



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Evaluación de la citotoxicidad de tres materiales hidráulicos de silicato de calcio utilizados en cirugía periapical: estudio in vitro

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A:

ESTEFANIA ARELLANO RODRÍGUEZ

TUTOR: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESOR: Esp. CARLOS TINAJERO MORALES
Esp. EDUARDO ARTURO VENTURA MORALES

Evaluación de la citotoxicidad de tres materiales hidráulicos de silicato de calcio utilizados en cirugía periapical: estudio *in vitro*

Cytotoxicity assessment of three hydraulic calcium silicate materials used in periapical surgery: In vitro study

Estefanía Arellano Rodríguez, **Eileen Uribe Querol **Carlos Tinajero-Morales, §Eduardo Arturo Ventura Morales*

Resumen

Introducción: Actualmente, se han introducido en el área endodóncica nuevos materiales hidráulicos de silicato de calcio como el NeoMTA™ (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, EE. UU.) y MTA Repair HP® (Angelus, Londrina, PR, Brasil), que buscan mejorar las propiedades fisicoquímicas del MTA convencional sin afectar su biocompatibilidad y bioactividad; sin embargo, poco se sabe de su toxicidad en cultivo de fibroblastos.

Objetivo: Evaluar la citotoxicidad de tres materiales hidráulicos de silicato de calcio utilizados como materiales de retroobtención sobre cultivos de fibroblastos de ratón de la línea celular L929.

Materiales y métodos: Los medios condicionados de los materiales de retroobtención MTA Angelus® blanco (Angelus, Londrina-PR-Brasil), MTA Repair HP® (Angelus, Londrina, PR, Brazil) y NeoMTA™ (Avalon Biomed Inc, Houston, TX) se analizaron en fresco, al tiempo de fraguado, y después de 12, 24, 48 y 72 horas posteriores a su fraguado. La morfología celular fue evaluada por microscopía de luz y la citotoxicidad fue evaluada a través de la actividad metabólica mitocondrial con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT). El análisis estadístico se realizó por ANOVA.

Resultados: El material del silicato de calcio MTA Repair HP®, fue el material de menor citotoxicidad en fresco; el cemento biocerámico

NeoMTA™ es el material que se mantiene más estable en todos los tiempos de observación, mientras que el MTA Angelus® blanco muestra una citotoxicidad moderada (sin ser estadísticamente significativa) durante los tiempos de observación. Sin embargo, después del tiempo de fraguado, no hubo diferencia estadísticamente significativa en la citotoxicidad de los 3 cementos estudiados. **Conclusión:** Los materiales hidráulicos de silicato de calcio NeoMTA (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, EE.UU.) y MTA Repair HP® (Angelus, Londres, PR, Brasil), pueden ser utilizados como materiales biocompatibles, y debido a las mejoras en su formulación pueden reemplazar al MTA convencional y ser utilizados como materiales de retroobtención en cirugía periapical.

Abstract

Introduction: Currently, new calcium silicate hydraulic materials such as NeoMTA™ and MTA Repair HP® have been introduced into the endodontic area. However, little is known about its toxicity in fibroblast culture.

Objective: To evaluate the cytotoxicity of three hydraulic calcium silicate materials used as retroobturation materials on mouse fibroblast cultures of the L929 cell line.

Material and methods: The conditioned media of the MTA Angelus® white, MTA Repair HP® and NeoMTA™ backobturation materials were obtained fresh, at the time of setting, and after 12, 24, 48 and 72 hours of setting time. Cellular

morphology was evaluated by light microscopy and cell viability was assessed through mitochondrial metabolic activity with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Statistical analysis was performed by ANOVA. **Results:** The calcium silicate material MTA Repair HP® was the material that selected the lowest cytotoxicity in fresh; NeoMTA™ bioceramic cement is the material that remains most stable at all observation times, while white MTA Angelus® detects moderate cytotoxicity during observation times, affects cell viability. However, after the setting time, there was no statistically significant difference in the cytotoxicity of the 3 cements studied. **Conclusion:** NeoMTA calcium silica hydraulic materials (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, USA) and MTA Repair HP® (Angelus, London, PR, Brazil), can be determined as biocompatible materials, and due to their improvements in the formulation of the products, they can be replaced by conventional MTA and used as retroobutration materials in periapical surgery.

Palabras clave: Morfología celular, citotoxicidad, retroobtención, selladores endodóncicos, MTT, inflamación.

Key words: Cell morphology, cytotoxicity, retrofilling, endodontic sealers, MTT, inflammation.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo se ha reconocido el papel que desempeñan las bacterias en el desarrollo de lesiones periapicales.⁽¹⁾ Por lo tanto, el objetivo de la terapia endodóncica es eliminar la infección del sistema de conductos radiculares y prevenir o curar la periodontitis apical. Sin embargo, algunos tratamientos pueden fracasar. El fracaso de estos tratamientos se ha sugerido depende de factores sistémicos y locales. Las condiciones sistémicas pueden afectar la resistencia general del tejido y el potencial de reparación puede ser bajo. Los factores locales incluyen procedimientos fallidos que conducen a preparaciones deficientes, ruptura de instrumentos, obturaciones incompletas o sobreextendidas y la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares que afectan negativamente la terapia de

conductos.⁽²⁾ Sin embargo, el factor individual más decisivo que afecta el resultado a largo plazo del tratamiento endodóncico es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares.⁽³⁾

La cirugía periapical está indicada después de un tratamiento o retratamiento de conductos fallido, ya sea por alguno de los factores mencionados anteriormente o cuando no es viable realizar el tratamiento de manera ortógrada.⁽⁴⁾ El objetivo de la cirugía periapical es eliminar los tejidos enfermos y obtener un sellado apical para evitar la salida de irritantes residuales al área perirradicular.⁽⁵⁾ Este procedimiento consiste en descubrir el ápice del diente afectado, realizar un curetaje del área para eliminar el tejido infectado, hacer una apicectomía, retropreparación y sellar con un material de retrobturación.⁽⁶⁾ En este procedimiento se utilizan materiales de retrobturación como son los materiales hidráulicos de silicato de calcio, que de acuerdo a la literatura, proveen un sellado apical y facilitan la reparación de los tejidos periapicales. El uso del microscopio, el desarrollo de técnicas quirúrgicas, el mejoramiento de la iluminación y la accesibilidad a nuevos materiales de retrobturación contribuyen en gran medida al éxito de los procedimientos quirúrgicos en Endodoncia.^(7,8)

Un material de retrobturación debe sellar las vías de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y los tejidos circundantes a las raíces.⁽⁸⁾ Dentro de las características ideales que deben presentar estos materiales son que no deben ser citotóxicos a los tejidos perirradiculares, deben tener una buena adhesión a la dentina, no ser cancerígenos ni genotóxicos, deben ser biocompatibles con los tejidos del hospedero, insolubles a los fluidos tisulares, dimensionalmente estables, fáciles de manipular y radioopacos para ser observados radiográficamente. Además, la presencia de humedad no debe afectar su capacidad de sellado, deben tener buen tiempo de trabajo y endurecimiento rápido.⁽⁸⁻¹⁰⁾

Dentro de los materiales que han sido utilizados para retrobturación en cirugía periapical, se

encuentran la amalgama, resinas, cementos de óxido de zinc y eugenol, cementos de ionómero de vidrio, cementos de policarboxilato, Cavit y la misma gutapercha.⁽⁹⁾

Una de las principales propiedades que se necesita tomar en consideración de los materiales de retrobturación es su biocompatibilidad. En este trabajo evaluaremos la citotoxicidad de los selladores MTA Angelus® blanco, Neo MTA® y el material reparador de alta plasticidad MTA Repair HP®, que son materiales recientes en el mercado y no se ha estudiado su capacidad citotóxica en detalle.

