



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Evaluación de la Citotoxicidad en cultivos de fibroblastos de
ligamento periodontal humano con materiales de
retroobtusión apical: Biodentine TM, IRM®, MTA®.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A:

DAMIÁN MORALES ROMÁN

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESOR: Esp. CARLOS TINAJERO MORALES

Evaluación de la citotoxicidad en cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal humano, utilizando materiales de retroobtención apical: Biodentine™, IRM® y MTA®.

C.D. Damián Morales Román1. Residente de la Especialidad en Endodoncia de la DEPEI de la UNAM.
Dr. Jacinto Alemán Luis Fernando2. Profesor del Laboratorio de Patología Bucal de la DEPEI de la UNAM.
C.D.Esp. Tinajero Morales Carlos3. Profesor en la Especialidad en Endodoncia de la DEPEI de la UNAM.

Introducción

El tratamiento quirúrgico supone aproximadamente el 3-10% de la práctica de la especialidad endodóncica, y la cirugía perirradicular generalmente se realiza en presencia de patología perirradicular persistente o cuando el tratamiento endodóncico por vía ortógrada ha fracasado. ⁽¹⁾La cirugía periapical se debe considerar una extensión del tratamiento no quirúrgico ya que la etiología de la enfermedad y los objetivos del tratamiento son los mismos: la prevención o la eliminación de la periodontitis apical crónica.

Después de la preparación apical, un material de obturación retrógrada se utiliza para sellar la cavidad del extremo radicular. La prevención de microfiltración, biocompatibilidad y estabilidad del material en los tejidos apicales es muy importante. Una obturación apical del conducto radicular de buena calidad es esencial para el éxito de la cirugía endodóncica. ⁽²⁾

Muchos materiales se han utilizado para el relleno de la preparación retrógrada, incluyendo a la amalgama, gutapercha, cementos a base de óxido de zinc-eugenol, ionómero de vidrio, oro, Cavit®, resina compuesta, cemento biocerámico y MTA®. Desafortunadamente, el material de relleno retrógrado ideal aún no se ha encontrado. ⁽³⁾

El MTA® fue introducido como material de obturación retrógrada en endodoncia por Mahmoud Torabinejad. Es el material reconocido como el estándar de oro para una gran variedad de situaciones clínicas y es quizás lo más cercano al material ideal. ⁽⁴⁾

IRM® es un material a base de óxido de zinc-eugenol, el cual fue introducido en cirugía periapical en busca de encontrar materiales alternos que mejoraran el sellado apical y con menor citotoxicidad en comparación a la amalgama dental. ⁽⁵⁾

Biodentine™ es el más reciente material de introducción a la gama de productos empleados en procedimientos endodóncicos. Este material reúne grandes propiedades mecánicas, fácil manipulación y alta biocompatibilidad comparables al MTA®. ⁽⁶⁾

Para lograr la cirugía perirradicular satisfactoria, un material de obturación retrógrada ideal debe cumplir los siguientes requisitos: biocompatibilidad con los tejidos periapicales, alta capacidad de sellado, capacidad deseable de

regeneración del tejido periapical, inhibición eficaz de microorganismos patógenos, radiopacidad suficiente para distinguir el material del tejido circundante y excelentes propiedades de trabajo y manipulación.

Numerosos estudios con diversos métodos y materiales de ensayo se han aplicado para evaluar la biocompatibilidad. Los principales métodos son pruebas de citotoxicidad sobre células o cultivos de tejidos, implantación en el tejido conectivo subcutáneo o hueso en animales de experimentación.⁽²⁾

Este trabajo evaluó la viabilidad celular de fibroblastos de ligamento periodontal humano, por medio de un ensayo IN VITRO de 3 diferentes materiales utilizados en cirugía periapical (MTA®, IRM® Y BIODENTINE™).

Antecedentes

La amalgama fue un material de obturación retrógrada de uso frecuente, con buena radiopacidad y no reabsorbible.^(3,7) Los efectos biológicos de la amalgama se cree que depende del modo de fabricación y la composición de la aleación. El zinc es conocido por ser citotóxico y su liberación de la amalgama se considera una causa importante de citotoxicidad. Las amalgamas libres de zinc son menos citotóxicas en comparación con las que contienen zinc.⁽⁸⁾

En estudios a corto plazo la respuesta de los tejidos periapicales a la amalgama ha mostrado ser desfavorable, asociada principalmente a la inflamación. Estos estudios han oscilado entre 2 semanas a 5 meses después de la colocación.

Tronstad et al., concluyeron que las amalgamas de plata convencionales recién mezcladas eran muy citotóxicas debido al mercurio sin reaccionar, y la citotoxidad de la amalgama disminuía al endurecer.⁽⁹⁾ Maher et al., en un modelo animal (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 investigación encontró que la amalgama que se coloca en la porción apical de la raíz es rodeada por tejido conectivo fibroso en las próximas 15 semanas.⁽¹⁰⁾

