Revista ADM

ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Evaluación de la citotoxicidad de Biodentine, IRM y MTA en cultivos de fibroblastos del ligamento periodontal humano.

Evaluation of the cytotoxicity of Biodentine, IRM and MTA in cultures of human periodontal ligament fibroblasts.

Román Damián-Morales,* Luis Fernando Jacinto-Alemán, Javier Portilla-Robertson,*** Blanca Itzel Mendoza-Espinosa,** Carlos Tinajero-Morales+**

RESUMEN

Introducción: Los materiales para la obturación retrógrada son diversos. Actualmente, IRM y MTA son las alternativas clínicas más utilizadas, no obstante, es relativamente reciente la introducción de materiales a base de silicatos tricálcicos tal como Biodentine. **Objetivo**: Determinar la citotoxicidad de fibroblastos del ligamento periodontal humano expuestos a medios de cultivo condicionados con Biodentine, IRM y MTA. **Material y métodos:** 1×10^3 fibroblastos del ligamento periodontal humano fueron expuestos a medios DMEM/F12 condicionados con MTA, IRM y Biodentine en tres protocolos diferentes. Se realizó un ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular a las cero, 24, 48, 72 horas, siete y 14 días. Se realizó una prueba ANOVA ($p < 0.05$). **Resultados:** En los tres protocolos con los diferentes medios de cultivo condicionados, la viabilidad de las células fue predominantemente proliferativa; sin embargo, las células expuestas a Biodentine mostraron una tendencia mayor que la MTA o la IRM. **Conclusión:** Las células expuestas a la Biodentine mostraron un comportamiento proliferativo a los 14 días de análisis. Se debe realizar más investigación a nivel *in vivo* y clínico para obtener más información sobre la conducta de estos materiales empleados para la obturación retrógrada.

Palabras clave: Cementos apicales, obturación retrógrada, citotoxicidad.

ABSTRACT

Introduction: *The materials for retrograde filling are diverse. Currently, IRM and MTA are the most commonly used clinical alternatives, however, the introduction of materials based on tricalcium silicates such as Biodentine is relatively recent.* ***Objective:*** *To determine the cytotoxicity of human periodontal ligament fibroblasts exposed to culture media conditioned with Biodentine, IRM and MTA.* ***Material and methods:*** *1×10^3 fibroblasts of the human periodontal ligament were exposed to DMEM/F12 media conditioned with MTA, IRM and Biodentine in 3 different protocols. An MTT assay was performed to determine cell viability at 0, 24, 48, 72 hours, seven and 14 days. An ANOVA test was performed ($p < 0.05$).* ***Results:*** *In the three protocols with the different conditioned culture media, the viability of the cells was predominantly proliferative, however, the cells exposed to Biodentine showed a higher tendency than the MTA or the IRM.* ***Conclusion:*** *The cells exposed to the Biodentine showed a proliferative behavior at 14 days of analysis. More research should be done at in vivo and clinical level to obtain more information about the behavior of these materials used for retrograde filling.*

Keywords: *Apical fillings, retrograde obturation, cytotoxicity.*

INTRODUCCIÓN

El tratamiento quirúrgico en endodoncia representa aproximadamente el 3-10% de la práctica típica. La cirugía perirradicular se realiza generalmente por presencia de patología perirradicular persistente o cuando el tratamiento ortógrado del conducto radicular ha fracasado.[1] La cirugía periapical puede considerarse una extensión del tratamiento no quirúrgico ya que los objetivos de ambos

*** Egresado de la Especialidad de Endodoncia, División de Estudios de Postgrado e Investigación, Facultad de Odontología.**
**** Profesor de la Facultad de Odontología.**
***** Profesor y Coordinador del Departamento de Patología y Medicina Oral, División de Estudios de Postgrado e Investigación, Facultad de Odontología.**
+ Coordinador de la Especialidad de Endodoncia, División de Estudios de Postgrado e Investigación, Facultad de Odontología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Recibido: 15 Enero 2019. Aceptado para publicación: 28 Marzo 2019.

www.medigraphic.org.mx

tratamientos son los mismos: la prevención o eliminación de la periodontitis apical. Después de la preparación apical, se utiliza un material de obturación vía apical para sellar la cavidad. La prevención de la microfiltración, biocompatibilidad y estabilidad de dicho material en los tejidos apicales es muy importante. Una buena calidad en el llenado apical es esencial para el éxito de la cirugía endodóntica.[2]

Se han utilizado muchos materiales para el relleno en la obturación retrógrada, tales como: amalgama, gutapercha, cemento a base de óxido de zinc-eugenol, ionómero de vidrio, oro, cavit, resina compuesta, cemento biocerámico y MTA *(mineral trioxide aggregate)*. Desafortunadamente, el material de relleno retrógrado ideal aún no se ha encontrado.[3] Un material en la obturación retrógrada ideal debe cumplir los siguientes requisitos: biocompatibilidad con tejidos periapicales, alta capacidad de sellado, capacidad deseable para la regeneración tisular periapical, inhibición efectiva de microorganismos patógenos, radiopacidad suficiente para distinguir el material del tejido circundante y excelentes propiedades de trabajo y manejo.