La actividad metabólica de las células se mide a través de las deshidrogenasas. El [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (MTT), molécula que se metaboliza por las deshidrogenasas mitocondriales (en particular la succinato deshidrogenasa) en formazano. El ensayo de MTT permite de manera indirecta evaluar la viabilidad celular con base en la actividad mitocondrial.

Este estudio se realizó de acuerdo a la norma ISO 10993-5:2009, que describe las pruebas para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos. En específico, las pruebas de citotoxicidad *in vitro*.

ANTECEDENTES

En 1884, Farrar fue el primero en colocar amalgama como material de retrobturación y su uso fue exitoso.⁽¹¹⁾ Los efectos biológicos de la amalgama dependen del modo de fabricación y de la composición de la aleación. La formulación original de amalgama odontológica contiene óxido de zinc, que es conocido por ser citotóxico. Las amalgamas libres de zinc son menos citotóxicas.⁽¹²⁾ Sin embargo, poseen otras desventajas como la sensibilidad a la humedad, microfiltraciones, corrosión, pigmentación de tejidos blandos, tendencia a la dispersión, y contaminación por mercurio y estaño.

En estudios a corto plazo, la amalgama ha mostrado respuestas inflamatorias de los tejidos

periapicales. Estos estudios han oscilado entre 2 semanas y 5 meses después de su colocación.

Tronstad et al., concluyeron que la amalgama de plata convencional recién mezclada es muy citotóxica debido al mercurio sin reaccionar. Reportando que esta citotoxicidad disminuía al cristalizar.⁽¹³⁾

Maher et al., en un modelo de hurón determinó que la inflamación crónica se produce en los tejidos periapicales aproximadamente dentro de 10 a 15 semanas posteriores a la aplicación de la amalgama. Sin embargo, la amalgama que se coloca en la porción apical de la raíz es rodeada por tejido conectivo fibroso después de 15 semanas.⁽¹⁴⁾

Otros tipos de cementos utilizados en cirugía periapical son a base de óxido de zinc y eugenol como el Super EBA® e IRM®. El cemento Super EBA® está compuesto en un 60% de óxido de zinc, 34% de óxido de aluminio, 6% de resina natural, el líquido 37.5% de eugenol y 62.5% de ácido ortoetoxibenzoico.

La composición del IRM® es 80% de óxido de zinc, 20% de polimetilmetacrilato, el líquido contiene 99% de eugenol y 1% de ácido acético. Debido a que ambos materiales, tanto Super EBA® e IRM® contienen eugenol, se ha expresado preocupación acerca de los posibles efectos nocivos sobre los tejidos periapicales.⁽¹⁵⁾

Blackman et al., reportaron que el IRM® es biocompatible y sugirieron que sería útil como material de retrobturación en endodoncia.⁽¹⁶⁾

Trope et al., en un estudio histológico sugirieron que tanto IRM® como Super EBA® tienen una buena respuesta tisular sin existir una diferencia significativa entre ambos cementos.⁽¹⁷⁾

También se han utilizado cementos de ionómero de vidrio, cementos de policarboxilato, Cavit y la gutapercha. Sin embargo, ninguno de estos materiales posee las características ideales.⁽⁹⁾

Los cementos de silicato de calcio, como el MTA que aparece en los años 90's, también se han utilizado como materiales de retrobturación. Estos cementos han mostrado ser altamente

biocompatibles. Al respecto, la biocompatibilidad de los materiales se evalúa en un principio en estudios *In vitro*, la evaluación secundaria implica estudios *In vivo*, en los cuales se determina si los hallazgos de los estudios de laboratorio pueden ser aplicables a una situación clínica.⁽²⁵⁾

MATERIALES HIDRÁULICOS DE SILICATO DE CALCIO

El trióxido mineral agregado o MTA, es el primer silicato de calcio de uso odontológico. Fue desarrollado y patentado en 1995 por Torabinejad y White. Su principal componente es el cemento de Portland tipo I (silicato de calcio), conocido como cemento de Portland ordinario, usado en construcción, al que se le ha agregado óxido de bismuto (Bi_2O_3) para proveer radiopacidad.

La fórmula original del MTA® fue desarrollada en la Universidad de Loma Linda, Estados Unidos, y es fabricada por Dentsply International. Sin embargo, han aparecido una serie de productos similares fabricados por otras compañías.⁽⁸⁾

Actualmente existen dos presentaciones de MTA® (gris y blanco). El MTA ha sido reconocido como el estándar de oro para una gran variedad de situaciones clínicas. Inicialmente se recomendó como material de retrobturación apical y posteriormente se ha utilizado para recubrimiento pulpar, pulpotomía, apexogénesis, formación de barreras apicales en dientes con ápices inmaduros, reparación de perforaciones radiculares y como material de obturación del conducto radicular. El MTA es quizás lo más cercano al material ideal, debido a sus excelentes propiedades físico-químicas y biológicas.⁽¹⁸⁾

Martínez Cortés, Tinajero Morales y Uribe Querol, realizaron un estudio *in vitro* de citotoxicidad sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano y fibroblastos de ratón de la línea celular L929, en donde encontraron que las células expuestas a medio condicionado del MTA Angelus® blanco se mantienen viables y muestran una morfología típica característica de fibroblastos. La viabilidad no se alteró ni en los fibroblastos gingivales humanos, ni en los fibroblastos de la línea celular L929 que fueron

expuestos al MTA.⁽¹⁹⁾

La capacidad de sellado del MTA en obturaciones retrógradas es superior a diversos materiales que se han empleado como materiales de retrobturación a lo largo del tiempo como: amalgama, IRM, Super EBA, ionómero de vidrio, entre otros; tanto en estudios de filtración de tinta como bacteriana.⁽²⁰⁾ Sin embargo, dentro de sus desventajas se encuentra el tener un periodo largo de endurecimiento, la dificultad de mantener la consistencia de mezclado, su difícil manipulación a pesar de numerosos instrumentos diseñados para su colocación y su elevado costo.⁽²¹⁾

Recientemente, se lanzó al mercado un nuevo material basado en MTA, el MTA Repair HP® (Angelus). Una de las diferencias de este nuevo material con respecto a la antigua formulación de MTA® blanco fue la sustitución del agua destilada por un líquido que contiene agua y un plastificante orgánico. Sin embargo, la composición de este no es revelada por completo por el fabricante.

Este líquido proporciona una mayor plasticidad, mejorando su manipulación; además, la sustitución del radiopacificador de óxido de bismuto por un radiopacificador de tungstato de calcio evitará la decoloración dental.

Un estudio reciente mostró que MTA Repair HP® tiene una mejor unión y resistencia a la expulsión, que su predecesor MTA® blanco.⁽²²⁾ Los autores creen que la presencia de tungstato de calcio como agente radiopacificador en el MTA Repair HP® contribuye a una mayor liberación de calcio en los periodos iniciales⁽²³⁾, promoviendo una mayor biomineralización y ayudando a la resistencia de este material. Además, la mayor plasticidad podría mejorar la adaptación marginal.