Otros tipos de cementos empleados en la obturación retrógrada son; a base de óxido de Zinc-eugenol (Super EBA® e IRM®) que se han empleado en cirugía periapical. El cemento Super EBA® está compuesto de 60% de óxido de zinc, 34% de óxido de aluminio, 6% de resina natural y el líquido 37.5% de eugenol y 62.5% de ácido ortoetoxibenzoico; la composición del IRM® es 80% de óxido de zinc, 20% de Polymetilmetacrilato, el líquido contiene 99% de eugenol y 1% de ácido acético. Dado que ambos, Super EBA® e IRM® contienen eugenol, se ha expresado preocupación acerca de los posibles efectos nocivos sobre los tejidos periapicales.⁽⁷⁾ Sin embargo, Blackman et al., reportaron que el IRM® es relativamente biocompatible y sugirieron que sería útil para los procedimientos de obturación apical en Endodoncia.⁽¹¹⁾ Adicionalmente Oynick y Oynick, reportaron crecimiento de fibras colágenas sobre Super EBA® como material de obturación retrograda, además reportaron a este material como biocompatible.⁽¹²⁾ Dorn y Gartner, examinaron los resultados del IRM®, Super

EBA® y amalgama como materiales de obturación apical de 6 meses hasta 10 años, reportando un éxito del tratamiento en un 95% con Super EBA®, 91% con IRM® y 75% con amalgama, sugiriendo al cemento Super EBA® como más biocompatible, sin existir una diferencia estadísticamente significativa entre IRM® y Super EBA®.⁽¹³⁾ 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.⁽¹⁴⁾

MTA®

El MTA® fue introducido como material de obturación retrógrada en endodoncia por Mahmoud Torabinejad y colaboradores en 1993, su patente fue otorgada en 1995 y comercializado en 1998.⁽⁴⁾ La composición del cemento MTA® (ProRoot MTA Dentsply/Tulsa Dental, Tulsa, OK) es un polvo que contiene 53.1% de silicato tricálcico, 22.5% silicato dicálcico, 21.6% de óxido de bismuto y pequeñas porciones de aluminio tricálcico y sulfato de calcio; así como un líquido que contiene agua estéril.⁽¹⁵⁾

Actualmente existen dos presentaciones de MTA® (gris y blanco), es ampliamente utilizado en obturaciones retrógradas, apexificaciones, pulpotomías y reparación de perforaciones. El MTA® ha sido reconocido como el estándar de oro para una gran variedad de situaciones clínicas y es quizás lo más cercano al material ideal, debido a sus excelentes propiedades físico-químicas y biológicas.⁽¹⁶⁾

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.⁽¹⁵⁾

La capacidad de sellado de este material en obturaciones retrógradas es superior al de la amalgama, IRM® y Super EBA® tanto en estudios de filtración de tinta como bacteriana.⁽¹⁷⁾ En un estudio realizado en animales, el MTA® mostró producir una menor respuesta inflamatoria en los tejidos periapicales y una mayor formación de cemento radicular sobre el material, comparado con el cemento Super EBA®, IRM® y amalgama.^(18,19,20)

Biodentine™

Un nuevo material basado en silicato de calcio, desarrollado por investigadores de Septodont, como un sustituto de la dentina dañada es Biodentine™ (Septodont Ltd., Saint Maur des Fausse's, France). Es el más reciente material de introducción a la gama de productos empleados en procedimientos endodóncicos. Este material reúne grandes propiedades mecánicas, fácil manipulación y alta biocompatibilidad.

Los componentes de Biodentine™ son silicato tricálcico (principal componente del polvo y regulador la reacción de fraguado), carbonato de calcio (material de relleno), dióxido de zirconio (otorga radiopacidad al cemento), cloruro de calcio (acelerador de reacción), óxido de hierro y un agente reductor de agua (reduce la viscosidad del cemento). El líquido contiene cloruro de calcio, como

acelerador y polímero hidrosoluble que funciona como agente resistente al agua.⁽²¹⁾ Su pH es alcalino de 11.7-12.3. La mezcla se basa principalmente en un policarboxilato modificado, que logra una alta resistencia a corto plazo, reduciendo la cantidad de agua requerida por la mezcla y manteniendo su fácil manipulación.⁽²²⁾

Según los estudios clínicos realizados con Biodentine™, este cemento no es citotóxico, mutagénico, sensibilizante o irritante. Laurent en 2008⁽²¹⁾, reportó que el uso de Biodentine™ en contacto directo con el tejido pulpar, induce el desarrollo de dentina reparativa (primer signo de formación de puente dentinario), manteniendo la vitalidad pulpar. Este estudio sugiere que Biodentine™ es capaz de estimular la iniciación y desarrollo de mineralización, haciéndolo comparable con el MTA®. Otras indicaciones terapéuticas para este material son la reparación de perforaciones en conductos radiculares o piso de cámara pulpar, cirugía endodóncica retrógrada, pulpotomía en molares temporales y apexificación.⁽⁶⁾

Ensayo MTT

Este método es utilizado para medir supervivencia y proliferación celular; se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas, por lo tanto la producción de formazan es directamente proporcional a la viabilidad celular, se escogió realizar este ensayo debido a su simplicidad, precisión y accesibilidad.^(23,24,25)

Planteamiento del problema

En la actualidad la variedad de materiales para la obturación retrógrada es amplia; sin embargo, siempre se debe considerar al material con mayor biocompatibilidad como el candidato a emplear, además de que debe cumplir los requerimientos clínicos necesarios según el caso. Actualmente el IRM® y MTA® son la alternativa clínica más empleada en los procedimientos de cirugía periapical con obturación. No obstante la reciente introducción de materiales a base de silicatos tricálcicos como Biodentine™, plantea la necesidad de analizar su efecto y propiedades para poder ser empleado en procedimientos quirúrgicos como la obturación retrógrada. El estudio de la biocompatibilidad a través de ensayos de citotoxicidad o viabilidad celular es el principal requisito que debe ser analizado. Por lo cual surge el siguiente cuestionamiento: de los cementos para retrobturación como Biodentine™, IRM® y MTA®, ¿cuál será el de mayor biocompatibilidad?