La MTA se introdujo como un material de relleno retrógrado en endodoncia, es el material reconocido como el estándar de oro para una gran variedad de situaciones clínicas y es quizás el más cercano al material ideal.[4] El IRM *(intermediate restorative material)* es un material basado en el óxido de zinc-eugenol, que se introdujo en la cirugía periapical en busca de materiales alternativos que mejorasen el sellado apical y con menos citotoxicidad en comparación con la amalgama dental.[5] Biodentine es el material más reciente introducido en la gama de productos utilizados en los procedimientos de endodoncia. Este material tiene excelentes propiedades mecánicas, fácil manejo y alta biocompatibilidad en comparación con MTA.[6]

Se han aplicado numerosos estudios para evaluar la biocompatibilidad de tales cementos. Los principales métodos son las pruebas de citotoxicidad en células o cultivos de tejidos, la implantación en el tejido conjuntivo subcutáneo o el hueso en animales experimentales.[2] El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad celular de los fibroblastos del ligamento periodontal humanos expuestos a MTA, IRM y Biodentine.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cementos endodónticos

Se evaluaron tres tipos de cemento que se utilizan como material de relleno para obturación quirúrgica vía apical (MTA, Angelus blanco MTA/Angelus, Londrina-PR-Brasil; IRM/LD Caulk Division, Dentsply International, Milford, De; y Biodentine/Septodont, Saint-Maur-desFosses, Francia).

Obtención de medio acondicionado

La obtención de medios DMEM/F12 condicionados se llevó a cabo en un entorno aséptico dentro de una campana de flujo laminar (Edge Gard, Baker, Sanford, ME), de acuerdo con la norma ISO 10993-5: 2009 especificaciones.[7] El cemento se mezcló siguiendo las instrucciones del fabricante, colocando aproximadamente 1 mm de espesor en el fondo de cada pocillo de una placa de 24 pocillos, se colocó 1 mL de DMEM/F12-10% FBS con penicilina y estreptomicina. Se prepararon dos protocolos para la obtención de medio condicionado; protocolo 1: consistió en preparación del cemento, colocación del medio de cultivo y recuperación inmediata; protocolo 2: correspondió a la preparación del cemento, colocación del medio de cultivo en incubación a 37 ºC con 5% de CO_2 y recuperación del medio 24 horas después. El grupo control consistió en medio de cultivo no condicionado. Todos los medios de cultivo condicionados recuperados se mantuvieron a 4 ºC hasta su uso.

Análisis de viabilidad celular

Las células utilizadas para esta prueba fueron fibroblastos del ligamento periodontal humano (provistas por el Prof. Marco Álvarez Pérez), que se cultivaron a una densidad de 1×10^3. Se realizó el ensayo de MTT (metiltiazoltetrazolium) siguiendo las instrucciones del fabricante (Vibrant, Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA) para medir viabilidad a cero, 24, 48, 72 horas, siete y 14 días de exposición al medio condicionado de cada protocolo, en los cultivos prolongados se realizó cambio de medio cada tercer día. Brevemente, se agregaron 10 µL de la solución de MTT, posteriormente se incubó a 37 ºC durante cuatro horas, la reacción se interrumpió agregando 50 µL de DMSO, para incubar nuevamente durante 10 minutos a 37 ºC. Se realizó la lectura de la absorbancia a 545 nm con el lector de placas (ChroMate Awareness Technology Inc., Palm City, FL). Cada ensayo se realizó por triplicado.

www.medigraphic.org.mx

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA con Tukey *post hoc* para determinar la diferencia entre comparaciones múltiples. También empleamos una prueba de medidas repetidas para determinar las diferencias de las medidas temporales, en ambos ensayos se consideró una $p < 0.05$ como significativa (IBM, SPSS, versión 22, IBM SPSS, IL, EUA).