El NeoMTA™ se introduce al mercado en el año 2015, es un nuevo material de silicato tricálcico de polvo muy fino, que evita la decoloración al usar óxido de tantalio como radiopacificador en lugar de óxido de bismuto. Se mezcla con un gel a base de agua que tiene buenas propiedades de manipulación.⁽²⁴⁾ La proporción de mezcla de polvo a gel puede variar, y se puede usar una consistencia delgada como sellador o mezcla espesa para la reparación de perforaciones, la

obtención del extremo de la raíz y otras modalidades de tratamiento. NeoMTA presenta una radiopacidad adecuada y un buen tiempo de trabajo.⁽²⁴⁾ La liberación de iones calcio e hidroxilo es mayor y más prolongada con NeoMTA que con el MTA convencional. Este material promueve la regeneración del tejido pulpar y periodontal, mejorando la bioactividad y la biocompatibilidad. Sin embargo, no hay datos disponibles sobre su capacidad citotóxica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de retrobturación

Tres materiales hidráulicos de silicato de calcio empleados en el área de endodoncia: MTA Angelus®, utilizado como material de retrobturación en cirugía periapical, y dos nuevos materiales MTA Repair HP® o material de reparación de alta plasticidad y NeoMTA™, serán utilizados para evaluar su citotoxicidad. La composición y los datos del fabricante de cada cemento se muestran en el cuadro 1. Los cementos serán preparados con base en las instrucciones de cada fabricante. Brevemente, la preparación se muestra en el cuadro 2.

Se utilizaron cilindros estériles de teflón (5.5 mm diámetro externo x 2 mm de altura x 3 mm de grosor) los cuales fueron colocados sobre cuadrados estériles de hojas de teflón Mylar (1.1 x 1.1 cm), y llenados con los cementos en fresco (ambos de Tetraflón de México S.A. de C.V., Toluca, Estado de México). Los cilindros fueron posteriormente colocados en cajas de 24 pozos (Corning Inc., Corning, NY). A cada pozo se agregaron 1.5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (ByProductos S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México), 8mM L-glutamina, y antibióticos (10,000 unidades/ml penicilina, 10,000 g/mL estreptomina, y 25 g/mL de Fungizone®; GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). El medio de cultivo se dejó en contacto con los materiales de retrobturación por diferentes tiempos: en fresco (0 h), al tiempo de fraguado (*Cuadro II*) y a las 12, 24, 48 y 72 horas después de su fraguado. Después de cada tiempo se recolectó el medio condicionado en tubos Eppendorf y se guardó a -20°C, hasta su uso. Como control de medio condicionado se recolectaron medios que no fueron expuestos a ningún cemento, a los mismos tiempos.

Medios condicionados de los materiales de retroobturación

Los medios condicionados se obtuvieron siguiendo la norma ISO 10993-5:2009 (Organización Internacional de Estandarización 2009).⁽²⁵⁾

Cuadro I. Preparación de los materiales utilizados.

Material	Preparación	Tiempo de fraguado
MTA Angelus® blanco	Una cucharada de polvo y una gota de agua destilada	2.45 h
MTA Repair HP®	1 sobre de MTA Repair HP® y 1 gota del líquido Espatular durante 40seg.	15 min
NeoMTA™	Una cucharada de polvo y una gota de líquido.	12 min

Cuadro II. Materiales utilizados, composición y fabricante.

Material	Composición	Fabricante
MTA Angelus® blanco	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, residuos insolubles de sílice cristalina, óxido de calcio y sulfatos de potasio y sodio.	Angelus, Londrina-PR-Brasil
MTA Repair HP®	Polvo: silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de calcio y tungstato de calcio. Líquido: agua y plastificantes.	Angelus, Londrina-PR-Brasil
NeoMTA™	Polvo: silicato tricálcico, silicato dicálcico y óxido de tantalio Líquido: Agua y polímeros patentados.	Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA

Línea Celular

Los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 fueron donados por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia.⁽²⁷⁾

Cultivo celular

Los fibroblastos fueron cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY; suplementado con: 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 8mM de L-glutamina (GIBCO) y penicilina/estreptomocina (50,000 unidades/mL 50,000 µg/mL respectivamente; GIBCO). Los cultivos celulares se mantuvieron en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, Inc., Corning, NY) hasta que llegaron a un 80-90% y se subcultivaron. Los fibroblastos fueron despegados con 5 ml de tripsina/EDTA (150 µM/318 µM; GIBCO) durante 5 minutos. La tripsina fue neutralizada con un volumen igual de

medio de cultivo fresco. La suspensión celular fue centrifugada 3 minutos a 1,500 rpm. El sobrenadante fue desechado y el botón celular fue resuspendido en 5 mL de medio fresco. Un cuarto de la resuspensión fue colocado en una botella de cultivo nueva para continuar el cultivo. Todos los experimentos se realizaron entre los subcultivos tres y 10.

Morfología celular

Para evaluar la morfología celular se sembraron 10⁴ fibroblastos/pozo en cajas de cultivo de 96 pozos (Corning, Inc., Corning, NY) en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo por pozo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador durante 24 horas (Nuairé™, Plymouth, USA) a 37 °C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Después de 24 horas, tiempo necesario para permitir que los fibroblastos se adhirieran a los pozos, se removió el medio de cultivo, y se colocaron 100

μL de cada uno de los medios condicionados correspondientes durante otras 24 horas. Al cabo de este tiempo, se evaluó la morfología en un microscopio modelo IX70 Olympus (Center Valley, PA, USA). Las imágenes fueron capturadas con una cámara EvolutionVF Cooled Color de Media Cybernetics (Rockville, MD, USA), y con el programa de computadora Q Capture pro 6.0 de QImaging Surrey (British Columbia, Canadá).

Ensayo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (MTT)

La actividad metabólica es un parámetro que indica el estado general de la célula y sirve para medir viabilidad de manera indirecta. El ensayo de [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (MTT) fue realizado con base en la norma ISO 10993-5.⁽²⁷⁾ A los mismos cultivos que fueron utilizados para tomar las fotografías de fibroblastos, se les retiró el medio condicionado y se les agregó 50 μL de una disolución de 1 mg/mL de MTT en cada pozo. Los cultivos fueron cubiertos de la luz y mantenidos a 37^o C con 5% CO₂, por dos horas. Después de este tiempo se retiró el MTT y se agregaron 100 μL de isopropanol (TECSIQUIM, TSQ, Iztacalco, Ciudad de México) a cada pozo. Los cultivos fueron incubados 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la absorbancia de la disolución fue medida a 590 nm en un lector de placas modelo Synergy HT, marca BioTek (Vermont, USA). Los valores de absorbancia fueron normalizados considerando como 100% la absorbancia obtenida de cultivos no tratados.

Estadística

Para determinar posibles diferencias entre los grupos de cementos y entre los diferentes tiempos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para muestras iguales.

La prueba *post hoc* utilizada fue Tukey, usando el programa KaleidaGraph® versión 3.6.2 para Mac (Synergy Software; Reading, PA, USA).

Las condiciones se consideraron diferentes estadísticamente cuando el valor de p fue ≤ 0.05 .

Morfología

Con el propósito de evaluar cambios morfológicos en los fibroblastos de ambas líneas celulares, se tomaron fotografías de cultivos después de ser expuestos a los diferentes medios condicionados de los 3 materiales hidráulicos de silicato de calcio.