Justificación

El material ideal para la obturación retrógrada del sistema de conductos radiculares, sería aquel que sella el conducto impidiendo la salida de bacterias y sus productos tóxicos hacia los tejidos periapicales, que sea reabsorbible por los tejidos periapicales, biocompatible y estable dimensionalmente a lo largo del tiempo. Uno de los aspectos más importante a evaluar en materiales que se usan en cirugía periapical es la tolerancia biológica de acuerdo a Chong y Pitt Ford.⁽²⁶⁾ En este estudio se compara la biocompatibilidad del MTA®, Biodentine™ e IRM® evaluando la citotoxicidad *in vitro* sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados; los resultados pretenden guiar al clínico a tomar una mejor decisión en la elección del material para realizar la retroobturación apical del conducto radicular.

Objetivo

Evaluar el efecto de los cementos IRM®, MTA® y Biodentine™ sobre la viabilidad de fibroblastos de ligamento periodontal humano.

Hipótesis

H₀ La viabilidad celular es igual en fibroblastos de ligamento periodontal humano expuestos a Biodentine™, MTA® e IRM®.

H₁ La viabilidad celular será mayor en fibroblastos de ligamento periodontal humano expuestos a Biodentine™ comparado a los expuestos a MTA® e IRM®.

H₂ La viabilidad celular será menor en fibroblastos de ligamento periodontal humano expuestos a Biodentine™, comparado a los expuestos a MTA® e IRM®.

Materiales y métodos

Cementos endodóncicos

Tres cementos que se emplean como material de obturación retrógrada en cirugía periapical fueron utilizados para evaluar su citotoxicidad, el MTA Angelus® blanco (Angelus, Londrina-PR-Brasil), IRM® (LD Caulk Division, Dentsply International, Milford, Del) y Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France). La composición y los datos del fabricante de cada cemento se muestran en la tabla 1. Los cementos fueron preparados con base en las instrucciones de cada fabricante. Brevemente, la preparación se muestra en la tabla 2.

Tabla 1. Cementos, composición y fabricante

Cemento sellador	Composición	Fabricante
IRM®	Polvo: óxido de zinc y polimetilmetacrilato Líquido: Eugenol	LD Caulk Division, Dentsply International, Milford, Del.
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-P-R-Brasil
Biodentine™	Polvo: Silicato tricálcico, Carbonato de calcio y Dióxido de zirconio Líquido: Cloruro de calcio, Agente reductor de agua y agua	Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France

Tabla 2 Modo de preparación de los cementos		
Cemento sellador	Modo de preparación	Tiempo de fraguado inicial
IRM® ^(27,28)	1.5 cucharadas de polvo 1 gota de líquido	3-5 min.
MTA ANGELUS® BLANCO ^(6,29)	1 cucharada de polvo y 1 gota de agua destilada	10 min.
BIODENTINE™ (6,30)	Colocar 5 gotas de la pipeta al interior de la cápsula, mezclar por 30 seg. en amalgamador.	10-12 min.

Preparación de medio de cultivo condicionado

La obtención de los medios condicionados se realizaron en un ambiente aséptico dentro de una campana de flujo laminar (Baker, Edge Gard). Se mezclaron los cementos de acuerdo a la instrucciones del fabricante, colocando 1 mm de espesor aproximadamente en el fondo del pozo en una caja de 24 pozos de cada cemento, lo cual correspondió a una área de 2cm², se colocó 1 ml de DMEM/F12 con SFB al 10% con penicilina y estreptomycin, el cual fue diluida a 4ml, según las especificaciones de la norma ISO 10993-5. Se prepararon tres protocolos para la obtención de medio condicionado. El protocolo 1 correspondió a preparación del cemento, colocación y recuperación inmediata del medio de cultivo. El protocolo 2 correspondió a la preparación del cemento y recuperación del medio 24 horas después de su incubación a 37 °C con 5% CO₂. En el protocolo 3 se permitió el fraguado de 24 horas de los cementos bajo luz UV en ambiente aséptico, y posterior a la aplicación el medio DMEM y se recuperó 24 horas después. Los medios fueron mantenidos a 4°C hasta su momento de uso. (Fig. 1)

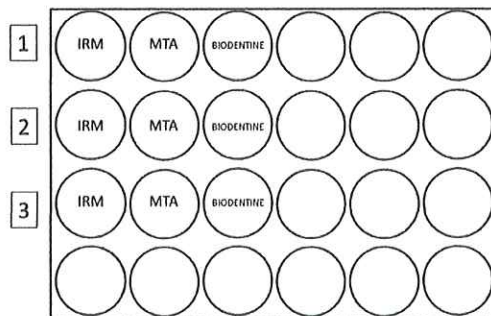


Fig. 1 Preparación de medio condicionado

Ensayo de viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de MTT (metiltiazoltetrazolio). Las células empleadas para este ensayo fueron fibroblastos de ligamento periodontal humano (donadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez), las cuales se cultivaron a una densidad de 1×10^4 . Los tiempos de cultivo y medición fueron 0, 24, 48, 72 horas, 7 y 14 días, realizando los ensayos por triplicado para cada medio condicionado (Fig. 2).

