embargo, no existe un reporte que logre abarcar todos los factores que influyen en este condicionamiento dentinario, necesario para la liberación de factores de crecimiento endógenos en procesos de regeneración Pulpar, información valiosa de gran utilidad para el abordaje clínico de estos procedimientos.

La presente investigación tuvo como objetivo estudiar las propiedades de las sustancias irrigadoras (Hipoclorito de Sodio y EDTA) en los procesos de regeneración endodontica, su eficacia, beneficios y desventajas sobre la dentina. Para tal fin se realizó una revisión de diversas fuentes bibliográficas, enmarcando el trabajo dentro del tipo documental. Dicha revisión se presenta bajo la modalidad de monografía, en forma de texto

expositivo, de trama argumentativa, predominante informativo; organizado con coherencia, información rigurosamente seleccionada, la cual ha sido objeto de un profundo análisis crítico. Las fuentes consultadas fueron principalmente artículos de revistas científicas especializadas, localizadas a través de la base de datos PubMed, Trip Data Base, y Google Académico, , libros de texto especializados y trabajos de grado publicados en los últimos diez años.

Esta revisión aportará información de vital importancia para el especialista que decida abordar procedimientos regenerativos, contribuyendo a un mejor entendimiento de los factores endógenos presentes en la superficie dentinaria y cómo exponerlos a través de las sustancias irrigadoras de uso actual, elementos claves en la regeneración Pulpar.

La presente investigación busca ofrecer al clínico una base definida sobre el condicionamiento dentinario en los procesos regenerativos endodónticos. Es una temática que ha sido poco abordada, sin embargo aspira ser el futuro de la Terapéutica Endodóntica. Se busca a través de esta investigación, colaborar con los reportes más efectivos e innovadores que hoy se presentan en el campo de la endodoncia regenerativa, a pesar de no existir un protocolo específico para la regeneración pulpar

Esta investigación servirá para alcanzar en un futuro próximo un protocolo para la RE, del mismo modo, los estudiantes de pregrado y postgrado de la

Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo (FOUC) y los odontólogos contarán con un material bibliográfico, que fomentará un ejercicio clínico fundamentado en la evidencia científica, beneficiando en forma indirecta, a la comunidad de pacientes que reciben atención odontológica.

El presente trabajo está adscrito a la Unidad de Investigaciones Morfopatológicas (UNIMPA) y enmarcado dentro de las líneas de investigación de la FOUC, específicamente, en la línea de investigación Biología Humana. Esta correspondencia garantiza pertenencia, sensibilidad y aproximación al entorno social.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Principios en Endodoncia Regenerativa (RE)

El Nacimiento de la Ingeniería Tisular (IT) como disciplina científica dedicada a generar nuevos tejidos usando los principios de la ingeniería en combinación con las ciencias biológicas tuvo lugar en Estados Unidos de América. A mediados de 1980 el Dr. Joseph Vacanti y Dr. Robert Langer presentaron la idea de diseñar un andamio apropiado para insertar células en tejidos con necesidad de regenerar. Vacanti se enfocó en crear un Scaffold (andamio) funcional utilizando una gran gama de polímeros sintéticos biodegradables y biocompatibles viables para la supervivencia celular. Probablemente una de las primeras definiciones de IT se debe a estos autores que para el año 1993 lo describen como “el campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren las funciones tisulares”.^{36,37}

En el campo de la Endodoncia se ha recorrido un largo camino sobre los avances en procedimientos regenerativos, logrado por el progreso de la medicina regenerativa y la ingeniería de los tejidos. El objetivo final de la RE es crear un tratamiento práctico, económico y predecible donde el tejido pulpar sea restaurado utilizando la ingeniería biomédica, hasta alcanzar su

estado natural previo a la lesión presente. En la actualidad todo caso publicado de RE está dirigido a este objetivo.^{38, 39}

Se han determinado tres protagonistas para el alcance de la ingeniería de los tejidos; células madre, factores de crecimiento y una matriz o Scaffold, necesarios para inducir y conducir el crecimiento tisular.^{40, 41} Sin embargo, el campo de la medicina regenerativa no tardó en dar cabida al proceso de angiogénesis como parte fundamental y necesaria para la IT. Múltiples estudios en los últimos años han mostrado que la vascularización tardía o la falta de vascularización es uno de los mayores obstáculos para desempeñar una correcta sustitución o regeneración tisular. La incorporación de células madre aceleran la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos con ayuda de las proteínas endógenas pro angiogénicas (Factores de Crecimiento) disponibles en el medio. Sin el proceso de angiogénesis la regeneración pulpar no sería posible, toda célula del organismo requiere oxígeno y nutrientes para mantener sus funciones básicas.⁴²⁻⁴⁴

En endodoncia se han desarrollado dos técnicas para alcanzar la regeneración del complejo pulpo dentinario, la técnica con presencia de células (cell-based/ cell transplantation), y la técnica libre de células (cell-free/cell-homing). La diferencia reside, en que la técnica cell based involucra trasplantar células madre exógenas, incluidas en andamios junto con moléculas de señalización dentro del conducto radicular del paciente y así inducir la regeneración. Las células trasplantadas pueden ser autólogas (del

mismo paciente) o alogénicas (tomadas de otro individuo de la misma especie). Estas células aisladas pueden ser procesadas (separadas de tejidos) o cultivadas para aumentar su cantidad.⁴⁵ La regeneración pulpar utilizando trasplante de stem-cells conlleva algunos problemas, asociados con el proceso de aislamiento celular, preservación de las mismas y altos costos para su conservación (criopreservación celular), sin descartar un riesgo de rechazo y/o infección.⁴⁵⁻⁴⁶ En contraste, la estrategia cell-free se define como un reclutamiento activo de células endógenas, incluyendo las células madre/progenitoras a un compartimiento anatómico específico, en este caso el conducto radicular.⁴⁷ El objetivo de esta estrategia es alcanzar regeneración del tejido a través de la quimiotaxis de células endógenas del paciente, respaldado por moléculas biológicas de señalización. Esta técnica resulta más accesible en termino de facilidad y costo, ya que no se necesita el aislamiento ni la manipulación de células *in vitro*, por el contrario, se utilizan andamios bioactivos que junto con los FC incluidos en ellos y/o disponibles en la superficie dentinaria, inducen migración, proliferación y diferenciación de células madre/progenitoras endógenas que residen alrededor del ápice radicular .^{46, 48,49}

La predictibilidad de la regeneración del complejo pulpo dentinario, con la estrategia cell-free está limitada por la cantidad de células que logren migrar de los tejidos periapicales, sin embargo, estudios han demostrado que esta técnica en conjunto con un agregado importante de FC puede aumentar el

éxito durante la terapéutica.^{50,51} Por lo tanto, puede que la estrategia libre de células, sea modificada en un futuro, en miras de regular el orden de un sistema vascular como la formación de tejido duro en el diente.⁵¹

En la realidad clínica, la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) solo reconoce la estrategia cell-free/ cell-homing como técnica de revitalización, mediante la atracción de células endógenas por factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, valiéndose del coagulo sanguíneo, plasma rico en plaquetas (PRP) o fibrina rica en plaquetas (PRF) como andamios para el procedimiento.⁵¹

A continuación se describirán cada elemento, que hoy en día podrían calificar como tétrada de la Ingeniería Tisular.

Células Madre – Stem Cells (SC)

La pulpa dental contiene tejido conectivo, células mesenquimales, fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, siendo su función principal mantener la vitalidad biológica y fisiológica de la dentina. Los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas se unen y entran a la pulpa dental a través del foramen apical proporcionando nutrición y un sistema nervioso sensorial a la unidad dentaria. Aunque la estructura dentaria posee rigidez y estabilidad, el diente permanece vulnerable a agresiones como trauma mecánico, químicos, infecciones bacterianas y caries. A diferencia del hueso que tiene la propiedad de remodelarse y reparar, el diente no muestra una

regeneración completa y demuestra tener procesos reparativos limitados. Después de la formación de la corona, los ameloblastos sufren muerte celular programada y pierden la habilidad de reparar el esmalte. Aunque los odontoblastos no pueden reparar completamente la dentina, su progenitor o célula madre tiene la capacidad de migrar a la superficie dentinaria (zona de lesión) y diferenciarse en células parecidas a odontoblastos (Odontoblast-like cells) para formar dentina reparativa/terciaria. En contraste a la dentina primaria, esta dentina está pobremente organizada, con túbulos irregulares rodeada de matriz dentinaria, sin embargo forma una barrera protectora para la pulpa dental.⁵²⁻⁵⁶

Todo tejido del organismo tiene su principio en una “célula madre o stem cell” definida como una célula con capacidad de dividirse y originar una progenie celular o célula intermedia (progenitor o precursor) que podrá diferenciarse en diversos tipos de células y tejidos; lo que se conoce como diferenciación celular. El Comité de Tejidos y Células Stem Mesenquimales de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha propuesto tres criterios para identificar este tipo de célula; adherencia a superficies plásticas, expresión de antígenos (Ag) de superficie específicos (CD73+, CD90+ Y CD105+), potencial de diferenciación multipotente, con capacidad de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar.⁵⁷

La función principal de toda célula madre es promover el desarrollo de nuevo tejido, homeostasis y reparación del órgano afectado. Para identificar los

tejidos producidos en los procesos de regeneración/reparación se utilizan marcadores celulares; moléculas que liberan la células responsables de la formación de un tejido. Como se expresó anteriormente, la Neoformación se califica con el sufijo “-like” (“parecido a”) lo que permite diferenciarla del tejido original.⁵⁸⁻⁵⁹

Las células madres constituyen la fuente natural de células indiferenciadas capaces de generar nuevos tejidos, o de regenerar los ya existentes. En la actualidad la investigación sobre células madre ha crecido exponencialmente debido al reconocimiento de las terapias que pueden llevarse a cabo a través de ellas, como es el caso de pacientes con enfermedad de Alzheimer, isquemia cardiaca, pérdida ósea, redundando positivamente en las condiciones y calidad de vida para estos pacientes.⁶⁰⁻⁶²

La evidencia muestra que estas células se encuentran en nichos especializados, y que algunos tejidos contienen más células madre que otros. La pulpa dental es considerada una rica fuente de células madre mesenquimatosas. Las células madres de la pulpa dental humana fueron descubiertas por su capacidad de presentarse en forma de colonias en cultivos, por su capacidad de auto renovación en estudios *in vivo*, y su multipotencialidad en estudios *in vitro*; siendo capaces de diferenciarse en varios tipos de células incluyendo odontoblastos, progenitores neuronales, osteoblastos y células endoteliales.⁶²⁻⁶³

Las células madre se clasifican **según supotencial de diferenciación** en: totipotentes, multipotentes y pluripotentes. Las células totipotentes tienen la capacidad de dividirse y producir todas las células de un individuo incluyendo tejidos extraembrionarios, las *pluripotentes*; se diferencian en células de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo, dándole a su progenie muy variados fenotipos, y las *multipotentes*; pudiendo diferenciarse en múltiples pero limitados linajes celulares. **Según su origen** la literatura las clasifica en células madres *embrionarias y post natales o adultas*; las embrionarias (ESCs) son pluripotentes ubicadas en la masa celular del embrión, y las células madre *postnatales o adultas* (ASCs); encontradas en forma de nichos celulares multipotentes presentes en tejidos ya desarrollados. Las células postnatales o adultas pueden ser clasificadas a su vez en *hematopoyéticas* (HSCs), formadoras de células sanguíneas y del sistema inmunológico, y en células *mesenquimales* (MSCs) descubiertas en medula ósea pero presentes en la mayoría de los tejidos.⁶⁴

Las células madre aisladas en el órgano dental son células postnatales mesenquimales multipotentes; que han presentado la capacidad de generar tejidos en órganos diferentes al diente lo que se conoce como *plasticidad celular*. Desde el año 2000 se han logrado identificar varios tipos de células madre en estructuras y tejidos bucales.⁵⁹ (Tabla1)

DPSC	Células madre de la pulpa dental
SHED	Células madre de los dientes primarios exfoliados
SCAP	Células madre de la papila apical
PDLSC	Células madre del ligamento periodontal
DFSC	Células progenitoras del folículo de la pulpa dental
iPS	Células madre Pluripotentes Inducidas
iPAPC	Células Progenitoras Inflamatorias Periapicales
SGSC	Células madre de las glándulas salivales
OESC	Células madre del epitelio bucal
GMSC	Células madre mesenquimales derivadas de la encía
PSC	Células madre derivadas de periostio
BMSC	Células madre de la medula ósea
TGPC	Células progenitoras del germen dental

Células Madre de la Pulpa dental DPSCs

En el año 2000 Gronthos et al. lograron por primera vez el aislamiento y caracterización de células madres del tejido pulpar en terceros molares

impactados. Estas células son de origen ectodérmico, derivadas de la migración de la cresta neural y poseen propiedades mesenquimatosas de células madres; morfología parecida a la célula fibroblástica, adherencia a superficies plásticas y capacidad de formar colonias en cultivos *in vivo*. Además tienen la capacidad de diferenciación multilineal, pudiendo diferenciarse en condrocitos, adipocitos, odontoblastos y células neurales bajo condiciones apropiadas.^{60, 65}

Las DPSCs han sido comparadas con las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSCs) en cuanto a tasa de proliferación, formación de colonias, potencial clonogénico y potencial de mineralización. Se ha confirmado mayor tasa de proliferación en las DPSC y mayor número de células progenitoras, asociado a un mayor potencial de mineralización.⁶⁰

En relación a lo anterior las DPSC son candidatas de elección para ingeniería tisular dental debido a la facilidad de acceso quirúrgico para su aislamiento y por su baja morbilidad luego de la extracción de la pulpa dental. En el año 2001 Shi et al. confirman la localización perivascular de estas células en la cavidad pulpar. Aunque las DPSC han sido utilizadas como fuente de células madre fuera de la cavidad bucal, tienen la capacidad de generar tejido parecido a dentina en un periodo corto de tiempo en comparación con células madre aisladas fuera del diente. Su capacidad de soportar la cryopreservación, compatibilidad con muchos andamios y las

propiedades antiinflamatorias de estas células son la razón de su uso en innumerables experimentos de la medicina regenerativa.⁶⁴⁻⁶⁵

Células Madre de los Dientes Primarios Exfoliados (SHEDs)

Miura et al. en el año 2003 confirman la presencia de las SHED y destacan su alta capacidad proliferativa en comparación con las DPSC. Son capaces de diferenciarse en gran variedad de fenotipos celulares incluyendo células parecidas a osteoblastos, células parecidas a Odontoblastos, adipocitos y células neurales. Las SHED han revolucionado la medicina regenerativa, utilizadas para tratar condiciones ortopédicas, enfermedad de Crohn, enfermedades cardiovasculares, desordenes neuronales degenerativos como la enfermedad de Parkinson e incluso cirugía plástica. Además han demostrado ser útiles en parientes cercanos al donante de las SHED abarcando padres, abuelos y hermanos.⁶⁴