RESULTADOS

Al comparar los tres cementos y el grupo control en ambos protocolos, observamos diferencias significativas en la viabilidad de células expuesta al medio de cultivo condicionado por Biodentine contra el grupo control, IRM y MTA, en ambos protocolos presentando una $p < 0.001$. En el análisis de medidas repetidas, en el grupo control se observó tendencia proliferativa, con cambios significativos al comparar la medida inicial y de 24 horas contra la de siete días ($p = 0.035$ y 0.010, respectivamente). En el protocolo 1, las células expuestas al medio condicionado por IRM mostraron aumento de la viabilidad en relación al tiempo, no obstante, no se observó ningún cambio estadísticamente significativo. En las células expuestas a MTA se observó un aumento significativo en la viabilidad a los siete días comparado contra 24 horas ($p = 0.006$). Las células expuestas a medio condicionado en Biodentine presentaron cambios significativos comparando 24, 48 y 72 horas contra 14 días ($p = 0.022$, 0.030, 0.016, respectivamente) *(Cuadro 1)*. En el protocolo 2 IRM conservó su tendencia en viabilidad sin cambios significativos, mientras que en las células expuestas a MTA observamos un cambio significativo a los siete días comparado contra 48 horas ($p = 0.022$). En las células expuestas a Biodentine se observaron cambios significativos a las 24 y 48 horas comparado a los 14 días ($p = 0.020$, 0.001, respectivamente) *(Figura 1)*.

DISCUSIÓN

El objetivo de la cirugía periapical es eliminar las causas de la enfermedad y proporcionar un entorno favorable para la curación. Se han fabricado nuevos materiales para el

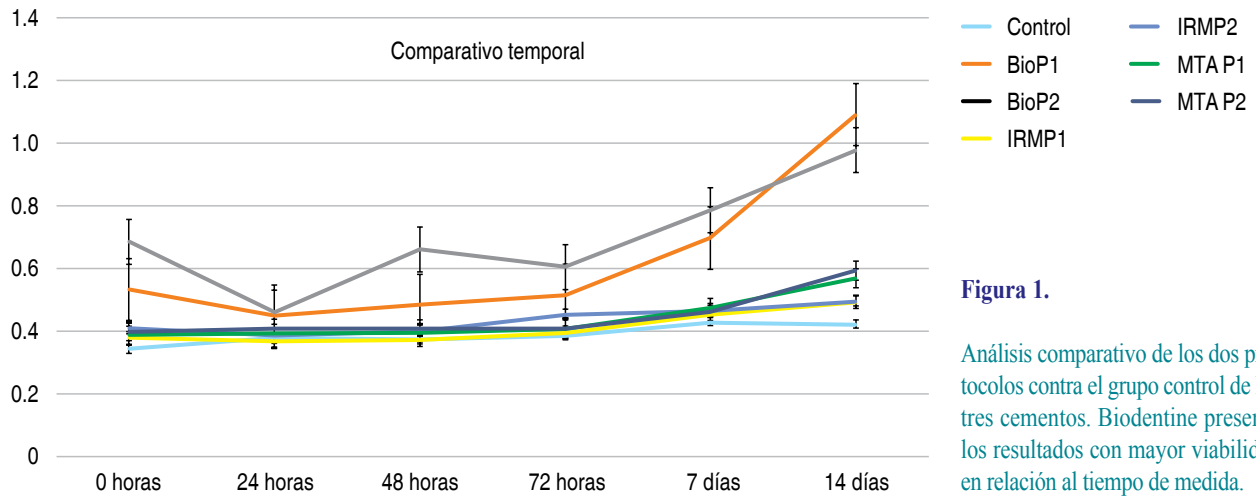

Figura 1.

Análisis comparativo de los dos protocolos contra el grupo control de los tres cementos. Biodentine presentó los resultados con mayor viabilidad en relación al tiempo de medida.

Cuadro I. Análisis de medidas repetidas.

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	7 días	14 días
Control	0.341	0.378	0.373	0.386	0.430	0.422
BioP1	0.532	0.447	0.482	0.514	0.697	1.091*
BioP2	0.684	0.458	0.660	0.604	0.786	0.977*
IRMP1	0.377	0.366	0.372	0.394	0.454	0.492
IRMP2	0.409	0.387	0.402	0.452	0.464	0.497
MTA P1	0.386	0.391	0.394	0.407	0.475*	0.569
MTA P2	0.399	0.406	0.404	0.410	0.458*	0.593

*Resultado significativo con $p < 0.05$.

sellado retroactivo; sin embargo, la característica deseable más importante de éstos es su biocompatibilidad.[8,9] En nuestro ensayo, siguiendo el estándar internacional de las especificaciones ISO 10993-5: 2009, las células del ligamento periodontal se expusieron a tres tipos diferentes de cemento empleado para la obturación retrograda (MTA, IRM y Biodentine) y se midió la viabilidad celular. Esta estrategia había sido utilizada anteriormente como una forma de emular y observar la respuesta celular a la exposición periapical del cemento.[10-13]