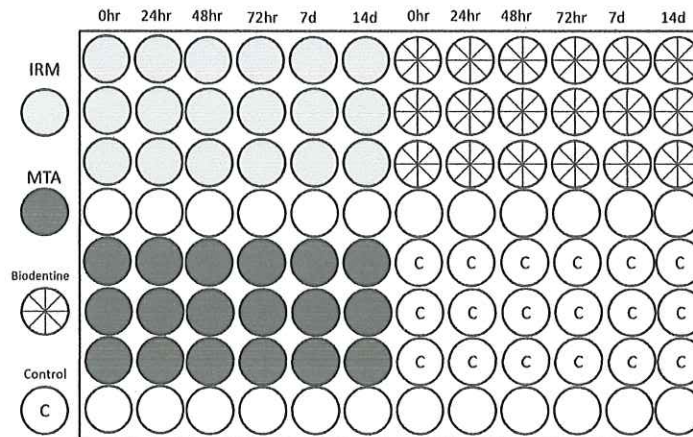


Fig. 2 Viabilidad celular.

Se utilizó el ensayo Vibrant MTT (Molecular Probes, Invitrogen, EU) siguiendo las instrucciones del fabricante; se adicionaron 10 μ l de la solución MTT a cada pozo de la caja de cultivo, se incubó a 37°C por 4 horas, la reacción fue detenida adicionando 50 μ l de DMSO (dimetilsulfoxido), incubando nuevamente por 10 minutos. La lectura de absorbancia fue realizada a una longitud de onda de 545nm en el lector de placas (ChroMateAwarenessTecnology Inc. E.U).

Análisis estadístico

Se obtuvieron medidas de tendencia central y dispersión. Se realizó el análisis estadístico utilizando el ensayo de ANOVA de medidas repetidas para determinar la significancia de las mediciones temporales, así como el ANOVA con post hoc de Dunnet para determinar la significancia de comparaciones entre los distintos protocolos y el control. Se consideró una $P < 0.05$ como significativa.

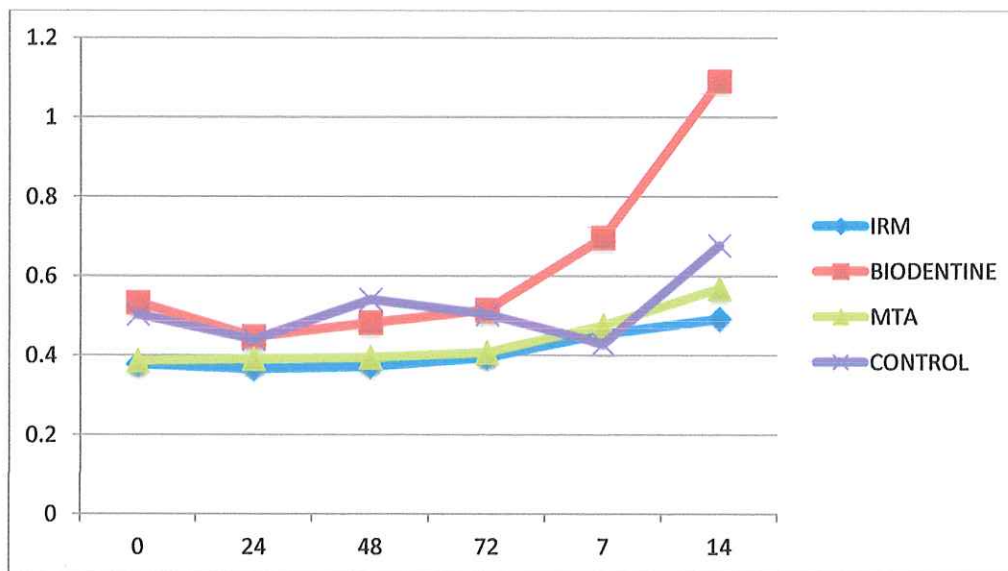
Resultados

Los resultados observados respecto a la viabilidad celular de fibroblastos del ligamento periodontal (FLP) por medio del ensayo MTT en relación a la absorbancia para el grupo control se observó una conducta heterogénea (tabla 3), con descensos y ascensos en la viabilidad, con una tendencia final hacia la proliferación, presentando aumento significativo en la viabilidad celular únicamente a los 14 días de cultivo ($P=0.043$).

En el protocolo 1, el medio condicionado con IRM® se observó una mayor tendencia proliferativa en los FLP. Se presentaron aumentos significativos al comparar nuestra medición basal (0 horas) contra la medición de 72 horas ($p=0.046$), 7 días ($p=0.030$) y 14 días ($p=0.040$).

En el medio condicionado con Biodentine™, los FLP, presentaron una marcada tendencia proliferativa, no obstante, solo se observó un aumento significativo al comparar nuestro grupo base contra 14 días ($p=0.016$).

En el medio condicionado con MTA®, los FLP mostraron una tendencia proliferativa predominante, se observó aumento significativo en la medición de 7 días ($p<0.001$).