En estudios *in vivo* producen una estructura similar a la dentina incluyendo tejido mineralizado, pero no han mostrado la capacidad de formar completamente el complejo dentino pulpar como las DPSC. Sin embargo, las células madre de dientes deciduos exfoliados probablemente debido a su inmadurez, han demostrado tener un potencial curativo mejor que otro tipo de células madre adultas e indiscutiblemente menos restricciones éticas asociadas a su aislamiento.^{65, 66}

Células Madre de la Papila Apical (SCAP)

La papila apical es el tejido adherido al ápice de los dientes inmaduros en desarrollo, rico en proteoglicanos, diferencia histológica que lo separa de la pulpa. Las células madre de este tejido fueron aisladas por Sonoyama et al. en el año 2006, consideradas no solo como responsables del desarrollo del complejo dentino pulpar, además son esenciales para el desarrollo del hueso alveolar y la raíz completa de la unidad dentaria. Con excelente potencial de diferenciación, las SCAP parecen ser similares a progenitores de DPSC para todas las células del complejo dentino pulpar, considerándose fuente primaria de odontoblastos para la formación radicular. Asimismo, las SCAP tienen capacidad de supervivencia en diagnósticos de necrosis pulpar debido a la proximidad al tejido periapical vascularizado, en escenarios de desinfección endodóntica pueden generar Odontoblastos primarios que completaran la raíz bajo la influencia de la vaina epitelial de Hertwig.⁶¹ En un estudio realizado en cerdos como modelo de estudio, la remoción quirúrgica de la papila apical en etapa temprana de desarrollo detuvo el crecimiento de la raíz, en unidades dentarias donde se mantuvo la papila apical, se evidenció longitud y grosor radicular completo. También se afirma la capacidad de las SCAP para producir tejido vascularizado dentro del conducto radicular con una extensión de 5-6mm, sin embargo, la capacidad de regeneración dentinaria sugiere ser una constante. Posteriormente se ha discutido la supervivencia de las SCAP en necrosis pulpar y condiciones

inflamatorias; estudios realizados en ratas revelan supervivencia de estas células por 90 días en presencia de este entorno. El problema se presenta en la medición del grado de inflamación y los cambios constantes que se presentan en estos ambientes, un componente importante es la hipoxia, explorar los mecanismos que desarrollan las SCAP para vencer estas adversidades es un tema aún en discusión. Reportes previos aseguran que la exposición a citoquinas proinflamatorias tienen un efecto positivo sobre las SCAP induciendo a un mejor potencial de proliferación celular y mineralización en comparación a grupos control, este resultado en exposiciones cortas (3-5 días) en ambientes inflamatorios, exposiciones mayores (9 días en adelante) producen un efecto negativo en cuanto al potencial proliferativo.⁶⁶⁻⁶⁸

Se necesitan más investigaciones para confirmar estos hallazgos y poder aseverar el tiempo de vida de las SCAP en condiciones desfavorables y su efecto en el resultado de diferenciación celular, angiogénesis y por ende en la regeneración pulpar.^{62, 63}

Células madre del Ligamento periodontal (PDLSC)

El ligamento periodontal (LPD) junto con el cemento unen el diente al hueso alveolar. El LPD contiene células madre conocidas como PDLSC destinadas a la regeneración y homeostasis del periodonto. Estas células han presentado marcadores específicos asociados a la diferenciación de tejido

parecido al periodonto, además han demostrado regenerar tejido en defectos periodontales en ratas inmunosuprimidas. Implantadas en roedores las PDLSC generaron tejido parecido al cemento y ligamento periodontal, aparte de contribuir a la reparación de tejido preexistente. Son células criopreservables incluso utilizadas en cirugía maxilofacial en procesos de osteointegración.⁶⁹

Las PDLSC son una población de células stem con características específicas capaz de diferenciarse en cementoblastos y osteoblastos, son autos replicantes y muestran marcadores celulares específicos ausentes en otras células madre de la cavidad bucal. Tienen la propiedad de formar fibras densas de colágena tipo I capaces de unirse al cemento recién formado y mimetizar la adherencia fisiológica de las fibras de Sharpey.^{69, 70.}

Células progenitoras del folículo de la pulpa dental (DFSC)

El folículo dental es un tejido conectivo ecto-mesenquimatoso que rodea al diente en desarrollo, jugando un papel crucial durante la erupción dentaria. Se ha postulado que las células del folículo dental cercanas a la raíz se diferencian en cementoblastos, y las células cercanas al hueso alveolar (parte externa) se distinguen como osteoblastos encargados de formar la matriz del hueso. La razón de que el cemento, ligamento periodontal y hueso se originen de esta estructura, nos da una idea de su gran potencialidad. La estimulación derivada de la Vaina Epitelial de Hertwig es la responsable de

transformar la célula precursora del folículo dental en cementoblastos. Su diferenciación con factores de crecimiento y citoquinas específicas en estudios *in vitro* permiten diferenciarlas en adipocitos, neuronas y fibroblastos potenciando la regeneración periodontal en la ingeniería de tejidos.^{69, 70}

Al demostrar mayor potencia que las células madre de la médula ósea, las DFSC son hoy en día candidatas de elección para la ingeniería de tejidos óseos. Se espera que las DFSC se tomen en cuenta en procedimientos endodónticos regenerativos por sus notables características; facilidad de recolección y supervivencia en cryopreservación, siendo muy buenas candidatas para la Ingeniería Tisular.⁷¹

Factores de Crecimiento

La estrategia para RE libre de células (cell homing/cell free) busca alcanzar la regeneración de tejido dental a través de la quimiotaxis de células endógenas a los tejidos lesionados, respondiendo a la acción de moléculas de señalización. Esta maniobra representa el abordaje clínico más viable para regenerar la pulpa dental, utilizando como fuente potencial las células madre de la papila apical (SCAP), capaces de diferenciarse en células parecidas a odontoblastos (odontoblastic-like) y regular el desarrollo del diente inmaduro. Este alcance resulta de una serie de reacciones biológicas complejas asociadas a moléculas endógenas como lo son los factores de crecimiento, importantes para completar el proceso.^{63, 72, 73}

Los factores de crecimiento (FC) son polipéptidos que tienen la habilidad de unirse a receptores específicos de células diana, facilitando algunas funciones como migración, proliferación, diferenciación y apoptosis celular.^{38,51,74} A diferencia de las hormonas, los FC carecen de acción sistémica, por el contrario actúan en células específicas, y son elemento importante en el éxito de la RE en estrategias cell-free por encontrarse incluidos en la matriz dentinaria.^{11,38,51} Otra fuente de FC son los andamios como el plasma rico en plaquetas (PRP), plasma rico en fibrina (PRF) o andamios exógenos funcionales que incluyen uno o varios FC previamente aislados.^{21,75,76}

Una variedad de factores de crecimiento son considerados importantes en RE, como la superfamilia de factores de crecimiento transformantes (TGF) que intervienen en la diferenciación celular, otros afines a procesos biológicos como la angiogénesis, neurogenesis y migración celular.^{11, 77}

Factores de Crecimiento aislados en matriz dentinaria.^{38, 78-80}

Reparacion y Regeneracion	FC derivado de Plaqueta (PDGF), FC Transformante (TGF), Proteína Morfogénica Ósea (BMP), FC del Endotelio Vascular (VEGF), FC Fibroblastico (FGF), FC Insulinico (IGF)
Angiogénesis	FGF, PDGF
Neurogenesis	FC Neuronal (NGF)

Diferenciación	FC Transformante β (TGF β), PDGF, FGF2, BMP (2,4,7,11), IGF,NGF
Proliferación	FGF2, TGF β 1, PDGF, VEGF
Quimiotaxis	TGF β 1, PDGF, FGF2

Actualmente la atención esta direccionada a desarrollar métodos que expongan estos polímeros bioactivos incluidos en la dentina con soluciones irrigadoras utilizadas tradicionalmente durante la terapia endodontica convencional.^{18,51,81} El comportamiento de las células madre puede ser regulado por FC producidos por ellas mismas, expuestos por la dentina, presentados por otras células o por andamios autólogos y/o exógenos.^{51,82-84} En presencia de periodontitis apical, las SCAP mantienen su vitalidad y estructura, conservando su capacidad de diferenciación angiogénica y osteogénica bajo la influencia de FC. Los FC quimiotácticos (TGF- β 1, PDGF, FGF2) estimulan la migración de las SCAP al lugar de la lesión.^{63,83} El proceso vital de la RE es la angiogénesis, favorecida por la acción del FC proangiogénica VEGF, inductor de la movilización de células precursoras endoteliales.^{38,85}

Importancia de la Dentina como Fuente Endógena de Factores de Crecimiento.

En el abordaje libre de células (cell-free) dentro del conducto radicular, las soluciones irrigadoras no solo contactan con poblaciones celulares, además interactúan con la superficie dentinaria. La dentina es un gran reservorio de componentes bioactivos (DMCs-Dentin Matrix Components), que son incluidos dentro de la matriz durante el desarrollo de la unidad dentaria. Algunos grupos identificados han sido proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento, proteasas tisulares e incluso citoquinas, que han demostrado tener fines terapéuticos para la reparación del complejo dentino pulpar.^{11,86} Los DMCs pueden inducir la diferenciación odontoblastica, sin embargo, solo con la presencia de BFGF y/o VEGF se ha logrado formar tejido parecido a la pulpa.⁵⁰ Por el contrario, otro estudio *in vivo* ha resaltado la presencia de FC proangiogénicos presentes en la dentina, indicando que son insuficientes para inducir diferenciación endotelial.⁸⁷ Se debe destacar la importancia de las consideraciones clínicas en estudios de IT, es frecuente el éxito en modelos *in vitro*, sin embargo, cuando el tejido pulpar debe crecer en un conducto radicular vacío, procesos claves como la angiogénesis puede necesitar la acción de FC para desarrollarse adecuadamente.⁵¹

Enfoques actuales sobre RE, magnifican la cualidad de algunas células de generar por si solas FC, no solo las células madre, los fibrocitos y los fibroblastos comparten la misma condición. Los fibroblastos son las células

más abundantes de la pulpa dental, la mayoría de los estudios se enfocan en resaltar el rol de estas células como en todo tejido conectivo; su capacidad de sintetizar y secretar diferentes tipos de colágeno. Aunque la síntesis de colágeno sea esencial en la matriz extracelular (ECM) por favorecer la adhesión y función de células en la pulpa dental, también son indispensables por proveer soporte y estabilidad de los vasos sanguíneos por contribuir a la formación de membrana. Además, estudios recientes han afirmado la capacidad de los fibroblastos de sintetizar factores de crecimiento; asociados al restablecimiento de vascularización sanguínea, y regeneración dentino-pulpar por reclutamiento de células madre y terminaciones nerviosas al lugar de la lesión, en casos de infección o injuria pulpar.^{84,88-90} Asimismo, este linaje celular sintetiza todas las proteínas de complemento, y conduce a la producción de fragmentos bioactivos de este sistema esencial en diversas reacciones biológicas mediadas por anticuerpos.⁹⁰⁻⁹³

La regeneración comprende síntesis de dentina, neo angiogénesis e inervación. Aunque la primera fuente de moléculas capaces de inducir RE en el complejo dentino-pulpar fue la dentina^{94,95}, se ha demostrado que los fibroblastos secretan FGF-2, VEGF, y PDGF *in vitro*, y que esta secreción aumenta significativamente seis horas después de una lesión traumática en la unidad dentaria. Esta información sugiere, que solo la lesión por si misma provoca un cambio en el microambiente local, induciendo la producción de FC.⁹⁶

En general, adicionalmente a los odontoblastos y células madre, los fibroblastos de la pulpa deberían ser considerados como células importantes para diseñar una estrategia e inducir un proceso regenerativo del complejo dentino-pulpar. Sin embargo, en casos de necrosis, solo se contará con las moléculas bioactivas liberadas por las células de la región periapical resistentes a este ambiente desfavorable.¹¹

Andamios

Los andamios o scaffolds son estructuras tridimensionales capaces de proveer un microambiente biológico y físico-químico capaz de permitir el crecimiento celular y su diferenciación. Dependiendo del andamio las propiedades que ofrecen al tratamiento regenerativo son distintas. Sin embargo, todos deben perseguir funciones beneficiosas para la RE; promover la interacción entre el material y las células, cooperar a la adhesión celular, permitir suficiente transporte de nutrientes para mantener la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, ser biodegradables a un tiempo cercano a la regeneración de tejido, inducir un mínimo grado de inflamación o citotoxicidad.^{77,97,98} Las células normales del organismo, exceptuando las células sanguíneas, se encuentran ancladas y dependientes de una estructura concreta conocida como Matriz extracelular (ECM-

Extracellular Matrix). El mejor andamio para la IT en consecuencia debería ser la ECM de la célula diana en su estado natural.⁹⁹

Clasificación de los Andamios. Según Sureshchandra.B Roma.M.^{100,101}

- Basados en la degradabilidad de las matrices: Andamios Biodegradables y Andamios Permanentes.
- Basados en su forma: Bloques sólidos, hojas, esponjas porosas e Hidrogel (andamios inyectables).¹⁰⁰
- Basados en la presencia de células: Andamios libre de células y Matrices con células madre sembradas.¹⁰¹

Probablemente la categoría más conocida es la clasificación según su origen. Gathani K, Raghavendra S.^{98,102}

- Andamios Biológicos o Naturales: Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Fibrina Rica en Plaquetas (PRF), Coagulo Sanguíneo, Colágeno, Chitosan, Acido Hialuronico, Matriz dentinaria desmineralizada.^{98,102}
- Andamios Artificiales o Sintéticos: Polímeros y Biocerámicos.⁹⁸

El primer andamio endógeno reportado en la literatura es el coágulo sanguíneo (Blood Clot en inglés-BC). La coagulación sanguínea es el proceso natural por medio del cual la sangre se transforma de estado líquido a gel.

Esto ocurre por el sistema hemostático que buscará sellar rápidamente y minimizar la hemorragia. La hemostasia está regulada por tres eventos que ocurren rápida y secuencialmente; la vasoconstricción, la formación del tapón plaquetario y la coagulación, para poder formar el coágulo sanguíneo también conocido como red de fibrina. Importante que en este proceso, las plaquetas sufren un proceso conocido como desgranulación, en el cual liberan múltiples FC, de importancia en el ámbito endodóntico; el FC derivado de plaquetas (PDGF), que interviene en la regulación del crecimiento y división celular, además de jugar un rol significativo en el proceso de angiogénesis.¹⁰³

El coágulo sanguíneo tiene muchas ventajas en comparación con otros andamios, se evitan reacciones alérgicas y representa bajo costo para el paciente. Provocar el sangrado para facilitar la reparación es un procedimiento quirúrgico común, propuesto por varios clínicos con la esperanza de guiar la reparación del tejido pulpar dentro del conducto radicular.^{104,105} Se ha demostrado que coopera en la migración de células progenitoras, macrófagos y fibroblastos, además las células atrapadas en el liberan factores esenciales para la regeneración.^{106,107.}

La técnica para inducir la formación del coágulo dentro del conducto que ha sido descrita en los reportes de la literatura se basa en la sobreinstrumentación del conducto, con explorador endodóntico o limas de endodoncia que sobrepasen la longitud del conducto radicular. El sangrado

debe detenerse a una distancia de 3mm de la unión cemento-esmalte para permitir la colocación del material que sellará el conducto en su tercio coronal.³³⁻¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Algunos estudios han demostrado éxito en RE utilizando el coágulo sanguíneo como único andamio en el procedimiento¹¹¹⁻¹¹³, sin embargo, otros investigadores no han logrado inducir sangrado dentro del conducto^{114,115}, representando un inconveniente para el procedimiento.