RESULTADOS

Respecto a la citotoxicidad de los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 por medio del ensayo MTT en relación a la absorbancia, se observó que cuando las células fueron expuestas al MTA Angelus® blanco muestran una conducta uniforme con ascensos y descensos en la viabilidad celular, después del tiempo de fraguado la viabilidad celular no se alteró y no existe daño celular que sea estadísticamente significativo ($p=0.99$). (figura 2)

A las 48 horas, los fibroblastos muestran una mayor actividad metabólica, menor citotoxicidad y la viabilidad celular se mantiene entre un 80 y 90%. (figura1 panel b)

Las células expuestas a medio condicionado del material NeoMTA™ se mantuvieron estables desde el tiempo 0h hasta las 12horas; a las 24 horas, las células muestran una mayor actividad metabólica con tendencia a la proliferación y menor citotoxicidad.(Figura 4) Sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular expuesta a este material en comparación con el grupo control ($p=1.15$).

De los tres materiales hidráulicos de silicato de calcio, NeoMTA™ es el que muestra una conducta más uniforme en todos los tiempos de exposición y una morfología típica de fibroblastos.(Figura 3)

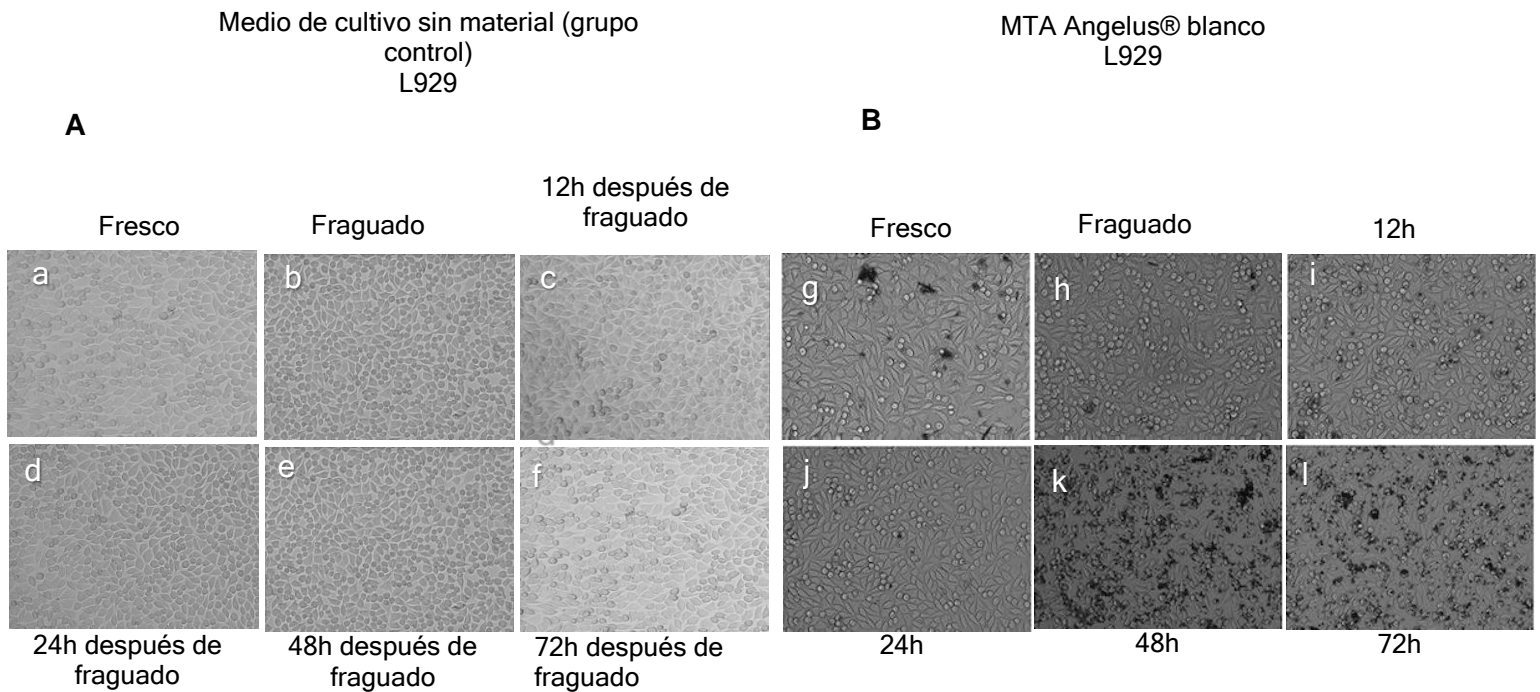


Figura 1. Panel A: Microfotografías de los fibroblastos L929 expuestos a medio condicionado sin MTT a los diferentes tiempos de exposición, los cuales respresentan el 100% de viabilidad celular y muestran una morfología típica triangular y elongada. En las microfotografías del **panel B**, se observa la actividad metabólica de los fibroblastos expuestos al MTA Angelus® blanco, los cuales muestran una morfología redondeada. Escala 100 μm .

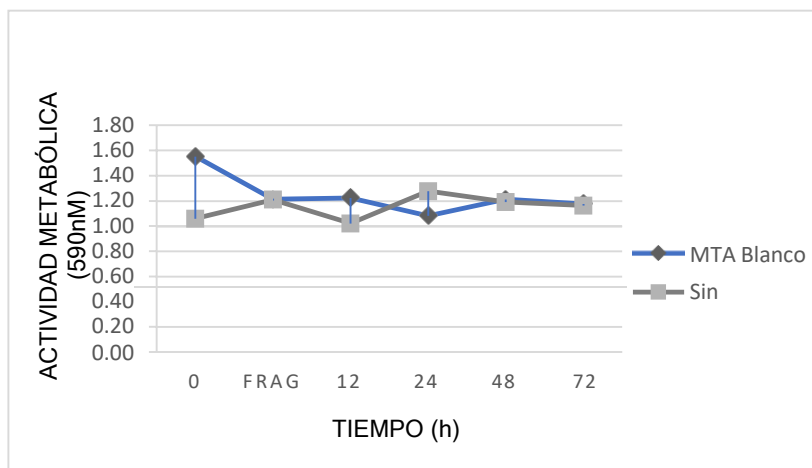


Figura 2. Actividad metabólica de los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 expuestos a MTA Angelus® blanco en comparación con el medio condicionado sin material. Los símbolos representan: MTA Angelus® blanco (rombo azul), en los diferentes tiempos. El 100% de viabilidad celular representa la condición sin material (cuadrado gris). Los datos representan el promedio del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos independientes, realizados por triplicado.

Las células expuestas a medio condicionado del material de reparación de alta plasticidad MTA Rapair HP® muestran tener una gran actividad metabólica, inclusive este material les proporciona cierta protección ante la citotoxicidad cuando se exponen en condiciones de fresco y hasta el tiempo de fraguado. (Figura 5) ($p=0.033$).