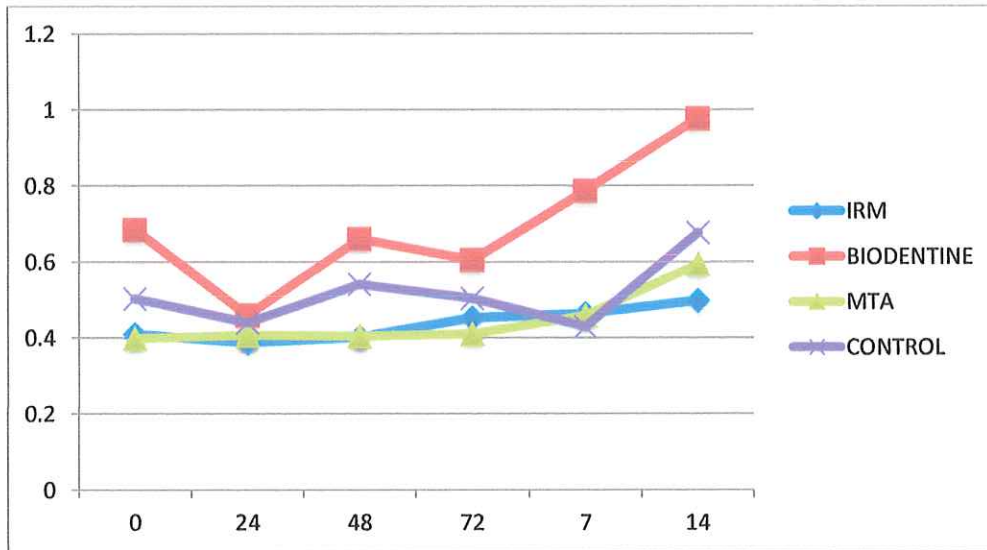


Gráfica 1. Protocolo 1

En el protocolo 2, el medio condicionado con IRM® los FLP, presentaron una tendencia proliferativa, sin presentar cambios significativos al compararlos con la medida basal (0 horas).

En el medio condicionado con Biodentine™, los FLP mostraron un comportamiento heterogéneo con aumentos y disminuciones en la proliferación celular con tendencia a la proliferación. Se presentó una disminución significativa de la viabilidad a las 24 horas ($p=0.007$) y un aumento significativo a los 14 días ($p=0.013$) al compararlos con la medida basal de 0 horas.

El medio condicionado de MTA® los FLP, presentaron una tendencia proliferativa. Se observaron cambios significativos en el día 7 ($p=0.035$) en comparación a las 0 horas.

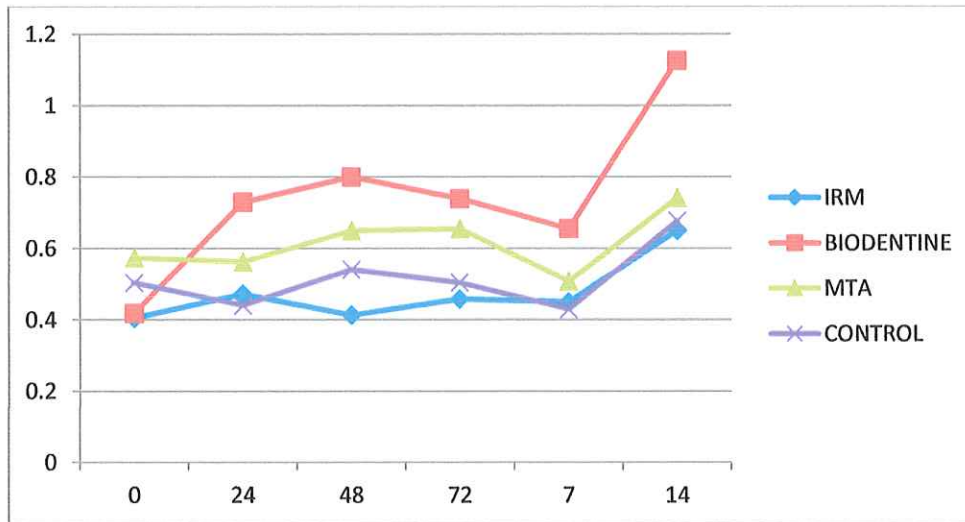


Gráfica 2. Protocolo 2

En el protocolo número 3, el medio condicionado con IRM® los FLP presentaron un comportamiento heterogéneo con aumentos y disminuciones en la proliferación celular con tendencia a la proliferación. Se observó significancia en el día 14 ($p=0.003$) al compararlo con las 0 horas.

En el medio condicionado con Biodentine™ su comportamiento fue heterogéneo con aumentos y disminuciones en la viabilidad celular, la tendencia fue a la proliferación. Al compararlos con la medida basal de 0 horas, se observó un aumento significativo de la viabilidad celular a las 24 horas ($p=0.003$), 48 horas ($p=0.001$) y a los 14 días ($p=0.002$).

El medio condicionado con MTA® su comportamiento fue heterogéneo con aumentos y disminuciones en la viabilidad celular, con tendencia a la proliferación. Se observó un aumento de la viabilidad celular a las 48 horas ($p=0.011$) y en el día 14 ($p=0.001$).