Varios autores, sugieren no atribuir la ingeniería tisular a la formación del coágulo sanguíneo, ya que la concentración y composición de las células atrapadas en la red de fibrina es impredecible. Esto es una limitación crítica con respecto a los procedimientos regenerativos que solo utilizan esta red como andamio, ya que la ingeniería de los tejidos está fundamentada en la liberación de concentraciones efectivas para restaurar funciones de un nuevo tejido. Es posible que las variaciones en concentraciones y composiciones celulares de pacientes mayores sean desfavorables (donde la concentración de células madre circulantes puede estar disminuida) y puedan afectar los resultados del tratamiento.¹⁰²

Recientemente los concentrados plaquetarios han mostrado un gran aporte al proceso regenerativo por incrementar la concentración de FC y aumentar la proliferación celular cuando se comparan con el coágulo sanguíneo.¹¹⁶ Las matrices autólogas han cobrado popularidad en los protocolos

recientemente implementados, su alta biocompatibilidad y bajo costo puede que sean características que juegan a favor.^{51,117,118)} El plasma rico en plaquetas (PRP) es considerado un concentrado plaquetario de primera generación rico en factores de crecimiento, forma un gel el cual da la estructura tridimensional al andamio. La concentración plaquetaria en PRP excede 1 millón/ml; 5 veces más que el conteo normal plaquetario. Si hay mayor número de plaquetas, habrá mayor cantidad de factores de crecimiento liberados por este linaje celular que ayudará a la proliferación de células madre y así inducir reparación y regeneración de tejidos. Los FC aislados en este concentrado son PDGF, TGF- β , IGF, VEGF, Factor de crecimiento epidermoide (EGF) y Factor de crecimiento epitelial (ECGF), liberados por degranulación plaquetaria que a su vez estimulan la reparación de hueso y tejido blando.^{21,118-122} La desventaja de este procedimiento es la necesidad de equipos especiales (centrífuga) que incrementan el costo del tratamiento. Otro problema técnico del PRP es el control de la liberación de los FC, que sugiere ser rápido, perdiendo la sustentabilidad en el tiempo. Para mejorar este inconveniente se ha sugerido que el PRP puede mezclarse con colágeno, hidrogel u otros andamios sintéticos para solidificar la estructura y modelar la velocidad de degradación.^{51,123-125}

Hoy día se utiliza frecuentemente Fibrina rica en plaquetas (PRF) también conocido como PRF de Choukroun en atributo a su descubrimiento.¹²⁶ A diferencia del PRP, el procedimiento del PRF es más sencillo, tomando la

muestra de sangre, colocándola en tubos de ensayo, y sin necesidad de anticoagulantes y sustancias activadoras, se obtiene la matriz luego de un centrifugado inmediato. La centrífuga se utiliza por 10min a 3000 rpm o por 12min a 2700rpm, protocolo establecido bajo los parámetros de Choukroun. El clínico observará tres (3) capas después del centrifugado; 1/3 superior Plasma acelular pobre en plaquetas, 1/3 medio Coagulo de PRF (color amarillento), 1/3 inferior células sanguíneas (color rojo). Las propiedades biológicas del PRF sugiere calificarlo como un concentrado inmune con una composición específica y arquitectura en 3D, los FC obtenidos son PDGF, TGF- β 1 y IGF.^{126,127} Importante destacar que la Fibrina es la guía natural para el proceso de angiogénesis, además constituye un apoyo natural a la inmunidad.^{126,128}

Aunque los estudios no muestran diferencias significativas entre los resultados observados con el uso de coagulo sanguíneo, PRP y PRF como andamios en RE, no se debe descartar que un coagulo sanguíneo contiene 95% de células rojas, 5% de plaquetas, <1% de células blancas y numerosas bandas de fibrina, en contraste el PRP, puede contener 4% de células rojas, 95% de plaquetas y 1% de células blancas. Actualmente, la fibrina rica en plaquetas (PRF) ha mostrado no solo poseer cifras mayores al PRP, además está asociada con una liberación lenta e incremental de niveles de citoquinas, con un gran potencial de favorecer el proceso regenerativo en unidades dentarias permanentes inmaduras con diagnóstico de necrosis

pulpar.¹¹⁶

El uso de cementos a base de silicato de calcio como el MTA, para utilizarlo en función de barrera coronal para sellar el conducto es el material de elección en procedimientos regenerativos.⁵¹ Sin embargo, estudios resaltan que el uso de MTA sobre el coágulo sanguíneo, PRF, PRP u otros andamios han mostrado calcificación intraconducto.¹²⁹⁻¹³⁵ Incluso reportes de caso han demostrado la formación de puentes de tejido duro debajo del MTA¹³⁶, y calcificación dispersa en el conducto cuando alguna porción de MTA alcanza la longitud del canal radicular.^{129,137} Por tanto se debería enfatizar el uso de una barrera de colágeno para controlar de una manera más segura la colocación del MTA u otras barreras biocerámicas en RE.¹³⁸

Importancia de la Angiogénesis en RE

Adicionalmente la migración celular debe estar acompañada de la inducción del proceso de angiogénesis para proveer oxígeno y nutrientes y así mantener el metabolismo y supervivencia celular. Los términos vasculogénesis y angiogénesis deben diferenciarse; siendo el primero la formación de un plexo vascular primario a partir de una célula precursora en el embrión, en cambio la angiogénesis es la formación de un nuevo vaso sanguíneo a partir de capilares pre existentes. Este proceso es el responsable de crear la mayoría de los vasos sanguíneos durante procesos fisiológico y en condiciones patológicas. Para dar inicio a un proceso angiogénico debe haber insuficiencia de oxígeno y nutrición, condiciones que

estimularan numerosas moléculas como citoquinas, factores de crecimiento pro angiogénicos e inhibitorios, moléculas de adhesión e incluso componentes de la matriz extracelular.¹³⁹⁻¹⁴⁰

La formación de un vaso sanguíneo comprende numerosas etapas, comenzando por la diferenciación de una célula madre en angioblastos que cooperaran en el ensamblaje de un cordón vascular primario. Este cordón también conocido como cordón mixto alberga futuras células endoteliales de arterias y venas concluyendo con un remodelado de vasos arteriales y venosos respectivamente.¹³⁹

Esta establecido que el éxito de la ingeniería tisular depende del transporte de oxígeno y nutrientes que lleguen a las células madre, independientemente si son trasplantadas (estrategia basada en células/ cell-based), o si han migrado a la superficie dentinaria desde la papila apical (estrategia libre de células- cell free/cell-homing). La actividad de las células de la pulpa dental humana ha sido estudiada para confirmar su capacidad secretora de factores proangiogénicos. Las células madre de la pulpa dental son capaces de inducir angiogénesis a través de su función paracrina; expresando una amplia cantidad de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor transformante beta (TGF-B); y por la estimulación en la migración de células endoteliales¹³⁹⁻

¹⁴² En el diagrama que se muestra a continuación se observa como el

suministro sanguíneo es necesario para la regeneración de tejidos, por tanto se podría hablar de tétrada de la Ingeniería Tisular.

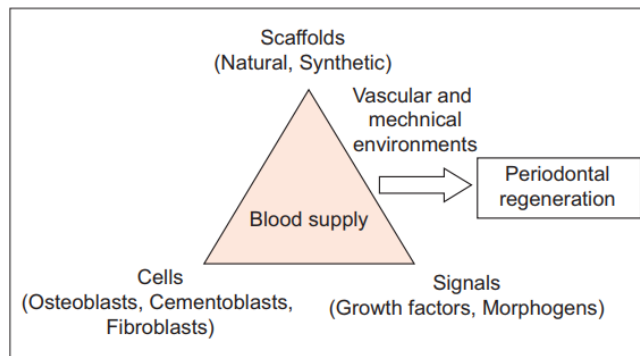


Figure 1: The tissue engineering triad

Journal of Indian Society of Periodontology - Vol 15, Issue 4, Oct-Dec 2011 143

Se ha demostrado que las células madre de la pulpa dental (DPSC), los fibroblastos y las células madre de la papila apical (SCAP) responden con la expresión de VEGF ante microambientes desfavorable como la hipoxia. La respuesta pro angiogénica es necesaria para iniciar y estabilizar un correcto proceso de regeneración. Estas afirmaciones resaltan la adaptabilidad de las células mesenquimales ante condiciones de estrés, lo que destaca su importancia en el manejo regenerativo de tejido isquémicos o necróticos.¹⁴⁴⁻

148

Consideraciones sobre la Infección en Endodoncia Regenerativa.

Todo procedimiento regenerativo está basado en procesos biológicos y fisiológicos complejos, siguiendo los lineamientos de la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) 2011 sobre la RE, se han implementado

diferentes protocolos clínicos demostrando que la terapia regenerativa es tan favorable como el tratamiento endodóntico convencional. Sin embargo, interrogantes sobre la respuesta inmunológica del paciente frente a procedimientos regenerativos en un contexto microbiológico, continúan sin una respuesta concisa. Por ejemplo, que importancia tendrá la presencia de microorganismos en el conducto radicular después de la desinfección y cómo afectará los resultados del procedimiento. Resaltar el valor de crear un microambiente con ausencia de infección que conduzca a la formación de un nuevo complejo pulpo dentinario es esencial en la IT.^{9,149}

La infección previa al procedimiento regenerativo, la importancia de la estructura y composición dentinaria para la migración y diferenciación de CS, las limitaciones de los desinfectantes implementados en la terapia, y las nuevas técnicas de desinfección diseñadas para erradicar los MO y biofilms en infecciones crónicas, deben ser la base del protocolo que decida aplicar el clínico.^{9,149,150}

Independientemente del proceso, sea reparación o regeneración de tejido, ambos ocurren en microambientes estériles o altamente desinfectados, donde la respuesta inmune del huésped no promueva tejido pro inflamatorio con carácter destructivo, por el contrario que estimule formación de tejido sano con el objetivo de reemplazar tejido inflamatorio. Se sugiere que la naturaleza del tejido formado dependerá de múltiples parámetros locales del ambiente donde se origina; como la dinámica que ocurra en las células

cercanas, la estructura del tejido remanente (dentina) y el grado de cronicidad de la infección.^{9,150-153}

El grado de cronicidad de la infección afecta directamente el proceso de reparación y/o regeneración, por el daño que ocasiona en las estructuras esenciales del huésped y en las células residentes de los tejidos periapicales y de la papila apical de dientes permanentes inmaduros. Infecciones de larga data con lesiones periapicales extensas puede eliminar la población celular periapical como las SCAP.⁹ En consecuencia el primer objetivo clínico en la RE debe ser la desinfección del conducto radicular. A parte de las SCAP, otras poblaciones celulares como osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos; capaces de formar tejido residente maduro; están presentes en el ligamento periodontal y hueso alveolar y sugieren tener mayor resistencia a los efectos de una infección establecida. Lo ideal sería evitar la migración de estas células residentes maduras de origen periodontal y estimular el reclutamiento de células madre para la formación del complejo pulpo dentinario.^{9,154-156} Además, la alteración de la estructura dentinaria debido a la infección crónica, desfavorece la adhesión celular y diferenciación. La microestructura prominente afectada son los túbulos dentinarios, que pueden ser invadidos por MO, o bloqueados por tejido mineralizado (dentina reparativa/secundaria) durante la infección crónica.^{46,157,158}

En consecuencia la evidencia científica demuestra que la presencia de infección en unidades dentarias inmaduras puede afectar las características

del tejido formado en el conducto radicular. Las observaciones histológicas previas en UD humanas infectadas con diagnóstico de necrosis y absceso apical crónico señalan que el tejido formado dentro del conducto está compuesto por tejido parecido a ligamento periodontal, tejido conectivo fibroso y tejido mineralizado integrado a la estructura dentinaria semejante a hueso y cemento.^{159,160} En contraste, la regeneración del complejo dentino pulpar con células parecidas a odontoblastos ha sido reportada en dientes humanos inmaduros con pulpitis irreversible sin lesión apical, donde el abordaje clínico fue una revascularización.¹⁶¹

Microambiente para la Regeneración del Complejo Pulpo Dentinario.

La interacción entre las células y las superficies biológicas donde se desenvuelven, puede revelar el valor de la microestructura dentinaria para la regeneración del complejo dentino pulpar. Esta interacción puede determinar la migración, alineación y muerte celular¹⁶²⁻¹⁶⁶, por ende el entorno donde las células migran en el espacio del conducto radicular es crítico para el proceso de RE. Citado con anterioridad, la microestructura dentinaria afectada por una infección de larga data, puede ser acondicionada para permitir la adherencia y diferenciación celular con agentes químicos. Conjuntamente la dentina correctamente tratada será capaz de liberar factores de crecimiento endógenos, que pueden controlar diferentes funciones celulares cooperando al éxito del tratamiento.⁷⁷

Las células migran para contribuir al desarrollo de tejidos, homeostasis o para alcanzar funciones especializadas. Esta migración dirigida es esencial para procesos biológicos como la morfogénesis, reparación y respuesta inmune.¹⁸ Las células son capaces de percibir la topografía o geometría de la superficie a la cual han migrado, y ajustar su alineación y potencial de diferenciación. Por lo tanto, se podría inferir que los túbulos dentinarios; como microestructuras geométricas, puedan ofrecer un campo ideal para la adhesión y diferenciación de las células reclutadas, siendo un factor significativo para determinar la regeneración del complejo pulpo dentinario y sus avances en los resultados histológicos. Como ha sido documentado en el campo de la mecánica de la ingeniería tisular, la geometría de las superficies biológicas puede determinar un componente significativo en RE.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Esto resalta la importancia de enfocar los abordajes clínicos en RE solo con agentes químicos, evitando el desgaste mecánico en las paredes dentinarias con instrumentos endodónticos, buscando preservar la geometría original de la superficie. En ausencia de un ambiente que dirija la migración celular, estas células realizarán movimientos aleatorios.¹⁶⁴

La geometría de la superficie dentinaria favorece el alojamiento de microorganismo, y en casos de infecciones crónicas aún con la preparación químico- mecánica pueden sobrevivir y aprovechar esta anatomía para permanecer dentro de los túbulos dentinarios.^{157,158} La persistencia de biofilm en la superficie de la dentina no permite una adecuada adhesión celular,

además el ambiente que enfrentaría la célula madre consiste en la respuesta de defensa del sistema inmune del huésped que busca erradicar el componente bacteriano.^{9,167,168} Este proceso inflamatorio establecido, interfiere con la proliferación y diferenciación de la CS. En caso, de verse afectada la acción de estas células madre mesenquimales, puede permitir que otras células residentes reparen con mayor rapidez la lesión con tejido de origen periodontal (ligamento periodontal, cemento y hueso), de la misma manera, esto solo ocurrirá una vez que el componente bacteriano ha sido removido y la inflamación decline.⁹

Dentina como Campo para la Endodoncia Regenerativa.