Después de las 12 horas, las células no muestran una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad y citotoxicidad en comparación con el grupo control. (Figura 6)

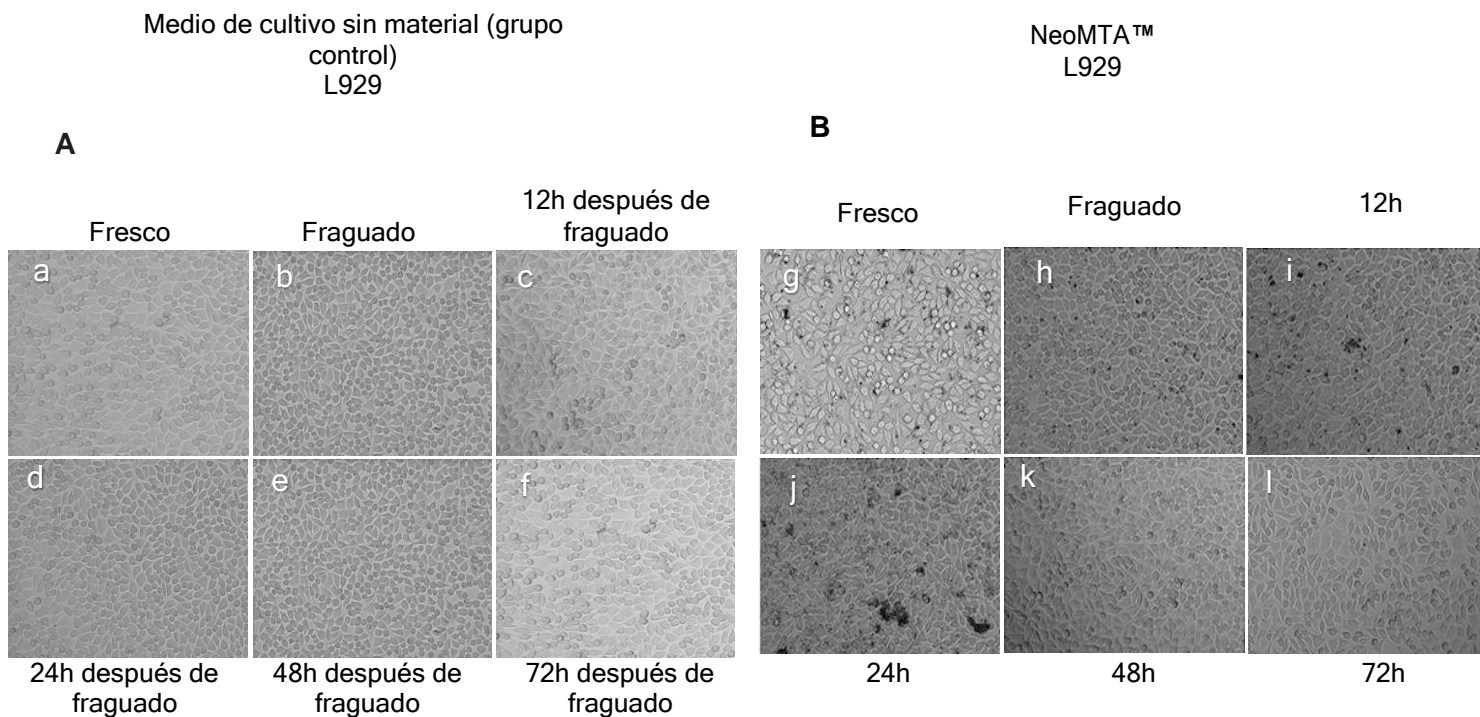


Figura 3. Panel A: Microfotografías de los fibroblastos L929 expuestos a medio condicionado sin MTT a los diferentes tiempos de exposición, los cuales respresentan el 100% de viabilidad celular y muestran una morfología típica triangular y elongada. En las fotomicrografías del **Panel B**, se observan los fibroblastos L929 expuestos a medio condicionado con NeoMTA™ en los diferentes tiempos de exposición, no se observa gran diferencia entre paneles, ya que los fibroblastos se mantienen viables durante todos los tiempos. Escala 100µm

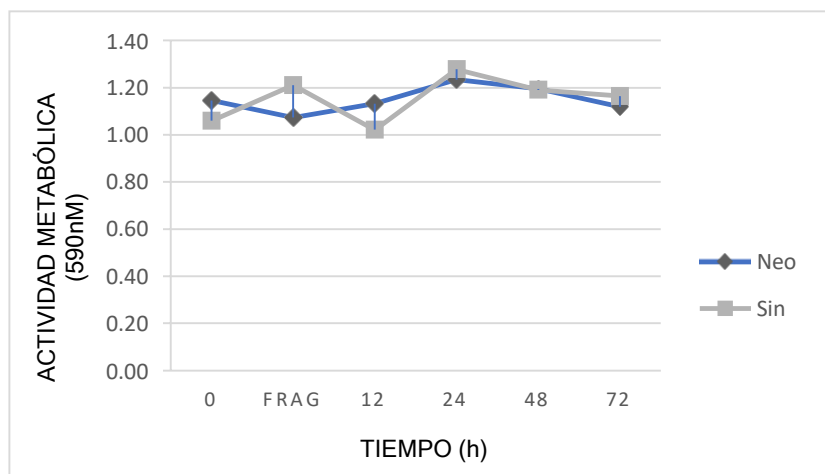


Figura 4. Actividad metabólica de los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 expuestos a NeoMTA™ en comparación con el medio condicionado sin material. Los símbolos representan: NeoMTA™ (rombo azul), en los diferentes tiempos. El 100% de viabilidad celular representa la condición sin material (cuadrado gris). Los datos representan el promedio del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos independientes, realizados por triplicado.

Las células expuestas a medio condicionado del material de reparación de alta plasticidad MTA Rapair HP® muestran tener una gran actividad metabólica, inclusive este material les proporciona cierta protección ante la citotoxicidad cuando se exponen en condiciones de fresco y hasta el tiempo de fraguado. Sin embargo, las células muestran una

disminución considerable de la actividad metabólica estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. ($p=0.033$) Después de las 12 horas, las células no muestran una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad y citotoxicidad en comparación con el grupo control.