Gráfica 3. Protocolo 3

Tiempo		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	7 días	14 días
Control		.503(.03)	.44(.02)	.54(.02)	.504(.06)	.429(.006)	.676(.04)
Protocolo 1	IRM	.377(.006)	.366(.003)	.372(.002)	.394(.006)	.454(.01)	.492(.03)
	MTA	.386(.01)	.391(.004)	.394(.01)	.407(.01)	.475(.01)	.569(.12)
	BIODENTINE	.532(.17)	.447(.01)	.482(.01)	.514 (.02)	.697(.02)	1.09(.05)
Protocolo 2	IRM	.409(.02)	.387(.01)	.402(.005)	.452(.03)	.464(.01)	.497(.03)
	MTA	.399(.003)	.406(.01)	.404(.01)	.41(.006)	.458(.01)	.593(.103)
	BIODENTINE	.684(.02)	.458(.01)	.66(.02)	.604(.10)	.786(.06)	.97(.03)
Protocolo 3	IRM	.404(.01)	.471(.01)	.412(.01)	.457(.05)	.449(.01)	.650(.02)
	MTA	.573(.01)	.562(.16)	.649(.02)	.654(.04)	.507(.01)	.741(.002)
	BIODENTINE	.481(.01)	.729(.02)	.799(.008)	.738(.20)	.654(.14)	1.12(.03)

En las comparaciones intergrupales o múltiples de los diferentes cementos y el control, se observó que en el protocolo de acondicionamiento 1 únicamente el grupo Biodentine™ presentó aumentos significativos en la proliferación celular ($P < 0.001$), mientras que en los grupos MTA® e IRM® no se observó cambios significativos. En el protocolo 2 se observó el mismo patrón que en protocolo 1 para los tres cementos. En el protocolo 3 observamos que tanto Biodentine™ como MTA® presentaron cambios significativos en la proliferación celular ($P < 0.001$), mientras que IRM no presentó cambios respecto a la proliferación a los 14 días de seguimiento.

Comparativos intergrupales			
	IRM	MTA	BIO
Protocolo 1	P=0.932	P=0.536	P=<0.001*
Protocolo 2	P=0.353	P=0.213	P=<0.001*
Protocolo 3	P=0.148	P=<0.001*	P=<0.001*

*Significancia de Comparativos intergrupales

Discusión

El objetivo de la cirugía periapical es remover las causas de la enfermedad periapical y proveer un ambiente favorable para la curación. Se han fabricado nuevos materiales de retro-obturación, entre otros avances tecnológicos que mejoran la calidad del tratamiento quirúrgico, el cual tiene una tasa de éxito que va de un 58% - 96%.⁽³¹⁾

Uno de los requisitos más importantes de un material de retro-obturación utilizado en cirugía periapical es su tolerancia biológica. 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.⁽²⁶⁾ En este trabajo de investigación *in vitro* se evaluó la citotoxicidad sobre fibroblastos de ligamento periodontal (FLP), de 3 diferentes cementos (MTA®, IRM® Y Biodentine™) utilizados para realizar retro-obturación en procedimientos quirúrgicos endodóncicos, utilizando la viabilidad celular como parámetro de medición por medio de un ensayo MTT. Se utilizaron células de FLP para tratar de simular la respuesta celular inducida por los cementos en la región periapical después de la obturación endodóncica, al igual que en otros experimentos.^(32,33,34,35)

El IRM® dentro de esta investigación mostró ser el más citotóxico de los cementos evaluados en los 3 protocolos; aun así, en su análisis intragrupal a pesar de tener un comportamiento heterogéneo de aumentos y disminuciones en la viabilidad, su tendencia fue a la proliferación. Sin embargo en los tres protocolos fue el cemento que obtuvo menor viabilidad. Estos resultados coinciden con otros estudios^(35,36) en los cuales al compararlo con el MTA® mostró ser más citotóxico.

Esta citotoxicidad puede ser debida al eugenol que representa el 99% de la composición del líquido del IRM®, la liberación de este compuesto según Maher et al, puede causar un proceso de curación más lento.⁽¹⁰⁾ Sin embargo en estudios clínicos que comparan el MTA® con IRM® como materiales de retro-obturación no existió diferencia estadísticamente significativa en la curación de las cirugías periapicales realizadas, sugiriendo que ambos materiales son opciones a tomar en cuenta como materiales de retoobturación.^(5,37,38)

El grupo de MTA® mostró una tendencia a la proliferación celular, siendo esta mayor que el IRM® y menor que Biodentine™, los aumentos significativos en la viabilidad celular se presentaron a partir del día 7 en los protocolos 1 y 2, pero en el protocolo número 3 obtuvo un aumento significativo en la proliferación celular a las 48 horas y 14 días. Al igual que el eugenol en el IRM® se considera un componente citotóxico, el MTA® contiene óxido de bismuto el cual le da la propiedad de ser un material radiopaco, este compuesto ha sido cuestionado por Camilleri J. et al, ya que considera que el óxido de bismuto no estimula la proliferación celular a corto plazo, ⁽³⁹⁾sin embargo se considera que este compuesto no afecta la biocompatibilidad del MTA® y las células tienen la capacidad de aumentar su proliferación con el paso del tiempo. ^(40,41)