Para entender los procesos que ocurren en los tratamientos regenerativos, es necesario conocer los aspectos más importantes de la estructura en la cual realizamos el abordaje clínico. La dentina es el componente estructural más voluminoso del diente humano, encargado de proteger al tejido pulpar de microorganismos y de estímulos nocivos. Además ofrece soporte esencial al esmalte e indiscutiblemente participa en las reacciones defensivas del complejo dentino pulpar. El grosor de la dentina, desde la pulpa hasta la unión esmalte-dentina (Dentin Enamel Junction DEJ) depende del tipo de diente, generalmente ocupa un rango de 2-3mm. El grosor tiende a aumentar con la edad debido a la aposición fisiológica que continua en este tejido durante toda la vida.¹⁶⁹

Embriológicamente el diente deriva de dos tipos de tejido embrionario básico; el ectodermo que origina el esmalte, y el ectomesénquima que da origen a la dentina, la pulpa y los tejidos periodontales. El inicio de la formación del diente ocurre durante la sexta semana de vida embrionaria y se caracteriza por el engrosamiento localizado del ectodermo bucal, este crecimiento epitelial ocasiona la formación de la lámina dentaria. El desarrollo dental se divide en tres etapas secuenciales, denominadas de acuerdo con la morfología del germen dentario; 1. Estadio de brote, botón o yema, 2. Estadio de capuchón o casquete, 3. Estadio de campana.¹⁷⁰

En la etapa inicial, el germen dental asume la forma de un "botón", como consecuencia de la proliferación del epitelio de la lámina dental del ectomesénquima. La proliferación epitelial continua, origina el órgano del esmalte y forma una concavidad semejante a una "capucha". El germen dental aumenta y la invaginación se vuelve más profunda, produciendo una forma similar a una "campana", característica de esta etapa. El tejido localizado dentro de la invaginación es conocido como papila dental y será responsable de originar la dentina y la pulpa. Durante la etapa de campana, las células de la capa interna del órgano del esmalte se diferencian en ameloblastos. Seguidamente, las células de la capa externa de la papila dental se diferencian en odontoblastos por medio de un proceso iniciado y modulado por factores de crecimiento y moléculas señalizadoras, que son liberadas por células del epitelio interno de esmalte.^{169,170}

En consecuencia, los eventos anteriores responden a la interacción epitelio-mesénquima conduciendo a la diferenciación de odontoblastos y ameloblastos, responsables de la secreción de dentina y esmalte respectivamente. Los factores de crecimiento (FC) son las moléculas de señalización celular difusibles que pasan entre los compartimentos epiteliales y mesenquimatoso del germen dental y son responsables de estas interacciones.¹⁷¹

Durante el estadio de campana las células periféricas de la papila dental se diferencian en odontoblastos por efecto de las moléculas de señalización provenientes del epitelio dental interno, los FC; en especial la familia del Factor Transformante- β (TGF- β) son los mediadores de señalización más importantes para que ocurra esta diferenciación.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ La secreción de estos FC por el epitelio dental interno proporciona el control de los procesos que ocurren en el germen dental. Sin embargo, en un diente permanente, debe ocurrir un proceso similar que permita la diferenciación de una nueva generación de células parecidas a odontoblastos para la formación de dentina. Frente a la ausencia de epitelio dental en situaciones de reparación y/o regeneración, ha sido necesario encontrar alternativas que conduzcan a un proceso de señalización. Se ha logrado aislar los componentes de la matriz dentinaria a través de la desmineralización de la misma, descubriendo que estos son capaces de inducir dentinogenesis.¹⁷⁵ Esto implica que la matriz dentinaria tiene componentes bioactivos y no es tan inerte como se

presumía en años anteriores. Las proteínas colágenas y no-colágenas de la dentina se han estudiado, sin embargo, el énfasis se ha realizado cuantitativamente, resaltando los elementos que más se consiguen en esta matriz. Ahora ha sido posible identificar los FC incluidos en la matriz dentinaria; aunque no superan en cantidad a otras moléculas, tienen un potente efecto biológico. La capacidad de mantener su actividad biológica estando sepultados en la matriz dentinaria dependerá de la interacción que tengan con otros elementos de la misma.^{94,171,176} Esta interacción sugiere ser bastante precisa, ya que en el diente humano, los odontoblastos son capaces de secretar 3 Isoformas de TGF (TGF-1, 2,3), pero solo el TGF-1 queda secuestrado en la matriz dentinaria.¹⁷⁷ La interacción con otros componentes de la matriz puede ser importante para proteger la actividad biológica de los FC, ya que su vida media es de pocos minutos cuando existen en su estado libre en suero.¹⁷⁸ Es de suma importancia reconocer que las células al estar expuestas frente a gran cantidad de FC en un ambiente que puede cambiar por condiciones pulpaes o condiciones externas del medio bucal, conducen a respuestas celulares complejas y poco predecibles. La respuesta celular no está condicionada a la actividad individual que genera un FC específico, el comportamiento bajo condiciones extremas; como presencia de bacterias, inflamación pulpar, necrosis y exposiciones pulpaes, puede modificar la liberación del FC y contribuir a efectos impredecibles durante la reparación y/o regeneración.^{171,179,180} En consecuencia, no puede sorprendernos que el abordaje clínico del complejo

pulpo-dentinario no sea siempre tan predecible como se desea, incluso en condiciones ideales.¹⁷¹

La microestructura de la dentina está dominada por sus túbulos, responsables de alojar el proceso odontoblasticos. Un tejido altamente mineralizado rodea el lumen de cada túbulo, conocido como dentina peritubular, compuesta principalmente por cristales de apatita y una pequeña porción de proteínas orgánicas. Además el espacio entre cada túbulo es ocupado por la dentina intertubular con gran cantidad de fibras colágenas reforzado con apatita.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Los túbulos dentinarios se extienden por todo el espesor de la dentina y presentan conformación cónica, con el diámetro mayor hacia la pulpa (2,5-4 micrómetros) y el diámetro menor hacia la periferia, cerca del esmalte o cemento (0,1-0,9 micrómetros). La densidad tubular también es mayor cerca de la pulpa con un promedio de 65.000 túbulos por mm², cuando se compara con 15.000 túbulos por mm² cerca de la unión amelodentinaria. Los túbulos asociados con pulpa vital contienen fluido dentinario, procesos odontoblasticos, terminaciones nerviosas (detectadas hasta 100 micrómetros de profundidad), colágeno tipo I, proteoglicanos y otras proteínas. Como consecuencia de la presencia del contenido tubular, el diámetro funcional o fisiológico de los túbulos dentinarios corresponde apenas del 5% al 10% del diámetro anatómico observado por medio de microscopia.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

La mineralización de la dentina es un proceso complejo regulado por la matriz colágena que en su mayoría contiene fibras colágenas tipo I, proteínas no colágenas (NCPs) y minerales. La Sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) forma parte de las NCPs aisladas en la matriz, a partir de su división proteolítica da origen a la Fosfoproteína dentinaria (DPP) y a la Sialoproteína dentinaria (DSP) importantes para la mineralización de la dentina.¹⁸¹⁻¹⁸⁶

Luego de la maduración de los odontoblastos, estos son capaces de secretar una matriz extracelular (ECM), que primeramente no está mineralizada, llamada pre dentina. La ECM en razón de horas se transforma en dentina luego de la mineralización de fibras colágenas, adicionalmente la secreción de pre dentina se continua, repitiendo el proceso. La transformación de pre dentina en dentina envuelve numerosos cambios en la ECM y la deposición de cristales de hidroxiapatita alrededor de las fibras colágenas, además, las proteínas de la matriz, proteoglicanos y lípidos juegan un papel importante en el proceso.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ La mineralización durante la dentinogenesis aparenta ser un evento controlado, resultando en la formación de cristales formados inicialmente en regiones ausentes (GAP REGIONS) de fibras colágenas. La mineralización no utiliza las fibras colágenas como única fuente de sustrato, intervienen proteínas no colágenas de la matriz dentinaria. Incluso, inicialmente la mineralización comienza con la adhesión entre las proteínas fosforiladas de la ECM y los iones de calcio y fosfato, esta unión toma lugar en los espacios libres de fibras colágenas,

dando origen a la conformación de una proteína tridimensional que conduce posteriormente a formar el cristal de hidroxiapatita. Es un proceso complejo, el cual se consiguió entender gracias a numerosas investigaciones donde se logró aislar y caracterizar las proteínas de la matriz dentinaria. La base de estas investigaciones ha permitido hoy en día la posibilidad de identificar el tejido formado en RE, ya que su presencia en el cuerpo humano es exclusiva del tejido dentinario. Estas dos proteínas se conocen como Fosfoproteína Dentinaria (DPP) y Sialoproteína Dentinaria (DSP).¹⁸⁹⁻¹⁹¹ El colágeno es el primer componente orgánico más abundante en la dentina y la DPP es el segundo. Es una proteína rica en ácido aspártico y fosfoserina, y se encarga de unir grandes cantidades de calcio; su estructura tiene un significado importante en el inicio de la mineralización. La DPP parece ser secretada en el frente de mineralización donde se une a las fibras colágenas, resultando una estructura tridimensional de grupos fosfatos y carboxilos capaces de iniciar la formación del cristal de apatita. Estos cristales comienzan a crecer por la unión de más DPP y otras proteínas fosforiladas ayudando a determinar su forma y tamaño.^{184, 190}

La DSP; glicoproteína rica en ácido aspártico, serina, ácido glutámico y glicina, es secretada por odontoblastos y pre-ameloblastos lo que indica que interviene en procesos celulares durante el desarrollo del diente. Además se ha demostrado su efecto regulador en la formación y crecimiento de cristales de apatita en estudios in vitro. En bajas concentraciones de DSP promueve

la formación de nuevos cristales de apatita, por el contrario en altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio lo que sugiere su participación como elemento regulador de la mineralización.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷

A través de la inmunohistoquímica con anticuerpos de DSP es capaz de revelar la diferenciación de células en fenotipos parecido a odontoblastos. La capacidad de sintetizar la matriz de colágena tipo I por parte de célula parecida a odontoblastos junto con la presencia de proteínas no colágenas coordinaran y controlaran las interacciones necesarias para la formación de cristales de hidroxiapatita.¹⁹¹

La dentina como estructura, es compleja, y además responde a los efectos nocivos que pueda sufrir con un mecanismo de defensa. Como respuesta a una irritación externa (abrasión, corrosión, trauma, preparaciones cavitarias y/o caries) se forma dentina terciaria para incrementar el grosor del tejido mineralizado, que actuara como barrera entre la microbiota bucal y el tejido pulpar. Se presentan dos formas de dentina terciaria; la dentina reactiva (producida por odontoblastos primarios) y la dentina reparativa/esclerótica, producida por nuevos odontoblastos, donde el fosfato de calcio que se disuelve del cristal de apatita se difunde a la profundidad del túbulo dentinario y se precipita. Es importante reconocer el potencial reparativo y defensivo de la dentina, incluso en ambientes sépticos, parece ser un tejido dinámico con capacidad de reaccionar y proteger al complejo dentino-pulpar.¹⁹²

Soluciones Irrigadoras en Endodoncia Regenerativa.

Hipoclorito de Sodio (NaOCl)

El hipoclorito de sodio fue producido por primera vez en 1789, en Javelle, Francia, incluyendo gas de cloro en una solución de carbonato de sodio. El líquido resultante conocido como “Agua de Javelle” era una solución débil de hipoclorito de sodio. Sin embargo, este proceso no era muy eficiente y surgieron métodos alternativos para alcanzar niveles bajos de cloro disponible. Es así como nacen las soluciones de hipoclorito de sodio para ser utilizadas como antiséptico hospitalario bajo el nombre de Solucion de Dakin; hipoclorito al 0.5%, implementado como irrigante de heridas durante la primera guerra Mundial.¹⁹³

Cuando el hipoclorito contacta con proteínas tisulares, se forma nitrógeno, formaldehído y acetaldehído. Las uniones peptídicas se rompen para disolver las proteínas. Durante este proceso, el hidrogeno en el grupo amino (-NH-) es reemplazado por cloro (-NCl-) formando cloraminas, las cuales juegan un papel importante en la efectividad microbiana. Estrela et al. reportaron que el NaOCl actúa como solvente orgánico, degradando ácidos grasos y transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol), reduciendo la tensión superficial de la solución remanente (reacción de saponificación).^{193,194}

El NaOCl neutraliza aminoácidos formando agua y sales (reacción de neutralización). Con la salida de los iones hidroxilos hay una reducción del pH. Cuando el cloro se disuelve en agua y está en contacto con materia orgánica, forma ácido hipocloroso (HClO); un ácido débil con potencial oxidante. Este ácido actúa como solvente, liberando cloro que combinado con el grupo amino forma las cloraminas (reacción de cloraminación); que interfieren en el metabolismo celular. La molécula de cloro como potente oxidante, presenta acción antimicrobiana por inhibición de las enzimas bacterianas, a través de una oxidación irreversible de los grupos sufhidrilos (SH) presentes en estas enzimas.¹⁹⁴

El hipoclorito de sodio es una base fuerte con $\text{pH} > 11$, su efecto antimicrobiano basado en su alto pH consiste en interferir en la integridad de la membrana citoplasmática de la bacteria con una inhibición enzimática irreversible, además causa alteraciones en el metabolismo celular y degradación fosfolipídica.¹⁹³

El NaOCl es el irrigante de elección a nivel endodóntico por su capacidad de disolver materia orgánica y amplio espectro antimicrobiano, utilizado en concentraciones que varían desde el 0,5% a 6%.¹⁹⁵ Existe controversia sobre el uso de las diferentes concentraciones durante el tratamiento. Algunos estudios demuestran que el NaOCl en altas concentraciones es más efectivo contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.¹⁹⁶ En contraste, estudios clínicos han afirmado que concentraciones altas y bajas de NaOCl tienen un

efecto similar en la reducción de bacterias del conducto radicular. Sin embargo, el NaOCl sigue siendo el irrigante “gold standard” en términos de eficacia antimicrobiana con diferencias estadísticamente significativas en comparación con otros irrigantes, sin tener unanimidad en la concentración ideal que debe ser usada durante la terapia endodóntica convencional.¹⁹⁷

Hipoclorito de Sodio en RE

El desarrollo de una necrosis pulpar por consecuencia de trauma o caries, pone en riesgo al diente inmaduro, comprometiendo la longitud radicular, el grosor de las paredes dentinarias y la maduración del ápice. El diente se considera estructuralmente débil, en término de soportar cargas masticatorias normales, siendo susceptible a la fractura cervical de la raíz. La primera consideración clínica de la RE es la desinfección del sistema de conducto radicular.¹⁹⁸⁻²⁰¹ La irrigación con NaOCl siempre ha sido parte del protocolo de desinfección en RE tanto en estudios animales^{131, 202,203}, como en reporte de casos clínicos.^{110,114,204,205} Concentraciones de NaOCl al 1.25%¹¹⁰, 2.5%²⁰⁶, 5.25%^{204,205,33} y 6%^{205,207} han mostrado resultados clínicos satisfactorios.²⁰²