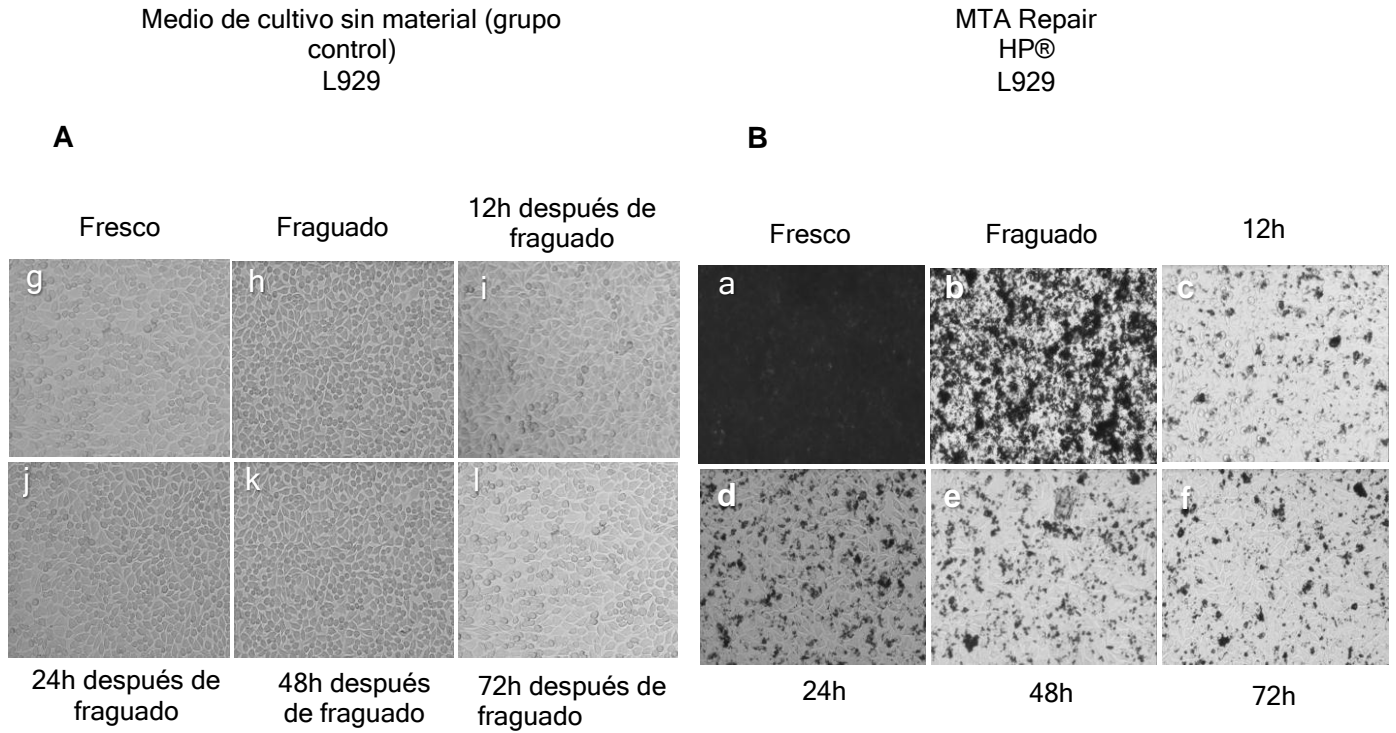


Figura 5. Microfotografías de los fibroblastos L929 expuestos a medio condicionado sin MTT a los diferentes tiempos de exposición, los cuales respresentan el 100% de viabilidad celular y muestran una morfología típica triangular y elongada (**Panel a**). En las Microfotografías del (**panel b**) se muestran la morfología de los fibroblastos expuestos a MTA Repair HP® en los diferentes tiempos de exposición. Se observa gran actividad metabólica en fresco y al tiempo de fraguado (**g, h**), después de las 12 horas, se observa una disminución en la actividad metabólica que se mantiene estable hasta las 72h. Escala 100 μ m.

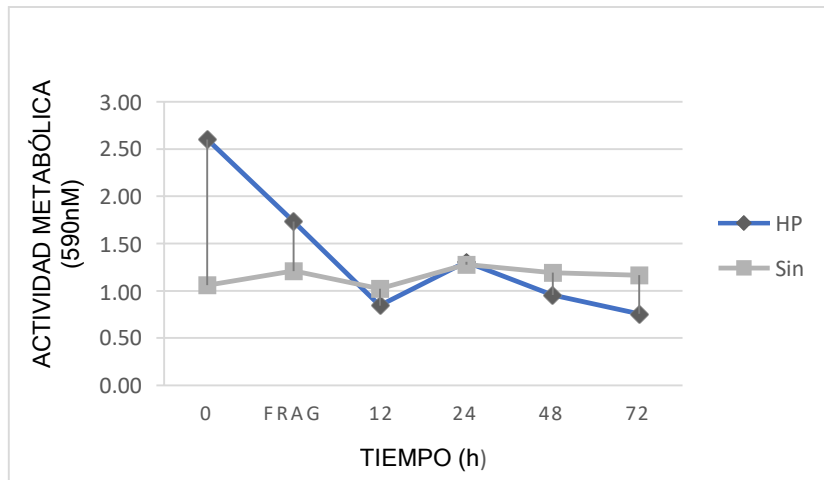


Figura 6. Actividad metabólica de los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 expuestos a MTA Repair HP® en comparación con el medio condicionado sin material. Los símbolos representan: MTA Repair HP® (rombo azul), en los diferentes tiempos. El 100% de viabilidad celular representa la condición sin material (cuadrado gris). Los datos representan el promedio del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos independientes, realizados por triplicado.

En la comparación de los tres materiales, se observa que únicamente el MTA Repair HP®, es el material que muestra una menor citotoxicidad y mayor actividad metabólica con tendencia a la

proliferación celular y que además le confiere a los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 cierta protección, por lo que es el material menos citotóxico en fresco y hasta su tiempo de

fraguado; después de las 12 horas, disminuye su actividad metabólica, pero se mantiene estable hasta las 72 horas. El NeoMTA, es el material que mantiene su actividad metabólica más estable en todos los tiempos expuestos, únicamente presenta una disminución de la citotoxicidad a las 24 horas. Los fibroblastos expuestos al MTA Angelus blanco®, se mantienen viables y

estables desde el tiempo en fresco hasta las 24 horas. A partir de las 48 y hasta las 72 horas hay una disminución de su citotoxicidad, observándose un aumento en la actividad metabólica de los fibroblastos. Sin embargo, los resultados muestran que no hubo una diferencia estadísticamente significativa después del tiempo de fraguado entre los tres materiales estudiados.

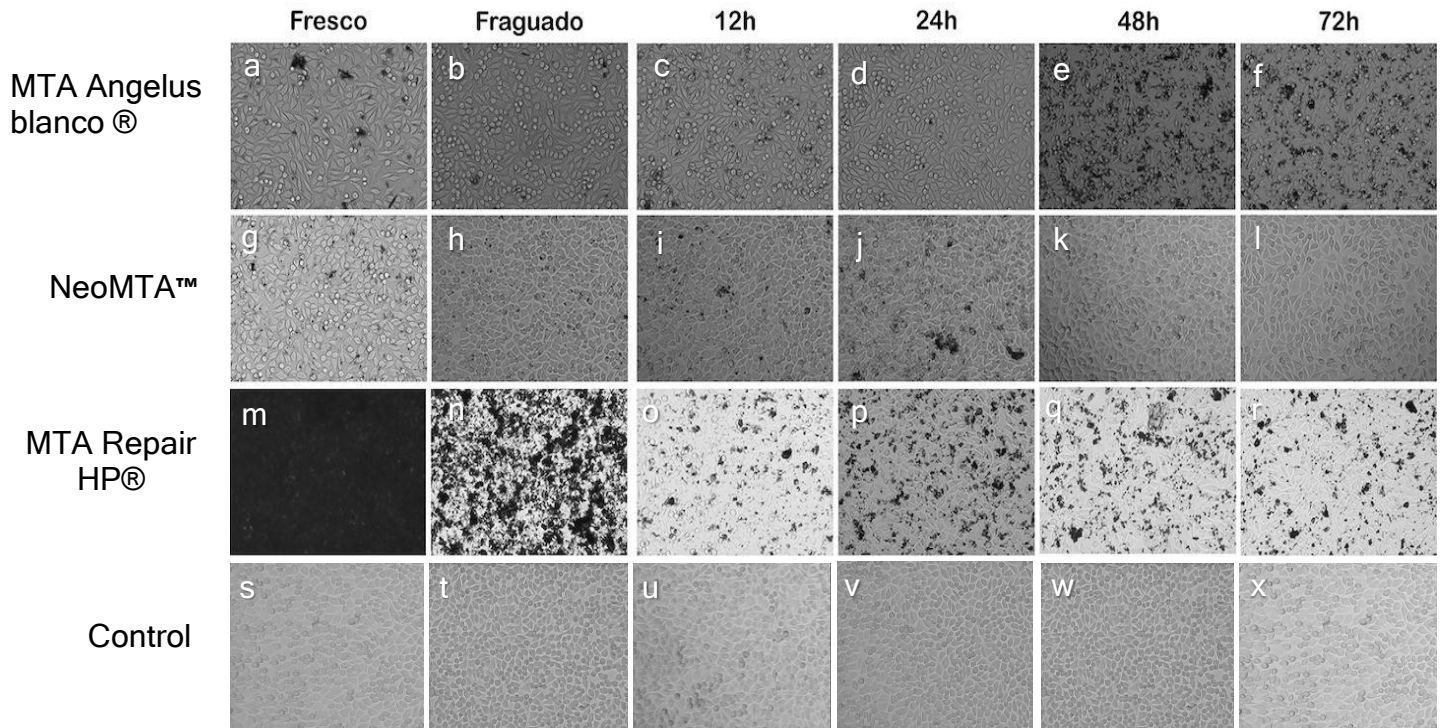


Figura 7. Microfotografías de los fibroblastos L929 expuestos a los diferentes materiales en los diferentes tiempos de exposición. En **a-f** se observa la actividad metabólica de fibroblastos L929 expuestos a MTA Angelus blanco®, en **g-l** se observan fibroblastos expuestos al material NeoMTA™, en **m-r** se observan fibroblastos expuestos a MTA Repair HP® y en las imágenes **s-x**, se observan los fibroblastos L929 del grupo control.