Biodentine™ mostró ser el menos citotóxico de los 3 materiales estudiados, con aumentos significativos de la viabilidad celular y aumentando la proliferación celular conforme pasa el tiempo, siendo una constante el aumento de la viabilidad en el día 14, en los 3 protocolos. Solo existió una disminución significativa de la viabilidad a las 24 horas en el protocolo número 2, recuperando la viabilidad al aumentar el tiempo de exposición.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos al comparar Biodentine™ con MTA® e IRM®, Biodentine™ fue el cemento con mayor viabilidad celular, existiendo diferencias significativas en el día 14 de los 3 protocolos, esto puede ser debido a la composición de los materiales, ya que Biodentine™ tiene óxido de zirconio como elemento que le da radiopacidad, en un estudio publicado por Li J. et al, ⁽⁴²⁾ se observó que los fibroblastos expuestos a óxido de zirconio exclusivamente, se redujo el número de células a un 90% después de 1 día de exposición. Esto puede ser comparable a lo sucedido con el protocolo número 1 y 2 de nuestro ensayo, donde existió una disminución significativa en la viabilidad celular a las 24 horas, no obstante después de este tiempo hubo una recuperación de la proliferación celular conforme aumentaba el tiempo de exposición, debido a la eliminación o degradación de este compuesto. Interesantemente en el protocolo 3 no existió una disminución significativa de la viabilidad coincidiendo con el estudio de Dion et al, donde se evaluó la citotoxicidad del óxido de zirconio sobre fibroblastos de ratón, sugiriéndonos que este compuesto no es citotóxico para las células. ⁽⁴³⁾

La intención de realizar 3 protocolos para la obtención de medio de cultivo condicionado se basó en la consideración del tiempo de fraguado. Tanto para el protocolo 1 y 2 se colocaron el DMEM de forma inmediata, permitiendo la solubilización de los cementos de una manera más rápida. No así en el protocolo 3 donde se permitió que fraguara 24 horas para colocar el DMEM. Nuestro análisis estadístico indicó que Biodentine™, tanto para el protocolo 1 y 2 obtuvo aumentos significativos en la viabilidad, mientras que en protocolo 3 Biodentine™ y MTA® reportaron aumentos significativos. Estos resultados podrían relacionarse con el estudio de Zhou et al, teniendo en cuenta que en el protocolo 3 los materiales entraron en contacto con el medio de cultivo 24 horas después de fraguados; estos materiales probablemente tuvieron menor dilución, las diluciones con menor concentración de los cementos tendrán una mayor viabilidad. ⁽³⁴⁾ En otro estudio, Khedmat et al, menciona que el tiempo de almacenamiento después del fraguado de los cementos, influye en la viabilidad, a mayor tiempo de almacenamiento menor es la liberación de los

componentes del cemento una vez que entra en contacto con el medio de cultivo, por consiguiente la viabilidad aumenta independientemente del tiempo de exposición.⁽²⁴⁾

En la actualidad existen diversos estudios de citotoxicidad *in vitro* que refieren que no existe una diferencia significativa entre MTA® y Biodentine™, teniendo ambos cementos comportamientos similares.^(23,24,44)

Al igual que Biodentine™, aparecen materiales nuevos que tratan de mejorar las características del MTA®, tal es el caso de EndoSequence Root Repair Material® (Brasseler USA, Savannah, GA), el cual es un material biocerámico compuesto por silicato de calcio, óxido de zirconia, óxido de tantalio, fosfato cálcico y agente de relleno. De acuerdo a la consistencia deseada, el ERRM® en jeringa se utiliza como cemento sellador en la obturación de conductos; mientras que el ERRM® en consistencia de masilla es firme y moldeable, ideal para reparar perforaciones, como material de obturación retrógrada, formación de topes apicales y para recubrimientos pulpares.^(32,33,45) Sería interesante realizar un ensayo para comparar la citotoxicidad entre Biodentine™ y ERRM®, con la misma finalidad de este estudio.

Conclusiones

En este ensayo, se observó que Biodentine™ es el cemento que mostró mejores resultados en la viabilidad celular, en comparación con MTA® e IRM®. Los resultados obtenidos quizá se deben a la composición de cada uno de los cementos y al tiempo de fraguado del cemento, por lo que se sugiere realizar mayores estudios, *in vivo* y clínicos comparativos, para ayudar al clínico a tomar la mejor decisión al momento de seleccionar el material para realizar la retro-obturación apical.

Bibliografía

1. Nash KD, D P, Brown JL, Hicks LM. Private Practicing Endodontists: Production of Endodontic Services and Implications for Workforce Policy. *Journal of Endodontics*. 2002 October; 28(10): p. 699-705.
2. Cohen S, Burns RC. *Vías de la Pulpa*. 10th ed. España: Elsevier; 2007.
3. S.R. P, Veronica A. A literature Review of Root-End Filling Materials. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2013 September-October; 9(4): p. 20-25.
4. Baek SH, Lee WC, Seltzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, Super EBA, and mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*. 2010; 36(8): p. 1323-325.
5. Chong BS, Ford TRP, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *International Endodontic Journal*. 2009; 42: p. 414-420.
6. Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endodontics Topics*. 2015; 32: p. 3-30.
7. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. *Australian Endodontic Journal*. 2008 April 4; 34(1): p. 30-35.
8. Kimura JT. A comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part 1: apical sealant tissue reaction. *Journal of Endodontics*. 1982 August; 8(8): p. 359-363.
9. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *International Endodontic Journal*. 1980 September; 13(3): p. 131-138.
10. Maher WP, Johnson RL, Hess J, Steiman HR. Biocompatibility of retrograde filling materials in the ferret canine Amalgam and IRM. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1992 June; 73(6): p. 738-745.
11. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *Journal of Endodontics*. 1989 February; 15(2): p. 76-79.
12. Onyick J, Onyick T. A study of new material for retrograde filling. *Journal of Endodontics*. 1978; 4(7): p. 203-206.
13. Dorn SO, Gartner AH. Retrograde filling materials: A retrospective success-failure study of amalgam, EBA, and IRM. *Journal of Endodontic*. 1990 August; 16(8): p. 391-393.
14. Trope M, Lost C, Schmitz HJ, Shimon F. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1996 February; 81(2): p. 221-228.
15. 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. *Journal of Endodontics*. 2007; 33(8): p. 970-973.
16. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic Journal*. 2006 October; 39(10): p. 747-754.