Entre diferentes materiales alcalinos, el NaOCl ha sido incluido en el 97% de los protocolos clínicos en endodoncia regenerativa.^{20,198} La AAE sugiere utilizar NaOCl para la desinfección, con una técnica que minimice la posibilidad de extrusión del irrigante al espacio periapical; propone el uso de

una aguja con terminal cerrado con ventana lateral y apunta al uso del EndoVac. Alude el uso de NaOCl en un volumen de 20ml por conducto en concentración de 1.5%.²⁰¹ Se recomiendan bajas concentraciones de NaOCl ya que se ha demostrado en estudios *in vitro*, que concentraciones de 6% disminuyen significativamente la supervivencia de las SCAP.^{198, 208,209} Concentraciones de 1.5% de NaOCl tienen mínimo efecto destructivo sobre estas células.²⁰⁹ Sin embargo, las concentraciones sugeridas varían entre el rango de 0.5% y 5.25%. La citotoxicidad del NaOCl es proporcional a su concentración, por tanto la concentración de 2.5% parece ser segura en cuanto a eficiencia y baja toxicidad.²¹⁰

Se ha dedicado un esfuerzo significativo para dilucidar como alcanzar una máxima desinfección con el mínimo efecto perjudicial posible en el potencial regenerativo de las células madre.²¹¹ La IT en endodoncia debe tener la premisa que un protocolo de desinfección exitoso, compatibles con las células presentes, es un pre requisito para la regeneración. Incluso se sugiere agregar a la triada descrita por Langer y Vacanti (células madre, factores de crecimiento y andamios), un elemento adicional, la desinfección del conducto radicular.²¹² No menos importante, existe evidencia significativa que los irrigantes utilizados pueden alterar la viabilidad y potencial de diferenciación de las células madre, modificar la biodisponibilidad de factores de crecimiento, y variar las propiedades de los andamios utilizados en RE.^{11,}

La evidencia demuestra que la papila apical y su población de células madre residentes son capaces de sobrevivir en presencia de infección y periodontitis apical avanzada.^{17,59} La papila apical parece tener características que le permiten no solo sobrevivir a infecciones, además reacciona a esta amenaza de manera favorable para la reparación y/o regeneración; este aumento de actividad celular causado por hipoxia, incrementa la capacidad de proliferación y diferenciación de las SCAP. La razón se puede explicar por la baja vascularización de la papila apical; menor cantidad y densidad de vasos sanguíneos en comparación con la pulpa dental vecina. Por el contrario, el tejido dental más vascularizado y en íntimo contacto con la papila apical es el folículo dental, por tanto, la papila dental posee pocas demandas metabólicas en estado inactivo, y adquiere sus nutrientes e intercambio gaseoso primeramente por difusión del tejido vecino.^{59,212} Probablemente lo anterior, sugiera un indicio de la presencia de la papila apical y su población celular a pesar de una necrosis pulpar total del conducto.^{59, 63, 212,214} Sin embargo, no se debe confundir la capacidad de supervivencia de la papila apical frente a necrosis pulpar, con el potencial de diferenciación de las SCAP en presencia de biofilm y antígenos durante procedimientos regenerativos. El ambiente donde se espera el potencial de actividad celular máxima, debe estar libre de infección.²¹²

Estudios sobre el comportamiento de las SCAP en microambientes contaminados, muestran que la dentina libre de infección permite una

adecuada proliferación y diferenciación de este linaje con expresión de marcadores celulares positivos para células parecidas a odontoblastos. Por el contrario, en presencia de infección, las SCAP mostraron marcadores celulares de células parecidas a osteoblastos.^{212, 215} Unidades dentarias con ausencia de biofilm bacteriano muestran mineralización en las paredes dentinarias consistente con osteodentina que se evidencia en radiografías con engrosamiento de las paredes del conducto.^{212, 214,216} Sin embargo, poco engrosamiento de las paredes dentinarias se ha observado tanto radiográfica como histológicamente en dientes con presencia de biofilm persistente incluso en ausencia de lesión apical. La ausencia de inflamación apical con presencia de biofilm persistente sugiere ser un cúmulo de antígenos que pueden influenciar el microambiente dentinario. En conjunto, los estudios anteriores apoyan que el biofilm resistente y/o antígenos remanentes en conductos pobremente desinfectados tienen un efecto regulatorio en el potencial de diferenciación de las células madre. Este problema tiene relevancia clínica, con posible respuesta a la mineralización ectópica/defectuosa de conductos radiculares y la falta de diferenciación odontoblástica que se ha observado en varios estudios histológicos de dientes con tratamientos de RE.^{136, 137, 159, 160, 212, 217, 218}

La desinfección del conducto radicular es el primer paso que se debe abordar para alcanzar el objetivo de promover el desarrollo radicular normal en un diente permanente inmaduro con diagnóstico de necrosis pulpar, para

luego permitir el ingreso de las células madre a un ambiente aséptico que promueva su correcta actividad celular. La supervivencia de las SCAP durante la desinfección es esencial para el proceso regenerativo. La elección del irrigante ideal para este procedimiento debe tener como prioridad conservar la función de estas células permitiendo que la regeneración se alcance con éxito.^{219,220}

El hipoclorito de sodio ha probado ser un irrigante efectivo por su habilidad de eliminar el biofilm bacteriano y disolver tejido necrótico. No obstante, una desventaja del NaOCl es la toxicidad que puede afectar las células PDL y SCAPs, y la morbilidad asociada a la extrusión del mismo más allá de los confines de la unidad dentaria.^{219,221} Múltiples estudios *in vitro* se han enfocado en determinar el efecto de diferentes concentraciones de NaOCl sobre las SCAP; comprobando que altas concentraciones (5.25% y 6%) son efectivas en cuanto a su actividad bacteriostática, bactericida y disolución de tejido infectado, no obstante son citotóxicos para poblaciones celulares como fibroblastos, PDL, SHEDs y SCAPs. Además la irrigación con NaOCl al 6% tiene un efecto negativo en la supervivencia y diferenciación de células madre, conjuntamente reduce la adhesión celular a las paredes dentinarias cuando contactan con la dentina tratada con esta concentración.^{3,209} Se ha sugerido el condicionamiento dentinario con NaOCl al 1.5% favoreciendo la supervivencia y diferenciación de las SCAP en procedimientos regenerativos^{35,201,209,222}, con un volumen de 20ml en un tiempo comprendido de 5min por

cada conducto tratado, acompañado de un sistema de irrigación que minimice la posibilidad de extrusión al espacio periapical para lograr una desinfección química eficiente.^{201,223,224}

La técnica para liberar el irrigante del conducto también juega un rol importante en la desinfección, para alcanzar una mejor distribución, evacuación de detritus y biofilm microbiano. Algunas técnicas sofisticadas como el EndoVac (técnica de presión apical negativa) se conocen por lograr una desinfección superior y ser seguras durante el tratamiento. Sin embargo, estudios que comparan la efectividad antimicrobiana después del uso del EndoVac versus irrigación convencional (presión positiva con aguja) no muestran diferencias significativas en la reducción de bacterias entre ambos métodos. En contraste, la evaluación del tejido formado después del procedimiento regenerativo, muestra que la irrigación con EndoVac promueve mejor formación de tejido conectivo, vasos sanguíneos con evidencia de menor cantidad de células inflamatorias en comparación con la irrigación convencional.^{225,226}

La decisión crítica por parte del operador, sobre el uso de esta tecnología durante el procedimiento debe resultar del balance entre la eficacia de la desinfección, la preservación del ambiente del conducto y de los tejidos periapicales para promover el correcto desarrollo de nuevo tejido.²²⁷

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es una solución quelante con pH 7 que reacciona con los iones de calcio de la dentina formando quelatos de calcio solubles. Se ha reportado que el EDTA puede lograr descalcificar la dentina en profundidades de 20-30 micrómetros en 5min. El rol de este quelante de calcio permite la remoción del barro dentinario (smear layer) de las paredes del conducto y reduce la cantidad de moléculas de cloro liberadas por el NaOCl.²²⁸⁻²³⁰

En el año 1975, se publica la primera investigación que demuestra que el REDTA (una marca comercial de EDTA) puede remover el componente inorgánico que no logra disolver el NaOCl durante la terapia endodóntica convencional. Tanto en tratamientos de 1 o 2 citas, este quelante se alterna con frecuencia con el hipoclorito de sodio para alcanzar los objetivos de desinfección y limpieza intraconducto.^{231,232}

Diferentes presentaciones y combinaciones de EDTA han sido formuladas para usarlas como irrigante intraconducto. En combinación con peróxido de urea, conocida como RC-prep, (Premier Dental Products), se diseñó para ayudar a que los detritus adheridos a la superficie dentinaria puedan flotar con facilidad para ser retirados del conducto. Su presentación es un pasta, que deja como remanente cera en las paredes del conducto para facilitar la instrumentación, sin embargo, esto compromete la habilidad de obtener un

sello hermético.⁶ Varios estudios han comprobado que los agentes quelantes en presentación de pastas, tienen mejor efecto lubricante, mas no remueven el smear layer tan efectivamente como el EDTA líquido.²³³

Recientemente la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) ha incluido el uso de EDTA líquido al 17% dentro de sus consideraciones clínicas en procedimientos regenerativos.²⁰¹ Apoyan su uso tanto en la primera como en la segunda cita, a diferencia de su declaración anterior ²³⁴, donde el uso de EDTA no estaba contemplado en estos procedimientos. Esto se debe probablemente a la evolución que ha presentado el campo de la endodoncia regenerativa estos últimos años, y los nuevos hallazgos disponibles sobre la ingeniería de los tejidos.²⁰¹

Se ha evaluado la supervivencia de células madre de la papila apical (SCAP) bajo el efecto de diferentes irrigantes, donde se demostró, en un estudio *in vitro* que el condicionamiento dentinario con EDTA al 17% promueve la supervivencia de las SCAP, incluso cuando se ha utilizado NaOCl en altas concentraciones (6%). Importante que el uso de este irrigante, logra atenuar los efectos indeseables del hipoclorito de sodio.^{208,235} Asimismo, el EDTA consigue promover la formación de tejido parecido a la pulpa, con vasos sanguíneos y células polarizadas que se extienden hasta los túbulos dentinarios expresando marcadores celulares para la Sialoproteína dentinaria (DSP). Aunque el NaOCl tiene un efecto negativo en la dentina que resulta en una disminución en la presencia y diferenciación de células madre, estos

efectos pueden ser minimizados con el uso de NaOCl en concentraciones de 1,5% seguido de EDTA al 17%.²³⁵

Estos efectos quedan atribuidos a las propiedades únicas del EDTA sobre la superficie dentinaria. Como se comentó con anterioridad, la dentina alberga gran cantidad de proteínas beneficiosas para la quimiotaxis, adhesión, supervivencia y diferenciación celular; este grupo incluye a los factores de crecimiento (FC), por tanto el condicionamiento dentinario es un paso crítico para los procedimientos regenerativos. Las interacciones entre célula-célula, superficie dentinaria-célula, factor de crecimiento-célula ofrecen un ambiente ideal para las stem-cell y el desarrollo de sus funciones, resaltando la importancia del rol que cumple el EDTA de exponer la matriz extracelular (para la adhesión) y promover la liberación de las moléculas bioactivas (FC) incluidas en la dentina.^{17, 18, 208, 225, 235, 236}

Como se mencionó anteriormente, los FC son polipéptidos capaces de estimular la proliferación celular y actúan como moléculas reguladoras para células cultivadas *in vivo*, formando un componente esencial en la ingeniería tisular.^{3,51} Los procedimientos regenerativos en endodoncia se basan en usar moléculas de movilización como los FC, agentes quimiotácticos, entre otros elementos de señalización, para recibir en el conducto radicular, a las células migrantes de los tejidos periapicales. Estas proteínas sugieren ser esenciales para el éxito en la técnica cell-free en RE, y su fuente endógena reside en la matriz dentinaria.^{11,35,227,237-239} La habilidad del EDTA de exponer estos

componentes de la matriz dentinaria ha sido demostrada para comprobar el aumento de la respuesta regenerativa al utilizar este irrigante, beneficiando la migración, proliferación y diferenciación celular.²⁴⁰ El EDTA libera los FC de la matriz dentinaria que pertenecen a la familia de factores transformantes como el TGF- β .^{17, 18, 51} Cuando se busca el crecimiento de tejido pulpar dentro de un conducto radicular vacío, procesos como la angiogénesis pueden necesitar FC suplementarios en orden de desarrollarse con la mayor efectividad. En contraste, el NaOCl con su potencial citotóxico, potencial reductor de FC y efecto negativo sobre las SCAP, conduce a indicar como última solución irrigadora en procedimientos cell-homing el EDTA al 17%.^{18,}

209, 211

Al parecer, la activación ultrasónica del EDTA pueda incrementar la liberación de los componentes de la matriz dentinaria, como se ha demostrado que sucede con la dentina radicular en estudios de naturaleza periodontal ^(241,242). Sin embargo, investigaciones dedicadas a indagar el impacto de la irrigación con activación ultrasónica en la liberación de factores de crecimiento, comprueban que el uso de esta técnica incrementa la liberación de estas moléculas bioactivas pero muestran evidencia de erosiones y grietas en la superficie dentinaria.²⁴³

Efecto del EDTA sobre el coagulo sanguíneo

Como se ha citado anteriormente, en la estrategia cell-free el clínico induce la formación de un coágulo sanguíneo que actuará como andamio dentro del conducto, y es preciso recalcar que dicho coagulo estará en contacto directo con la superficie dentinaria previamente condicionada. Actualmente, se investiga la acción que pueda tener el EDTA sobre el coagulo sanguíneo. El proceso de coagulación involucra cantidad de células y factores de coagulación. Los iones de calcio, han sido reconocidos como co-factores ya que se requieren para la activación de plaquetas, y de los factores de coagulación II, VII, IX y X.²⁴⁴⁻²⁴⁶ En un conducto tratado con EDTA, los iones de calcio sufren quelación por el EDTA remanente en las paredes dentinarias y el resultado es la interrupción o retardo del proceso de coagulación. Lo anterior expuesto, no altera la indicación de este quelante en RE, sin embargo, resalta la importancia de no utilizarlo como irrigante final. Varios autores concuerdan en culminar el tratamiento con solución salina para evitar que el EDTA afecte las características morfogénicas y la formación de fibrina del coagulo inducido.²⁴⁵

Aún se mantiene vigente las consideraciones clínicas de la Asociación Americana de Endodoncia, que en acuerdo con varios investigadores, sugieren en la primera cita; irrigación con 20ml de NaOCl al 1,5% durante 5min, luego 20ml de EDTA 17% durante 5min previo a la medicación intraconducto. La segunda cita, planificada entre las 2-4 semanas siguientes;

solo indica como irrigante el EDTA 17% 20ml por conducto durante 5min, antes de la inducción del coagulo sanguíneo.^{225,231}