En los resultados graficados, podemos observar la actividad metabólica de los fibroblastos L929 expuestos a los diferentes materiales hidráulicos de silicato de calcio, con respecto a los diferentes tiempos estudiados. El material MTA Repair HP® es el que promovió una mayor actividad metabólica en fresco, esto se aprecia debido a la gran cantidad de formazán que producen las células al ser expuestas al MTT. Al tiempo de fraguado se observa un descenso en la actividad metabólica, y después de las 12 horas el material se mantiene estable con respecto a los otros materiales.

Con el MTA Angelus blanco®, se observa un aumento en la actividad metabólica en fresco, pero no es mayor que con el MTA Repair HP®. Sin embargo, después del tiempo de fraguado se mantiene estable hasta las 72 horas, no mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los demás materiales.

El NeoMTA, es el material que muestra mayor estabilidad en su actividad metabólica y no presenta una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros materiales estudiados.

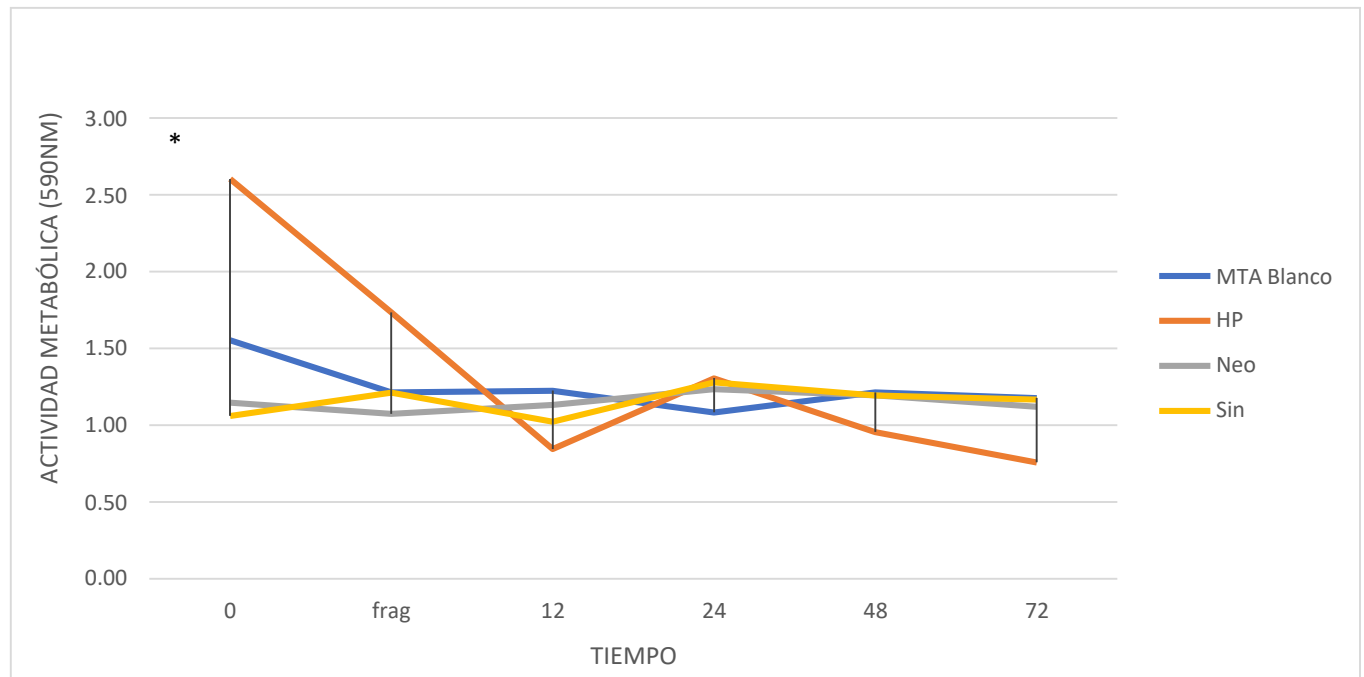


Figura 8. Actividad metabólica de los fibroblastos de ratón de la línea celular L929 expuestos a los tres diferentes materiales hidráulicos de silicato de calcio. Los símbolos representan: MTA Angelus blanco® (rombo azul), MTA Repair HP® (cuadrado naranja), NeoMTA (triángulo gris), en los diferentes tiempos. El 100% de viabilidad celular representa la condición sin material (color amarillo). Los datos representan el promedio del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos por triplicado que se realizaron independiente

DISCUSIÓN

Se estima que del total de procedimientos endodóncicos que se realizan anualmente, el 5% involucran cirugía periapical.⁽²⁸⁾ El objetivo de la cirugía periapical es remover las causas de la enfermedad periapical y proveer un ambiente favorable para la curación. La aparición de nuevos materiales de retrobturación, entre otros avances tecnológicos, mejoran la calidad del tratamiento quirúrgico, el cual tiene una tasa de éxito que va de un 58-96%.⁽²⁹⁾

Se han realizado numerosos estudios *in vitro* sobre fibroblastos gingivales humanos, ya que estos fibroblastos imitan respuestas celulares del hospedero.^(9,30) Sin embargo, Canalda menciona que las células de ratón de la línea L929 poseen una alta sensibilidad a los productos tóxicos.^(31,32)

La mayoría de los estudios sobre citotoxicidad de materiales utilizados en endodoncia, se basan en la toxicidad de materiales fraguados.⁽⁶⁾ Sin embargo, Perinpanayagam y Bonson, mencionan que los materiales en fresco liberan una gran

cantidad de subproductos químicos que probablemente sean citotóxicos para las células, en virtud de las condiciones clínicas (*in vivo*), estos subproductos se diluyen en el fluido de los tejidos intersticiales y son eliminados a través de la vasculatura. Por lo tanto, se ha estudiado el efecto citotóxico de los materiales diluidos.^(6,33)

Kim y Kratchman⁽⁵⁾ mencionan en su artículo, que el MTA es el material de retrobturación más biocompatible y que puede ser usado con mejores resultados predecibles en cirugía endodóncica.⁽³⁴⁾

En este estudio encontramos que con el mineral trióxido agregado MTA Angelus® blanco la citotoxicidad fue menor a las 48 y 72h, lo que concuerda con recientes trabajos publicados^(4,17,35-37) donde se ha encontrado al MTA como un material de retrobturación altamente biocompatible.

Los resultados de nuestro estudio también concuerdan con otros que demuestran la elevada biocompatibilidad del MTA Angelus® blanco en comparación con otros materiales. En su análisis

intragrupal muestra tener un comportamiento heterogéneo de aumentos y disminuciones en la citotoxicidad. Sin embargo, no hay una diferencia estadísticamente significativa que demuestre que este cemento sea más citotóxico que los otros dos.