En los tres ensayos, las células expuestas a IRM mostraron una viabilidad heterogénea con una tendencia a la proliferación, sin embargo, cuando se compara con otros tipos de cemento, se muestra que es más citotóxica. Este comportamiento para IRM se había informado anteriormente.[13,14] Este efecto citotóxico podría deberse al eugenol, que representa una proporción importante de la composición líquida de IRM. Maher et al. sugirió que el eugenol podría causar un proceso de curación más lento;[15] sin embargo; en los estudios clínicos entre MTA e IRM como materiales de retro-relleno, no hubo diferencia estadística en la curación, lo que sugiere que ambos materiales son una buena opción.[5,16,17]

El grupo de células expuestas a MTA mostraron una tendencia a la proliferación celular, analizando las medidas repetidas observamos un aumento significativo a los siete días. Camilleri et al. consideraron que el óxido de bismuto podría ser el compuesto relacionado con la proliferación celular a corto plazo y no sólo un material radiopaco.[18-20] Aunque este cemento es considerado, como el estándar de oro en la obturación retrograda, se necesita más investigación, principalmente teniendo en cuenta que están surgiendo nuevos materiales, tales como el Biodentine.

Biodentine está compuesto de sílice tricálcico, carbonato de calcio, dióxido de circonio, entre otros, su pH es alcalino de 11.7-12.3.[21] Laurent et al.[22] reportaron que su contacto directo con el tejido pulpar induce el desarrollo de dentina reparadora manteniendo la vitalidad de la pulpa. En nuestro ensayo, al compararlo contra el grupo control, IRM y MTA, observamos que estas células reportaban niveles de viabilidad superiores en ambos protocolos. En su análisis de medidas repetidas fue a los 14 días donde se encontraron cambios significativos para ambos protocolos, aunque observando la tendencia temporal a las 24 horas de exposición observamos en las células una disminución de la viabilidad, la cual se recuperaba transitoriamente. Un comportamiento similar fue reportado por Li J. et al.,[23] cuando los fibroblastos expuestos al óxido de circonio redujeron su número exclusivamente después de un día de exposición, considerando que la recuperación posterior se debe a la eliminación o degradación de este compuesto.

CONCLUSIONES

En relación a los resultados obtenidos, encontramos que Biodentine es el cemento con los mejores resultados en la viabilidad celular, en comparación con MTA e IRM. Con este ensayo, no sólo se determina la importancia de cada tipo de material, sino también el tiempo de establecimiento con respecto a la viabilidad celular; sin embargo, pruebas comparativas en modelos *in vivo* o clínicos son necesarias para determinar el material óptimo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nash KD, Brown LJ, Hicks ML. Private practicing endodontists: production of endodontic services and implications for workforce policy. J Endod. 2002; 28 (10): 699-705.
2. Cohen S, Burns RC. Vías de la pulpa. 10a ed. Spain: Elsevier, 2011.
3. Priyanka SR. A literature review of root-end filling materials. IOSR JDMS. 2013; 9 (4) 20-25.
4. Baek SH, Lee WC, Setzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate. J Endod. 2010; 36 (8): 1323-1325.
5. 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. 2003. Int Endod J. 2009; 42 (5): 414-420.
6. Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. Endodontic Topics. 2015; 32: 3-30.
7. ISO. Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. 10993-5, 2009.
8. Chong BS, Ford TR. Root-end filling materials rationale and tissue response. Endodontic Topics. 2005; 11: 114-130.
9. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling materials. Oral Surg, Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999; 87: 398-404.
10. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. J Endod. 2011; 37 (6): 793-798.
11. Damas BA, Wheater MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. J Endod. 2011; 37 (3): 372-375.
12. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. *In vitro* cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. J Endod. 2013; 39 (4): 478-483.
13. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. J Endod. 2000; 26 (5): 288-291.
14. 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. Int Endod J. 2005; 38: 203-210.
15. 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. 1992; 73: 738-745.

www.medigraphic.org.mx

16. Lindeboom JA, Frenken JW, Kroon FH, 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 100 (4): 495-500.
17. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Duggan DJ, Teixeira FB. Periapical microsurgery: an *in vivo* evaluation of endodontic root-end filling materials. J Endod. 2009; 35 (3): 357-362
18. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2004; 37: 699-704.
19. Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot TA and two Portland cements. Dent Mater. 2005; 21 (8): 731-738.
20. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod. 2010; 36: 1210-1215.
21. 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. Int Endod J. 2013, 46: 632-641.
22. 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. Dent Mater. 2008; 24 (11): 1486-1494.
23. Li J, Liu Y, Hermansson L, Söremark R. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts *in vitro*. Clin Mater. 1993; 12 (4): 197-201.

Correspondencia:

Carlos Tinajero-Morales
Departamento de Endodoncia, División de Estudios de Postgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.
Av. Universidad Núm. 3000,
Ciudad de México, México.
Tel: (52) 5521066349
E-mail: ctmasterendo@hotmail.com

www.medigraphic.org.mx