Análisis sistemáticos de procedimientos regenerativos han concluido, que la infección persistente ha sido la causa principal de fracasos en casos clinicos de RE, considerando como fracasos todo tratamiento que requiera una intervención endodontica adicional, o extracción de la unidad dentaria luego de culminar el tratamiento regenerativo previamente planificado.²⁴⁵ En la actualidad, el clínico debe realizar una decisión basada en evidencia sobre el tratamiento químico de las células madre, andamios y factores de crecimiento basado en los principios de desinfección. Esto requiere una interpretación de estudios clinicos previos, que deben incrementarse con investigaciones clínicas aleatorizadas para comprender la complejidad de los procedimientos regenerativos y así alcanzar resultados más predecibles.²²⁵

DISCUSIÓN

Un gran número de reportes han mostrado que los procesos regenerativos en endodoncia son posibles y exitosos. La evidencia disponible demuestra que la ausencia de infección intraconducto es necesaria para conducir a un proceso regenerativo del conducto radicular en dientes inmaduros, sin embargo, Nosrat et al (2012) expone una revisión sobre resultados desfavorables, a nivel radiográfico, en unidades dentarias inmaduras con historia de necrosis pulpar de larga data, además varios reportes de caso publicados revelan ausencia de regeneración del tejido pulpo dentinario.^{112,202,215,247-249} Actualmente se ha propuesto que el éxito de la regeneración pulpar necesita altos niveles de desinfección, se argumenta, que incluso en presencia de algún componente bacteriano residual, el tratamiento endodonto convencional puede resultar en reparación apical de los tejidos, por el contrario esto no aplica en la endodoncia regenerativa.²⁴⁷ Por su parte, Nair et al (2014) afirma que la desinfección adecuada en RE sigue siendo un desafío para el operador, adicionalmente en los dientes inmaduros de pacientes jóvenes las bacterias pueden penetrar con mayor profundidad dentro de los túbulos dentinarios en comparación con unidades dentarias de pacientes mayores.^{202,215,250,251} Desde que se ha acordado la ausencia de preparación mecánica en RE, es imperativo discutir el rol de los irrigantes utilizados para la desinfección del conducto radicular, sus propiedades y cómo podrían afectar el proceso regenerativo.²²⁵

La desinfección ha progresado en la última década, en los primeros reportes solo se resaltaba el uso del hipoclorito como irrigante en procesos de RE, en la actualidad se considera apropiado agregar EDTA al 17% para favorecer la proliferación y diferenciación de las células madre.²⁰¹

Entre todas las soluciones disponibles, el NaOCl es el irrigante utilizado por excelencia en la desinfección del conducto radicular incluyendo RE ^{20,59,252}, con características deseables como eficacia bactericida, capacidad de disolución de tejido; propiedades beneficiosas para la desinfección de dientes inmaduros en RE y tratamientos endodónticos convencionales.²²⁵ En terapias de pulpa vital, debido a la corta duración de su aplicación, concentraciones de 2,5%-6% solo tienen un efecto lesivo superficial en la dentina no mayor a 0.5mm, sin impacto negativo en el resultado clínico del procedimiento.²⁵³ En contraste, Trevino (2011) resalta que estas concentraciones de NaOCl utilizadas en RE, parecen modificar negativamente el microambiente del conducto radicular reduciendo la supervivencia y adhesión celular.^{35,208} Sin embargo, estos efectos negativos son dependientes de la concentración. Martin et al. (2012) afirma esta dependencia evaluando diferentes concentraciones de NaOCl (6%, 3%, 1,5%) en la supervivencia celular, demostrando que la dentina tratada con concentraciones de 6% muestra máxima muerte celular, a diferencia de concentración de 1,5% donde los efectos sobre las mismas parecen ser mínimos. Este testimonio, concuerda con otros estudios similares que

aseguran efectos negativos del NaOCl en altas concentraciones, con actividad clástica resultando en resorción de la superficie dentinaria, además disminuye significativamente la supervivencia de las SCAP.^{10,190,198,254}

En el 2010 Casagrande et al³ en su estudio *in vitro* evaluaron el potencial de diferenciación de células madre después de la irrigación con hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, han demostrado que el NaOCl al 6% también altera el potencial de diferenciación de células madre mesenquimales, produciendo una abolición total de la diferenciación odontoblástica.³ Por otra parte NaOCl al 1,5% no logra alterar la diferenciación odontoblástica de la células madre, afirmación que apoyan diversos investigadores.^{10,222,254}

En contraste, serie de casos reportados por Petrino J. et al²⁰⁴, utilizaron NaOCl al 5,25% en RE, procedimientos con 1 año de seguimiento, manifestaron ausencia de edema, eritema, tracto sinusal, sensibilidad a la percusión y palpación. Al examen radiográfico se evidenció reparación de la lesión apical, engrosamiento y alargamiento de las paredes dentinarias, adicionalmente respuesta positiva a las pruebas de sensibilidad pulpar. En conjunto, Shin S. et al²⁰⁷ utilizaron NaOCl al 6% en un procedimiento regenerativo de un premolar inferior con diagnóstico de necrosis y ápice abierto, durante el seguimiento post operatorio, a los 19 meses el paciente se mantuvo asintomático, la radiografía mostró reparación apical y maduración

de la raíz, sin embargo, a las pruebas de vitalidad no se observó respuesta positiva.²⁰⁷

Otros elementos del NaOCl han sido evaluados en diversos estudios de RE, el volumen sugerido por AAE de 20ml de hipoclorito por cada conducto tratado, concuerda con la mayoría de las investigaciones publicadas en los últimos años.^{198,211,255} Por el contrario, el tiempo en que debe mantener contacto el NaOCl con la superficie dentinaria muestra discrepancias. Autores como Diógenes et al²³⁵ sugieren un tiempo de 5min en contacto con la dentina para ejercer su completa acción, además de aprovechar todos sus beneficios, sin embargo Nosrat et al¹¹⁴ sugieren irrigación pasiva durante 20min en contacto con la superficie dentinaria.

En la búsqueda de mejorar la desinfección clínica en los procedimientos endodónticos regenerativos, crece el interés por crear un microambiente biológico favorable en el sistema de conductos radiculares incluyendo actualmente en los protocolos clínicos la irrigación con EDTA.^{3,59,190,201,211} Esta solución promete contribuir a la supervivencia de las SCAP en RE, reduciendo los efectos negativos del hipoclorito de sodio como último irrigante en contacto con la superficie dentinaria.^{35,208} El condicionamiento prolongado con NaOCl tiene un efecto tóxico directo e indirecto sobre la célula madre, el cual puede ser minimizado con el uso del EDTA.^{10,208, 237,256} Por lo expuesto anteriormente el EDTA está incluido frecuentemente en el protocolo de irrigación de las últimas publicaciones^{3,59,190,202,211}; Trevino et al

reportaron que el protocolo de irrigación incluyendo EDTA al 17% promueve la supervivencia de las SCAP, asimismo Martin et al afirmaron que la irrigación final con este quelante reversa los efectos negativos del NaOCl con respecto a la diferenciación y supervivencia de las células madre, apoyando así la idea de que el EDTA optimiza las condiciones ambientales para la regeneración de los tejidos. Sin embargo, esta solución, ahora sugerida dentro de las consideraciones clínicas de la AAE en RE²⁰¹, no fue incluida en ninguna publicación relevante antes del año 2012.^{32,33,110,257}

Probablemente, esto se debe a los últimos estudios que demuestran la capacidad del EDTA de exponer los factores de crecimiento incluidos en la dentina. Galler et al afirmaron que este quelante logra desmineralizar la dentina y presentar factores de crecimiento como el TGF-B1, FGF-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento fibroblástico, en adición a FC angiogénicos como el VEGF. Estas moléculas son altamente efectivas incluso en bajas concentraciones generando una respuesta celular; modificando la respuesta inmunológica, el proceso de angiogénesis, reclutamiento, proliferación, diferenciación celular y mineralización, procesos en los cuales se basa la regeneración endodóntica.^{11,17,190,239,258,259}

CONCLUSIÓN

1. Los procedimientos regenerativos endodónticos están basados en los conceptos de ingeniería tisular (IT) para lograr reestablecer estructural y funcionalmente el complejo pulpo dentinario en el conducto de dientes permanentes inmaduros afectados por caries y/o traumatismos.
2. Los procedimientos de endodoncia regenerativa son capaces de eliminar síntomas y/o signos clínicos del paciente además de resolver la periodontitis apical, sin embargo, el desarrollo radicular (engrosamiento de las paredes del conducto/ cierre apical) no es predecible en la totalidad de los casos.
3. La dentina contiene elementos bioactivos incluidos durante el proceso de dentinogénesis a nivel embriológico, estos componentes, los factores de crecimiento parecen tener un potente efecto biológico e intervienen en los procedimientos regenerativos. Tras el correcto condicionamiento de la dentina estos factores son expuestos y favorecen la interacción entre las células y las superficies biológicas donde se desenvuelven revelando la importancia de la microestructura dentinaria para la regeneración de complejo dentino pulpar.
4. El proceso de desinfección se ha convertido en un modulador crítico de la regeneración. Estrategias para minimizar la carga bacteriana y

maximizar la función de las células madre deben ser incorporadas en las terapias regenerativas.

5. La desinfección del conducto radicular es imprescindible para que ocurra regeneración de tejido, es necesario un microambiente estéril o altamente desinfectado, donde la respuesta inmune del huésped estimule formación de tejido sano con el objetivo de reemplazar tejido inflamatorio.
6. El Hipoclorito de sodio es el principal irrigante utilizado en RE, y concentraciones de 1,5%, con un volumen de 20ml en un tiempo mínimo de contacto con la superficie dentinaria de 5min, parecen ser seguras para mantener la supervivencia y potencial de diferenciación de las células madre, además de alcanzar la desinfección deseada en estos procedimientos.
7. El EDTA al 17% sugiere ser un irrigante necesario tanto en la primera como en la segunda cita en procedimiento de RE, con el objetivo de eliminar el biofilm adherido a las paredes del conducto y además exponer los componentes bioactivos incluidos en la dentina. Un volumen de 20ml tanto en la primera como en la segunda cita, en un tiempo comprendido de 5min en contacto con la dentina parece ser suficiente para alcanzar estos objetivos.

8. Adicionalmente a la triada establecida por la Ingeniería Tisular (células madre, factores de crecimiento y andamio), la angiogénesis debe ser incluida como elemento imprescindible. El desarrollo de este proceso es vital para la diferenciación y supervivencia de las células madre. Este proceso también es dependiente de un ambiente altamente desinfectado.
9. Se requiere mayor cantidad de estudios clínicos para alcanzar un mejor entendimiento del proceso regenerativo en Endodoncia.
10. Probablemente en un futuro cercano se pueda establecer un protocolo clínico para los procedimientos endodónticos regenerativos, basado en los nuevos hallazgos reportados en la literatura científica.

RECOMENDACIONES

- Los procedimientos endodónticos regenerativos deben ser el tratamiento de primera elección para el manejo de los dientes inmaduros con pulpa necrótica.
- Se recomiendan bajas concentraciones de hipoclorito de sodio (1,5%) con volumen de 20ml, en un tiempo comprendido entre 3-5min en RE, propiedades que han demostrado no afectar la integridad de las células madre.
- Ampliar las investigaciones sobre el efecto del EDTA al 17% como último irrigante en RE por sus efectos sobre el coágulo sanguíneo.
- Se recomienda utilizar una solución inerte como último irrigante que no altere las propiedades ni del coágulo sanguíneo ni de la dentina.
- Se recomienda continuar ampliando las investigaciones en este campo para disponer del mejor nivel de evidencia con estudios clínicos aleatorizados.

REFERENCIAS

1. Hargreaves K, Diogenes A, Teixeira F. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediat Dent J.* 2013 Mar; 35(2): 129-40.
2. Diogenes A, Henry M, Teixeira F, Hargreaves K. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics.* 2013; 28(1):2-23.
3. Kim S, Malek M, Sigurdsson A, Lin L, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J.* 2018; 51(12):1367-88.
4. Park Y, Cha S, Park Y. Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: a literature review. *Stem cells Int.* 2016.
5. Kim S, Kahler B, Lin L. Current developments in regenerative endodontics. *Curr Oral Health Rep.* 2016; 3(4): 293-301.
6. He L, Kim S, Gong Q, Zhong J, Wang S, Zhou X, Mao J. Regenerative Endodontics for Adult Patients. *J of Endod.* 2017; 43(9):57-S64.
7. Galler K. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J.* 2016; 49(10): 926-36.
8. Saghiri M, Asatourian A, Sorenson C, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J of Endod.* 2015; 41(6):797-803.
9. Kim S. Infection and pulp regeneration. *Dent J.* 2016; 4(1): 4.

10. Martin D, De Almeida J, Henry M, Khaing Z, Schmidt C, Teixeira F, Diogenes A. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J of Endod.*2014;40(1): 51-5.
11. Smith A, Duncan H, Diogenes A, Simon S, Cooper P. Exploiting the bioactive properties of the dentin-pulp complex in regenerative endodontics. *J of Endod.*2016;42(1): 47-56.
12. Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu H, Alzebdeh D, Badi M, Yang M. Release of growth factors into root canal by irrigations in regenerative endodontics. *J of Endod* 2016; 42(12): 1760-6.
13. Cao Y, Song M, Kim E, Shon W, Chugal N, Bogen G, Kang M. Pulp-dentin regeneration: current state and future prospects. *J of Dent Res.*2015;94(11): 1544-51.
14. Güven E, Karapinar-Kaz M, Tanalp J. Revascularization: a review of clinical reports on a contemporary treatment modality for endodontics. *Biomed Res J.* 2017; 28 (2): 644-56
15. Conde M, Chisini L, Sarkis-Onofre R, Schuch H, Nör J, Demarco F. A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation. *Int Endod J.*2017;50(9): 860-74.
16. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp regeneration: current approaches and future challenges. *Front Physiol J.* 2016;(7):58
17. Galler K, Buchalla W, Hiller K, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J of Endod.* 2015; 41(3): 363-8.
18. Galler K, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K, Hoffer P, Schmalz G. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and

differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2016; 49(6): 581-90.

19. Amrollahi P, Shah B, Seifi A, Tayebi L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Mat Sci Eng C-Mater J*. 2016; 69: 1383-90.
20. Kontakiotis E, Filippatos C, Tzanetakis G, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J of Endod*. 2015; 41(2): 146-54.
21. Bezgin T, Yilmaz A, Celik B, Kolsuz M, Sonmez H. Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *Journal of endodontics*. 2015; 41(1): 36-44.
22. Meschi N, Castro A, Vandamme K, Quirynen M, Lambrechts P. The impact of autologous platelet concentrates on endodontic healing: a systematic review. *Platelets J*. 2016; 27(7): 613-33.
23. Bindal P, Kasim N, Ramasamy T, Dabbagh A, Moharamzadeh K, Chai W. Dental pulp tissue engineering and regenerative endodontic therapy. *Biomater for Oral and Dent Tiss Eng*. 2017; (18): 297-318.
24. Fouad A. Microbial Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. *J of Endod*. 2017; 43(9): 46-50.
25. Antunes L, Salles A, Gomes C, Andrade T, Delmindo M, Antunes L. The effectiveness of pulp revascularization in root formation of necrotic immature permanent teeth: a systematic review. *Acta Odont Scandinavica*, 2016; 74(3): 161-9.
26. Kahler B, Rossi-Fedele G, Chugal N, Lin L. An evidence-based review of the efficacy of treatment approaches for immature permanent teeth with pulp necrosis. *J of Endod*. 2017; 43(7): 1052-7.