17. Poggio C, Lombardini M, Alessandro C, Simonetta R. Solubility of root-end-filling materials: a comparative study. *Journal of Endodontics*. 2007; 33(9): p. 1094-1097.
18. Baek SH, Plenck HJ, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA and MTA as root-end filling materials. *Journal of Endodontics*. 2005; 31(6): p. 444-449.
19. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of Endodontics*. 1995; 21: p. 489-492.
20. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material in monkeys. *Journal of Endodontics*. 1997; 23: p. 225-228.
21. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca (3) SiO(5)-based posterior restorative material. *Dental Materials*. 2008 November; 24: p. 1486-1494.
22. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *International Endodontic Journal*. 2013; 46: p. 632-641.
23. Silva E, Senna PM, De-Deus G, Zaia A. Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. *International Endodontic Journal*. 2015 July.
24. Khedmat S, Dehgan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar MH, Howell Dummer PM. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restorative&Endodontics*. 2014 August; 39(3): p. 149-154.
25. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 1986 May; 89(2): p. 271-277.
26. Chong BS, Ford TRP, Hudson MB. Root-end filling materials rationale and tissue response. *Endodontic Topics*. 2005; 11: p. 114-130.
27. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *International Endodontic Journal*. 2010; 43(3): p. 231-240.
28. Dentsply. [Online]. [cited 2016 Enero. Available from: [HYPERLINK "https://www.dentsply.com/content/dam/dentsply/pim/manufacture/Restorative/Direct_Restoration/Intermediate_Restorative/Zinc_Oxide_Eugenol/IRM_ZOE_In%20intermediate_Restorative_Material/CAU_610003/510001-IRM-DFU-a5qydel-en-1504.pdf"](https://www.dentsply.com/content/dam/dentsply/pim/manufacture/Restorative/Direct_Restoration/Intermediate_Restorative/Zinc_Oxide_Eugenol/IRM_ZOE_In%20intermediate_Restorative_Material/CAU_610003/510001-IRM-DFU-a5qydel-en-1504.pdf)
29. Pineda Mejía ME, Silva Infantes M, Salcedo Moncada D. Uso clínico del agregado de trióxido mineral (MTA) en el tratamiento de lesiones periapicales y perforaciones radiculares. *Odontología Sanmarquina*. 2007; 27(1): p. 21-24.
30. Septodont. [Online]. [cited 2016 Enero. Available from: [HYPERLINK "https://www.dentsply.com/content/dam/dentsply/pim/manufacture/Restorative/Direct_Restoration/Intermediate_Restorative/Zinc_Oxide_Eugenol/IRM_ZOE_In%20intermediate_Restorative_Material/CAU_610003/510001-IRM-DFU-a5qydel-en-1504.pdf"](https://www.dentsply.com/content/dam/dentsply/pim/manufacture/Restorative/Direct_Restoration/Intermediate_Restorative/Zinc_Oxide_Eugenol/IRM_ZOE_In%20intermediate_Restorative_Material/CAU_610003/510001-IRM-DFU-a5qydel-en-1504.pdf)

1504.pdf

31. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 1999 April; 87(4): p. 398-404.
32. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *Journal Of Endodontics*. 2011 June; 37(6): p. 793-798.
33. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and endosequence bioceramic root repair materials. *Journal of Endodontics*. 2001; 37(3): p. 372-373.
34. Zhou Hm, Shen Y, Wang Zj, Li L, Zheng Yf, Häkkinen L, et al. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material. *Journal of Endodontics*. 2013 April; 39(4): p. 478-483.
35. Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate using Human Periodontal Ligament Fibroblast. *Journal of Endodontics*. 2000 May; 26(5): p. 288-291.
36. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *International Endodontic Journal*. 2005 April; 38(4): p. 203-210.
37. Lindeboom JAH, Frenken JWFH, Kroon FHM, van den Akker HP. A comparative prospective randomized clinical study of MTA and IRM as root-end filling materials in single-rooted teeth in endodontic surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2005 October; 100(4): p. 495-500.
38. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Duggan DJ, et al. Periapical Microsurgery: An In Vivo Evaluation of Endodontic Root-End Filling Materials. *Journal of Endodontics*. 2009; 35(3): p. 357-362.
39. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2004 October; 37(10): p. 699-704.
40. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Materials*. 2005 August; 21(8): p. 731-738.
41. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of Heavy Metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. *Journal of Endodontics*. 2010 July; 36(7): p. 1210-1215.
42. Li J, Liu Y, Hermansson L, Soremark R. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro. *Clinical Materials*. 1993; 12(4): p. 197-201.
43. Dion I, Bordenave L, Lefebvre F, Bareille R, Baquey C, Monties JR, et al. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1994 January; 5(1): p. 18-24.
44. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate Induce Similar Cellular Responses in a Fibroblast Cell Line. *Journal of Endodontics*. 2014; 40(3): p. 406-411.

45. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontics*. 2011; 37(5): p. 673-677.
46. Zhejun W. Bioceramic materials in endodontics. *Endodontic topics*. 2015 May 27; 32(1): p. 3-30.