Siqueira et al., demostraron en un estudio comparativo de biocompatibilidad en fibroblastos gingivales humanos, de los materiales de silicato de calcio NeoMTA, MTA y Biodentine, que el material NeoMTA™ presenta una respuesta inflamatoria inicial moderada, que fue similar a la de MTA y menor que BD; además de la reducción de esta inflamación a lo largo del tiempo.⁽³⁸⁾

En nuestro estudio encontramos que el NeoMTA™ no mostró citotoxicidad sobre fibroblastos L929, por el contrario, muestra tener menor citotoxicidad en fresco y es el material que se mantiene más estable desde el tiempo de fraguado hasta las 72 horas. En su análisis intragrupal no hubo diferencia estadísticamente significativa que demuestre que este cemento sea más citotóxico que los otros cementos estudiados.

Tavares et al., demostraron que el MTA Repair HP®, tiene una mejor respuesta de biocompatibilidad que el MTA blanco, esto podría estar justificado por la ausencia de óxido de bismuto en el MTA HP. Además, observaron que la presencia de tungstato de calcio como agente radiopacificador en MTA HP contribuye a una mayor liberación de calcio en los periodos iniciales, promoviendo una mayor biomineralización, lo que podría explicar la ausencia de citotoxicidad del MTA HP en condiciones de fresco.⁽³⁹⁾

En nuestros estudios observamos que el MTA Repair HP®, muestra una disminución estadísticamente significativa en la citotoxicidad en condiciones de fresco, comparado con MTA Angelus blanco y NeoMTA. Sin embargo, después de los 12 minutos (tiempo de fraguado) la viabilidad celular y la citotoxicidad se mantienen estables. Por lo tanto, no muestra una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros cementos estudiados.

La presencia de tungstato de calcio como agente radiopacificador de este material, contribuye a una mayor liberación de calcio en los periodos iniciales, promoviendo una mayor biomineralización.⁽³⁹⁾

Canalda menciona que cuando el hidróxido de calcio entra en contacto con líquidos del tejido circundante, es disociado en iones calcio (Ca_2) e hidroxilo (OH), y es precisamente el efecto de estos iones sobre los tejidos y microorganismos que es responsable de los resultados más sobresalientes del producto.⁽³⁶⁾

CONCLUSIÓN:

El material MTA Repair HP®, es el que presenta menor citotoxicidad en fresco, después de las 12 horas y hasta las 72 horas se mantiene estable.

En este estudio, se mostró que el material hidráulico de silicato de calcio NeoMTA, es el material que presenta más estabilidad y viabilidad celular desde su colocación en fresco sobre los fibroblastos L929 hasta las 72 horas.

Los materiales hidráulicos de silicato de calcio como el NeoMTA y el MTA Repair HP®, debido a sus mejoras en la formulación, pueden sustituir al MTA convencional y ser utilizados como materiales de retrobutación en cirugía periapical, ya que ninguno de los materiales estudiados mostró ser citotóxico. Se sugiere realizar más estudios, *in vivo* y clínicos comparativos, para ayudar al clínico a tomar la mejor decisión al momento de seleccionar el material para realizar la retrobutación apical.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos al comparar MTA Angelus® blanco, NeoMTA™ y MTA Repair HP®, se concluye que el MTA Repair HP® es el cemento con mayor viabilidad celular y menor citotoxicidad con una diferencia estadísticamente significativa en fresco, esto podría estar justificado por la ausencia de óxido de bismuto en el MTA Repair HP.

REFERENCIAS

1. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* diciembre de 1990;16(12):580-8.
2. Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* octubre de 1990;16(10):498-504.
3. Matsumoto T, Nagai T, Ida K, Ito M, Kawai Y, Horiba N, et al. Factors affecting successful prognosis of root canal treatment. *J Endod.* mayo de 1987;13(5):239-42.
4. Nair U, Ghattas S, Saber M, Natera M, Walker C, Pileggi R. A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* agosto de 2011;112(2):e74-7.
5. Kim S, Kratchman S. Modern Endodontic Surgery Concepts and Practice: A Review. *J Endod.* julio de 2006;32(7):601-23.
6. Perinpanayagam H. Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J Can Dent Assoc.* junio de 2009;75(5):369-72.
7. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *Int Endod J.* agosto de 2003;36(8):520-6.
8. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod.* enero de 2010;36(1):16-27.
9. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol.* agosto de 1996;12(4):161-78.
10. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod.* marzo de 2011;37(3):372-5.
11. Martí-Bowen E, Peñarrocha-Diago M, García-Mira B. Periapical surgery using the ultrasound technique and silver amalgam retrograde filling. A study of 71 teeth with 100 canals. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* el 1 de abril de 2005;10 Suppl 1:E67-73.
12. Kimura JT. A comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part 1: Apical seal and tissue reaction. *J Endod.* agosto de 1982;8(8):359-63.
13. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J.* septiembre de 1980;13(3):131-8.
14. Maher WP, Johnson RL, Hess J, Steiman HR. Biocompatibility of retrograde filling materials in the ferret canine. Amalgam and IRM. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* junio de 1992;73(6):738-45.
15. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J J Aust Soc Endodontology Inc.* abril de 2008;34(1):30-5.
16. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* febrero de 1989;15(2):76-9.
17. Trope M, Lost C, Schmitz H-J, Friedman S. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* febrero de 1996;81(2):221-8.
18. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J.* octubre de 2006;39(10):747-54.
19. Poggio C, Lombardini M, Alessandro C, Simonetta R. Solubility of root-end-filling materials: a comparative study. *J Endod.* septiembre de 2007;33(9):1094-7.
20. Watts JD, Holt DM, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod.* agosto de 2007;33(8):970-3.
21. Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, DE-Deus G, Zuolo ML, et al. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res.* el 14 de junio de 2016;30(1).
22. Tanomaru-Filho M, Garcia AC, Bosso-Martelo R, Berbert FLCV, Nunes Reis JMS, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of addition of calcium oxide on physicochemical properties of Portland cement with zirconium or niobium oxide. *J Conserv Dent JCD.* abril de 2015;18(2):105-8.
23. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J.* diciembre de 2017;50 Suppl 2:e83-94.
24. Chong BS, Pitt Ford TR. Root-end filling materials: rationale and tissue response. *Endod Top.* julio de 2005;11(1):114-30.
25. ISO_10993_5_2009_., *Biological_Evaluation.pdf.*
26. Mossman PB, Young LL. Testing for degrees of color blindness. *Occup Health Saf Waco Tex.*

agosto de 1983;52(8):49-53, 55.

27. Roberts H, Toth J, Berzins D, Charlton D. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature☆. *Dent Mater.* febrero de 2008;24(2):149-64.

28. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* abril de 1999;87(4):398-404.

29. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *J Endod.* junio de 2011;37(6):793-8.

30. Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers: Sealers cytotoxic and up-regulation of gelatinases. *Int Endod J.* enero de 2012;45(1):49-56.

31. Donadio M, Jiang J, He J, Wang Y-H, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* junio de 2009;107(6):e74-8.

32. Bonson S, Jeanson BG, Lallier TE. Root-end Filling Materials Alter Fibroblast Differentiation. *J Dent Res.* mayo de 2004;83(5):408-13.

33. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* marzo de 2010;109(3):e122-125.

34. Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Sunay H, Şahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci Rev FOB.* agosto de 2013;21(4):351-7.

35. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. *J Endod.* febrero de 2010;36(2):190-202.