27. De Souza Araújo P, Silva L, Dos Santos Neto A, De Arruda J, Álvares P, Sobral A, Sampaio G. Pulp Revascularization: A Literature Review. *Open Dent J.* 2017;10:48.
28. Law A. Considerations for regeneration procedures. *Pediatr Dent J.* 2013;35(2):141-152.
29. Nygaard-Ostby B. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961.Dec;19:324-53
30. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res.* 1971;79(5):333-49
31. Horsted P, Nygaard-Ostby B. Tissue formation in the root canal after total pulpectomy and partial root filling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978.Aug;46(2):275-82
32. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001.Aug;17(4):185-7
33. Banchs F & Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol. *J of Endod.* 2004; 30(4): 196-200.
34. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatr Dent.* 2008; 30(3): 206-10.
35. Ring K, Murray P, Namerow K, Kuttler, S & Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J of Endod.* 2008; 34(12): 1474-79.
36. Vacanti C. The history of tissue engineering. *J of Cell and Molecular medicine.* 2006; 10(3): 569-76.

37. Vacanti CA, Vacanti JP. Functional organ replacement: The new technology of tissue engineering. Surg Technol Int London: Century Press. 1991; (1): 43–9
38. Gupta P, Gada S, Shetty, H. Regenerative Endodontics: An Evidence Based Review. J Cont Med A Dent. 2015; 3(1): 12-9.
39. Cruse WP, Bellizzi R. A historic review of endodontics, 1689–1963, part 1. J Endod. 1980; 6(3):495-9.
40. Nor J. Tooth Regeneration in operative dentistry. Oper Dent. 2006 Nov-Dec;31(6):633-42
41. Alrahabi M, Ali M. Root canal revascularization. The beginning of a new era in endodontics. Saudi Med J. 2014 May;35(5):429-34
42. Laschke M, Harder Y, Amon M, Martinl, Farhadi J, Ring A, Häufel J. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. Tissue Eng. 2006; 12(8): 2093-104.
43. Aranha A, Zhang Z, Neiva K, Costa C, Hebling J, Nör J. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. J of Endod. 2010; 36(10): 1633-7.
44. Saghiri M, Asatourian A, Sorenson C, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. J of Endod. 2015; 41(6): 797-803.
45. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. Int Endod J. 2018; 51(4): 405-19.
46. Kim SG, Zheng Y, Zhou J, Chen M, Embree MC, Song K, et al. Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. Endod Topics. 2013; (28) :106–17.

47. Suzuki T, Lee C, Chen M, Zhao W, Fu S, Qi, J et al. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J of Dent Res*. 2011; 90(8): 1013-8.
48. Huang G, Garcia-Godoy F. Missing concepts in de novo pulp regeneration. *J of Dent Res*. 2014; 93(8): 717-24.
49. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem cells and Cloning: Adv and Appl*. 2014; 7: 89.
50. Kim JY, Xin X, Moiola EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16:3023–31.
51. Duncan H, Kobayashi Y, Shimizu E. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. *Curr Oral Health Rep*. 2018;5(4): 276-85.
52. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom*. 2016; 56(4): 144-53.
53. Tatiana M. Botero and Jacques E. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. *Acad Press*. 2014; (33): 419-27
54. Potdar P, Jethmalani Y. Human dental pulp stem cells: applications in future regenerative medicine. *World J of Stem Cells*. 2015; 7(5): 839.
55. Asutay F, Acar H, Yolcu U, Kirtay M, Alan H. Dental stem cell sources and their potentials for bone tissue engineering. *J of Istanbul Univ. Faculty of Dentistry*. 2015; 49(2): 51.
56. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y, Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem

cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 61.

57. Martinez C, Hofmann T, Marino R, Dominici M, Horwitz E. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. (2007)
58. Demarco F, Conde M, Cavalcanti B, Casagrande L, Sakai V, Nor J. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011; 22(1):3-13.
59. Diogenes A, Henry M, Teixeira F, Hargreaves K. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics.* 2013; 28(1): 2-23.
60. Nuti N, Corallo C, Chan B, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Rev Rep.* 2016; 12(5): 511-23.
61. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J of Nat Sci, Biol, and Med.* 2015; 6(1): 29.
62. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb; 34(2):166-71.
63. Chrepa V, Pitcher B, Henry M, Diogenes A. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis. *J of Endod.* 2017; 43(4): 561-7.
64. Rao M. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(5):429-34
65. Ledesma-Martínez E., Mendoza-Núñez V, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. *Stem cells Int.* 2016.

66. Dubey N, Rosa V. Dental Stem Cells for Pulp Regeneration. In *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. Humana Press, Cham. 2016; (147-63)
67. Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. *J Endod* 2014; 40:538–42.
68. . Liu C, Xiong H, Chen K, et al. Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *Int Endod J* 2016;49:950–9
69. Bartold P, Gronthos S. Standardization of criteria defining periodontal ligament stem cells. *J of Dent Res*. 2017; 96(5):487-90.
70. Açil Y, Yang F, Gulses A, Ayna M, Wiltfang J, Gierloff M. (2016). Isolation, characterization and investigation of differentiation potential of human periodontal ligament cells and dental follicle progenitor cells and their response to BMP-7 in vitro. *Odontology*. 2016; 104(2):123-35.
71. Asutay F, Acar H, Yolcu U, Kırtay M, Alan, H. Dental stem cell sources and their potentials for bone tissue engineering. *J of Istanbul Univ. Faculty of Dentistry*. 2015; 49(2): 51.
72. Hong S Li, Cai W, Jiang B. The potential application of concentrated growth factor in regenerative endodontics. *Int Endod J*. 2018; (52)5
73. He L, Zhong J, Gong Q et al. Regenerative endodontics by cell homing. *Dental Clinics of North America* 2017; 61(1): 143–59.
74. Goustin A, Leof E, Shipley G, Moses H. Growth factors and cancer. *Cancer Res*. 1986; 46(3):1015-29.

75. Piva E, Silva AF, Nör JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod*. 2014; 40(4):S33–40.
76. Bottino MC, Pankajakshan D, Nör JE. Advanced scaffolds for dental pulp and periodontal regeneration. *Dent Clin N Am*. 2017; 61(4):689–711.
77. Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M, et al. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin N Am*. 2012; 56(3):563–75.
78. Duncan H, Smith A, Fleming G, Reid C, Smith G, Cooper P. Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDAC i). *Int Endod J*. 2017; 50(1):24-38.
79. He H, Yu J, Liu Y, et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008; 32(7):827–34.
80. D'Alimonte I, Nargi E, Mastrangelo F, et al. Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011; 25(1):57–69.
81. Alghilan MA, Windsor LJ, Palasuk J, Yassen GH. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J*. 2017; 50(7):667–75.
82. Zhang J, Lu X, Feng G, Gu Z, Sun Y, Bao G, et al. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell Tissue Res*. 2016; 366(1):129–42

83. Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative evaluation of chemotactic factor effect on migration and differentiation of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. 2017; 43(8):1288–93.
84. Jeanneau C, Lundy FT, El Karim IA, About I. 47. Potential therapeutic strategy of targeting pulp fibroblasts in dentin-pulp regeneration. *J Endod*. 2017;43(9):S17–S24.
85. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999; 18(14):3964–72
86. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; 94(2):241–51
87. Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, et al. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*. 2013;92(1):51–7
88. Yoshida N, Edanami N, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Hosoya A, Yoshida K. Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. *Int Endod J*. 2018; 51(11): 1187-95.
89. Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, et al. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod* 2013;39:228–35
90. Chmilewsky F, About I, Chung S-H. Pulp fibroblasts control nerve regeneration through complement activation. *J Dent Res* 2016;95:913–22

91. Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, About I. Pulp fibroblasts synthesize functional complement proteins involved in initiating dentin-pulp regeneration. *Am J Pathol.* 2014;184:1991–2000
92. Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, et al. Pulp progenitor cell recruitment is selectively guided by a C5a gradient. *J Dent Res* 2013; 92:532–9.
93. Jeanneau C, Rufas P, Rombouts C, et al. Can pulp fibroblasts kill cariogenic bacteria? Role of complement activation. *J Dent Res* 2015; 94:1765–72.
94. Sloan AJ, Matthews JB, Smith AJ. TGF-beta receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. *Histochem J.* 1999; 31:565–9.
95. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 1994;39:13–22
96. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008; 53:9–13.
97. Thakur L, Goel M, Sachdeva G, Katoch K. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *EC Dent Sci.* 2016; 3(4): 556-67.
98. Gathani K, Raghavendra S. Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dent Res J.* 2016; 13(5): 379.
99. Muschler G, Nakamoto C, Griffith L. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *JBJS.* 2004; 86(7):1541-58.
100. Sureshchandra B, Roma M. Regeneration of dental pulp: Amyth or hype. *Endodontology.* 2013; 13:139 54.

101. Neel E, Chrzanowski W, Salih V, Kim H, Knowles J. Tissue engineering in dentistry. *J of dent*. 2014; 42(8): 915-28.
102. Vemuri S, Kotha RS, Raghunath RG, Kandregula CR. Root canal revascularization via blood clotting in regenerative endodontics: Essentials and expectations. *J Dr NTR Univ Health Sci*. 2013; 2:235
103. Shiu H, Goss B, Lutton C, Crawford R, Xiao. Formation of Blood Clot on Biomaterial Implants Influences Bone Healing. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2014; 20(6):697–712.
104. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odont Scand* 1961; 19:324–53.
105. Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med & Oral Path*. 1974; 37:441–50
106. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008; 22:432–8.
107. Zhou R, Wang Y, Chen Y, Chen S, LyuH, Cai, Z., Huang X. Radiographic, Histologic, and Biomechanical Evaluation of Combined Application of Platelet-rich Fibrin with Blood Clot in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*. 2017; 43(12): 2034–40.
108. Murray P, Garcia-Godoy F, Hargreaves K. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *J of Endod*. 2007; 33(4), 377–90.
109. Huang G. (2008). A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *J of Dent*. 2008; 36(6): 379–86.

110. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediat Dent*. 2007; 29:47–50.
111. Flake NM, Gibbs JL, Diogenes A, et al. A standardized novel method to measure radiographic root changes after endodontic therapy in immature teeth. *J Endod* 2014; 40:46–50.
112. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2009; 35:1343–9.
113. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, et al. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod* 2014; 40:192–8.
114. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod*. 2011; 37:562–7.
115. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011;37:265–8.
116. Narang I, Mittal N, Mishra N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: a clinical study. *Contemporary clinical dentistry*. 2015; 6(1): 63.
117. Jadhav GR, Shah N, Logani A. Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior

teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. *J Conserv Dent.* 2013; 16:568-72.

118. Lata P, Chhabra A, Jindal V, Kaur D, Thakur AK. In vivo clinical evaluation of regenerative endodontics in immature necrotic permanent teeth with open apex. *Dent J Adv Stud.* 2015;3:26-33
119. Jadhav G, Shah N, Logani A. Revascularization with and without platelet rich plasma in non-vital, immature, anterior teeth: A pilot clinical study. *J Endod.* 2012;38:1581-7
120. Kaur P, Puneet VD. Platelet rich plasma: A novel bioengineering concept. *Trends Biomater Artif Organs.* 2011;25:86-90
121. Albanese MEL, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing.* 2013; 10:23.
122. Volpi P, Quaglia A, Schoenhuber H, Melegati G, Corsi MM, Banfi G, et al. Growth factors in the management of sport-induced tendinopathies: results after 24 months from treatment. A pilot study. *J Sports Med Phys Fitness.* 2010; 50:494–500.
123. Lyras DN, Kazakos K, Georgiadis G, Mazis G, Middleton R, Richards S, et al. Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing? *J Foot Ankle Surg.* 2011;50:276–82
124. Alsousou J, Ali A, Willett K, Harrison P. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets.* 2013;24:173–82.
125. Rodriguez IA, Gowney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int.* 2014

126. Hotwani K, Sharma K. Platelet rich fibrin – A novel acumen into regenerative endodontic therapy. *Restor Dent Endod* 2014; 39:1-6.
127. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:51-5
128. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Sam G. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. *J Conserv Dent* 2013;16:261-4
129. Altaii M, Richards L, Rossi-Fedele G. Histological assessment of regenerative endodontic treatment in animal studies with different scaffolds: A systematic review. *Dent Traumat.* 2017; 33(4): 235–44.
130. Da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109:779-87.
131. Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H et al. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2011;37:390-7
132. Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *J Endod.* 2011;37:1636-41

133. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J*. 2013; 46:910-22.
134. Khademi AA, Dianat O, Mahjour F, Razavi SM, Younessian F. Outcomes of revascularization treatment in immature dog's teeth. *Dent Traumatol*. 2014; 30:374-9.
135. Zhang DD, Chen X, Bao ZF, Chen M, Ding ZJ, Zhong M. Histologic comparison between platelet-rich plasma and blood clot in regenerative endodontic treatment: an animal study. *J Endod*. 2014; 40:1388-93.
136. Nosrat A, Kolahehdouzan A, Hosseini F, Mehrizi EA, Verma P, and Torabinejad M. Histologic outcomes of uninfected human immature teeth treated with regenerative endodontics: 2 case reports. *J Endod*. 2015; 41:1725-9.
137. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*. 2013;39:138-44
138. Ulusoy A, Turedi I, Cimen M, Cehreli Z. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J of Endod*. 2019; 45(5): 560-6.
139. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011; 146(6): 873-87.
140. Saghiri M, Asatourian A, Sorenson C, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J of Endod*. 2015; 41(6): 797-803.

141. Lambrichts I, Driesen R, Dillen Y, Gervois P, Ratajczak J et al. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. *Journal of endodontics*. 2017; 43(9): S12-S16.
142. Saghiri M, Asatourian A, Sheibani N. Angiogenesis in regenerative dentistry. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path and Oral Rad*. 2015; 119(1): 122.
143. Pandit N, Malik R, Philips D. Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration. *J of Ind Soc of Period*. 2011; 15(4): 328.
144. Aranha A, Zhang Z, Neiva K, Costa C, Hebling J, Nör J. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2010; 36(10), 1633-1637.
145. Manalo D, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly B, Shui Q, Semenza G. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005; 105(2): 659-69.
146. Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Gervois P, Wolfs E, & Lambrichts I. The angiogenic potential of DPSCs and SCAPs in an in vivo model of dental pulp regeneration. *Stem cells Int*. 2017.
147. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo J et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008; 26(3): 638-45.
148. Bakopoulou A, Kritis A, Andreadis D, Papachristou E, Leyhausen G, Koidis P et al. Angiogenic potential and secretome of human apical papilla mesenchymal stem cells in various stress microenvironments. *Stem cells and development*. 2015; 24(21): 2496-512

149. Chen M, Chen K, Chen C, Tayebaty F, Rosenberg P, Lin L. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int. Endod. J.* 2012; 45: 294–305.
150. Aurora A, Olson E. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem.* 2014; 15: 14–25
151. Hahn C, Liewehr F. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J. Endod.* 2007; 33: 773–81.
152. Cooper P, McLachlan J, Simon S, Graham L, Smith A. Mediators of inflammation and regeneration. *Adv. Dent. Res.* 2011; 23: 290–5
153. Silva M, Kajiya M, AlShwaimi E, Sasaki H, Hong J, Rezende T, Pagonis T, White R, Paster B. et al. Bacteria-reactive immune response may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss lesion. *J. Endod.* 2012; 38: 346–50
154. Jang J, Shin H, Lee J, Lee H, Kim E, Park S. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediat. Inflamm.* 2015 (2015) ID: 794143
155. Huang G, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J. Endod.* 2008; 34: 645–51
156. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, and Huang G. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J. Endod.* 2011; 37: 1217–24

157. Love R, Jenkinson H. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2002; 13: 171–83.
158. Taschieri S, Del Fabbro M, Samaranayake L, Chang J, Corbella S. Microbial invasion of dentinal tubules: A literature review and a new perspective. *J. Investig. Clin. Dent.* 2014; 5: 163–70.
159. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs J, Lin L. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J. Endod.* 2014; 40: 133–9.
160. Lei L, Chen Y, Zhou R, Huang X, Cai Z. Histologic and Immunohistochemical Findings of a Human Immature Permanent Tooth with Apical Periodontitis after Regenerative Endodontic Treatment. *J. Endod.* 2015; 41: 1172–9
161. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg P, Lin L. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J. Endod.* 2012;38: 1293–7
162. Jiang X, Bruzewicz D, Wong A, Piel M, Whitesides G. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 975–8.
163. Tozluoglu M, Tournier A, Jenkins R, Hooper S, Bates P, Sahai, E. Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. *Nat. Cell. Biol.* 2013; 15(7): 751–62
164. Le Berre M, Liu Y, Hu J, Maiuri P, Bénichou O, Voituriez R, Chen Y, Piel M. Geometric friction directs cell migration. *Phys. Rev. Lett.* 2013; 111(19): 198101

165. Weidenhamer N, Moore D, Lobo F, Klair N, Tranquillo R. Influence of culture conditions and extracellular matrix alignment on human mesenchymal stem cells invasion into decellularized engineered tissues. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015; 9: 605–18
166. Park J, Bauer S, Pittrof A, Killian M, Schmuki P, Von der Mark, K. Synergistic control of mesenchymal stem cell differentiation by nanoscale surface geometry and immobilized growth factors on TiO₂ nanotubes. *Small.* 2012; 8(1): 98–107
167. Chávez de Paz L, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J. Endod.* 2010; 36(1): 70–7
168. Chávez de Paz, L.E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J. Endod.* 2012; 38(3): 318–23.
169. Goldberg M. Dentin structure composition and mineralization. *Front. Biosci.* 2011; 3(2): 711–35.
170. Siqueira J, Rocas I, Armada L, Ricucci D. *Biología Pulpar e Periradicular. Lopes & Siqueira. Endodontia. Biología e Técnica. Brasil. 4ta Edicion. Elsevier. 2015. 1-23.*
171. Smith A. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J of Dent Educ.* 2003; 67(6): 678-89.
172. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39:51-68.
173. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone

morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 1992;36:491-503.

174. . Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF betas, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-20.
175. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale* 1990;18:123-9
176. Sloan AJ, Moseley R, Dobie K, Waddington RJ, Smith AJ. TGF- β latency-associated peptides (LAPs) in human dentin matrix and pulp. *Conn Tiss Res* 2002;43:381-6
177. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol* 1997;42:219-23.
178. Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB. Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 1990;86:1976-84.
179. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein7. *Eur J Oral Sci* 2000;108:202-6.
180. Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2001;109:422-4

181. Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty S, Butler W. Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int J*. 2000; 67(6):472-8.
182. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:963–70
183. Butler W, Bhowm M, Brunn J, D'Souza R, Farach-Carson M, Happonen R et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix Biol J*. 1992; 12(5): 343-51.
184. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106:204–10
185. Butler WT, Bhowm M, Tomana M, Fretwell B, Schrohenloher RE. Characterization of a unique dentin glycoprotein. In: Veis A (ed) *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Elsevier/North Holland, New York. 1981; 299–402
186. Ritchie HH, Berry JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronckers AL, Hotton D, Papagerakis P, Berdal A, Butler WT. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:405–13
187. D'Souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Doga DA, Farach-Carson MC, Butler WT. Developmental expression A. Boskey et al.: Dentin Sialoprotein Effects on Apatite Formation and Growth 477 of a 53 KD dentin sialoprotein in rat tooth organs. *J Histochem Cytochem*. 1992;40:359–66

188. Ritchie HH, Pinero GJ, Hou H, Butler WT. Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. *Connect Tissue Res.* 1995; 33:73– 9
189. Boskey AL, Maresca M, Doty S, Sabsay B, Veis A. Concentration-dependent effects of dentin-phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Bone Miner J.* 1990; 11(1):55–65
190. Galler K, D'Souza R, Federlin M, Cavender A, Hartgerink J, Hecker S, Schmalz G. Dentin Conditioning Codetermines Cell Fate in Regenerative Endodontics. *J of Endod.* 2011;37(11):1536-41
191. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol J.* 2009;28(4):221-9
192. Tjäderhane L, Carrilho M, Breschi L, Tay F, Pashley D. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic Topics.* 2009; 20(1): 3-29.
193. Basrani B & Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Top.* 2012; 27(1): 74-102.
194. Estrela C, Barbin E, Spanó J, Marchesan M, Pécora J. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13: 113–7.
195. Mohammadi Z, Yaripour S, Shalavi S, Palazzi F, Asgary S. Root canal irrigants and dentin bonding: an update. *Iran Endod J.* 2017; 12(2): 131.
196. Radcliffe C, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces*

israelii, A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. Int Endod J 2004; 37: 438–46.

197. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Muwaquet-Rodríguez S, Albero-Monteagudo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. J of clin and Exp Dent. 2019; (11): 185
198. Kahler B, Chugal N, Lin L. Alkaline materials and regenerative endodontics: A review. Materials. 2017; 10(12): 1389.
199. Bezgin T, Sönmez H. Review of current concepts of revascularization/revitalization. Dent. Traumatol. 2015;31: 267–73.
200. Galler K. Clinical procedures for revitalization: Current knowledge and considerations. Int. Endod. J. 2016;49: 926–36.
201. American Association of Endodontists. [Internet] AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Available online: https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf(accessed on 2 December 2017)
202. Fouad A, Nosrat A. Pulp regeneration in previously infected root canal space. Endod. Top. 2013; 28: 24–37.
203. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin L, Huang G. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. J Endod. 2010; 36: 56–63
204. Petrino J, Boda K, Shambarger S, Bowles W, McClanahan S. Challenges in regenerative endodontics: a case series. J Endod. 2010; 36: 536–41.

205. Reynolds K, Johnson J, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicusps using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009; 42: 84–92.
206. Chueh L, Huang G. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006; 32: 1205–13
207. Shin S, Albert J, Mortman R. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009; 42: 1118–26
208. Trevino E, Patwardhan A, Henry M, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves K. Diogenes A. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J. Endod*. 2011; 37: 1109–15
209. Martin D, De Almeida J, Henry M, Khaing Z, Schmidt C, Teixeira F, Diogenes A. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J. Endod*. 2014; 40: 51–5
210. Kahler B & Lin L. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2017; 51(3): 41-51.
211. Diogenes A, Ruparel N, Teixeira F & Hargreaves K. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J of Endod*. 2014; 40(4): S52-S57.
212. Diogenes A & Hargreaves K. Microbial modulation of stem cells and future directions in regenerative endodontics. *J of Endod*. 2017; 43(9): S95-S101.

213. Ruparel N, Teixeira F, Ferraz C & Diógenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of endodontics*. 2012; 38(10): 1372-5.
214. Palma P, Ramos J, Martins J, Diogenes A, Figueiredo M, Ferreira P & Santos J. Histologic evaluation of regenerative endodontic procedures with the use of chitosan scaffolds in immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2017; 43(8): 1279-87.
215. Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia C, Diogenes A & Ruparel N. Effect of bacterial biofilm on the osteogenic differentiation of stem cells of apical papilla. *J of Endod*. 2017; 43(6): 916-22.
216. Verma P, Nosrat A, Kim J, Price J, Wang P, Bair E & Fouad, A. F. Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration in vivo. *J of Dent Res*. 2017; 96(1): 100-6.
217. Ricucci D, Siqueira Jr J, Loghin S & Lin L. M. Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: a histologic and histobacteriologic study. *J of Dent*. 2017; 56: 19-32.
218. Meschi N, Hilkens P, Lambrichts I, Van den Eynde K, Mavridou, A, Strijbos O & Lambrechts P. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study. *Clinical oral investigations*. 2016; 20(4): 807-14.
219. Scott II M, Zilinski G, Kirkpatrick T, Himel V, Sabey K & Lallier T. The effects of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla, including Endocyn. *J of Endod*. 2018; 44(2): 263-8.
220. Lovelace T, Henry M, Hargreaves K & Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of

necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J of Endod*. 2011; 37(2): 133-8.

221. Zhu W, Gyamfi J, Niu L, Schoeffel G, Liu S, Santarcangelo F , Tay F. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis—a review. *Journal of dentistry*. 2013; 41(11): 935-48.
222. Bucchi C, Valdivia-Gandur I, Sánchez-Bizjak R, Tallón-Walton V, Manzanares-Céspedes C. Regenerative endodontic therapy: a systematic review of clinical protocols. *Int J Clin Exp Med*. 2017; 10(3): 2006-15.
223. Kahler B & Lin L. M. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *J of Istanbul Univ Faculty of Dent*. 2017; 51(3): 41-51.
224. Latham J, Fong H, Jewett A, Johnson J & Paranjpe A. Disinfection efficacy of current regenerative endodontic protocols in simulated necrotic immature permanent teeth. *J of Endod*. 2016; 42(8): 1218-25.
225. Ruparel N, Austah O & Diogenes A. Current and Future Views on Disinfection for Regenerative Strategies. *Clin App in Endod Regen*. Springer Cham. 2018; 21–138
226. Parente J, Loushine R, Susin L, Gu L, Looney S, Weller R & Tay, F. Root canal debridement using manual dynamic agitation or the EndoVac for final irrigation in a closed system and an open system. *Int Endod J*. 2010; 43(11): 1001-12.
227. Fouad A. Microbial factors and antimicrobial strategies in dental pulp regeneration. *Journal of endodontics*. 2017; 43(9): S46-S50.

228. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20
229. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A & Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J of Dent*. 2018; 12(3):459.
230. Violich D & Chandler N. The smear layer in endodontics—a review. *International endodontic journal*. 2010; 43(1): 2-15.
231. Torabinejad M, Handysides R, Khademi A & Bakland L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: A review. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path, Oral Rad, and Endod*. 2002; 94(6): 658–66.
232. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod*. 1975; 1:238-42.
233. Drake D, Wiemann A, Rivera E, Walton R. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J of Endod*. 1994; (20): 78–82.
234. American Association of Endodontics. [Internet] Clinical Considerations for a Regenerative Procedure Revised 2013. Available online: <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf>
235. Diogenes A & Ruparel N. Irrigation in Regenerative Endodontic Procedures. In *Endodontic Irrigation*. Springer Cham, Switzerland 2015. 301-12
236. Hashimoto K, Kawashima N, Ichinose S, Nara K, Noda S & Okiji T. EDTA treatment for sodium hypochlorite-treated dentin recovers

disturbed attachment and induces differentiation of mouse dental papilla cells. *J of Endod.* 2018; 44(2): 256-62.

237. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, et al. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res.* 2010; 89:603–8.
238. Kitikuson P, Srisuwan T. Attachment ability of human apical papilla cells to root dentin surfaces treated with either 3Mix or calcium hydroxide. *J Endod* 2016; 42: 89–94.
239. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod.* 2014;40:521–5
240. Bracks I, Espaladori M, Barros P, De Brito L, Vieira L & Ribeiro Sobrinho A. Effect of EDTA irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerating endodontic therapy. *Int Endod J.* 2019
241. Ruggeri A, Prati C, Mazzone A, et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: an immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol.* 2017; 52:1–8
242. Higashi T, Okamoto H. The effect of ultrasonic irrigation before and after citric acid treatment on collagen fibril exposure: an in vitro SEM study. *J Periodontol.* 1995; 66:887–91
243. Widbiller M, Eidt A, Hiller K, Buchalla W, Schmalz G & Galler K. Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. *Clin Oral Invest.* 2016; 21(3): 879–88.
244. Taweewattanapaisan P, Jantararat J, Ounjai P & Janebodin K. The Effects of EDTA on Blood Clot in Regenerative Endodontic Procedures. *J of Endod.* 2019; 45(3): 281–6

245. Almutairi W, Yassen G, Aminoshariae A, Williams K & Mickel A. Regenerative Endodontics: A Systematic Analysis of the Failed Cases. *J of Endod.* 2019; 45(5): 567-77
246. Bonniec BF, Guinto ER, Esmon C. The role of calcium ions in factor X activation by thrombin E192Q. *J Biol Chem.* 1992; 267:6970–6.
247. Fouad AF. 2011. The microbial challenge to pulp regeneration. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):285
248. Fouad AF, Verma P. Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *J Endod.*2014; 40(4):S58–S64.
249. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod.* 2012; 38(3):411–4.
250. Nair PN. Endodontic biofilm, technology and pulpal regenerative therapy: where do we go from here? *Int Endod J.*2014; 47(11):1003–11.
251. Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod.* 2009; 35(1):78–81.
252. Bimstein E, Rotstein I. Cvek pulpotomy - revisited. *Dent Traumatol.* 2016; 32(6):438–42
253. Akcay M, Sari S, Duruturk L, Gunhan O. Effects of sodium hypochlorite as disinfectant material previous to pulpotomies in primary teeth. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(4):803–11
254. Martin DE, Henry MA, Almeida JFA, Teixeira FB, Hargreaves KM, Diógenes AR. Effect of sodium hypochlorite on the odontoblastic

phenotype differentiation of SCAP in cultured organotype human roots.
J Endod. 2012; 38(3):26

255. Yassen G, Sabrah A, Eckert G & Platt J. Effect of different endodontic regeneration protocols on wettability, roughness, and chemical composition of surface dentin. Journal of endodontics. 2015; 41(6): 956-60.
256. Demarco F, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio S, Zeitlin B & Nör J. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. J of Endodontics. 2010; 36(11): 1805-11.
257. Torabinejad M & Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. Journal of endodontics. 2012; 38(6) 864-8.
258. Zhang R, Cooper P, Smith G, Nör J & Smith A. Angiogenic activity of dentin matrix components. Journal of endodontics. 2011; 37(1): 26-30.
259. Sadaghiani L, Gleeson H, Youde S, Waddington R, Lynch C. & Sloan A. Growth factor liberation and DPSC response following dentine conditioning. Journal of dental research. 2016; 95(11): 1298-307.
- 260.