

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EFFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y
ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y
CEMENTOBLASTOS HUMANOS

Por

JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Octubre, 2021

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

**EFFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y
ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y
CEMENTOBLASTOS HUMANOS**

JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

**EFFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y
ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y
CEMENTOBLASTOS HUMANOS**

TESISTA

JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO

Comité de Tesis

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO

CODIRECTOR DE TESIS

DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO

ASESOR METODOLÓGICO

DR. RENE HERNÁNDEZ DELGADILLO

ASESOR METODOLÓGICO

DRA. IDALIA RODRÍGUEZ DELGADO

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, Coordinador del Posgrado de Endodoncia y director de mi tesis. Le agradezco por darme la oportunidad ingresar al posgrado y brindarme los conocimientos y herramientas necesarias para mi formación en endodoncia.

Quiero agradecer también al Dr. Claudio Cabral Romero, jefe del laboratorio de Biología Molecular y codirector de mi tesis por sus valiosas sugerencias e interés en la realización del presente trabajo, así como también permitirme el uso de su laboratorio. También le agradezco la motivación para prepararme y presentar exposición en un foro de investigación nacional.

Al Dr. Rene Hernández Delgadillo le agradezco por su tiempo y dedicación para explicarme las metodologías de mi tesis las veces que fueran necesarias, siempre con amabilidad y paciencia.

Agradezco a mis docentes del Posgrado de Endodoncia, los cuales guiaron mi camino durante estos 2 años, siempre conté con sus consejos y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de investigación y de mis estudios.

A mi familia, que siempre estuvieron en todo momento brindando su apoyo y buenos deseos, gracias a ustedes estoy logrando esto.

A mi novio, Alejandro Torres, que compartimos grandes momentos durante el posgrado y fuiste testigo de la realización de este trabajo. Te agradezco tus palabras de aliento y el siempre estar dispuesto a ayudarme, muchas gracias.

Finalmente, a mi Facultad de Odontología UANL, te agradezco por ser mi hogar todos estos años, por permitirme crecer tanto como persona como profesionalmente.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
NOMENCLATURA	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL	16
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	16
4. ANTECEDENTES	17
4.1 MATERIALES DENTALES	17
4.2 BIOCOMPATIBILIDAD Y TOXICIDAD EN ODONTOLOGÍA	17
4.2.1 CITOTOXICIDAD	19
4.2.2 MÉTODOS PARA ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO	20
4.2.2.1 MTT	20
4.2.2.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	21
4.2.2.3 ENSAYO COMETA	21
4.3 BIOCERÁMICOS	22
4.3.1 CEMENTOS BIOCERÁMICOS	22
4.3.2 CEMENTOS REPARADORES	24
4.3.2.1 CLASIFICACIÓN DE BIOCERAMICOS	24
4.3.2.2 INDICACIONES PARA LA UTILIZACIÓN DE CEMENTOS REPARADORES	26
4.3.3 MTA	27
4.3.4 NEOMTA	29
4.3.5 BIODENTINE	30
4.3.6 ENDOSEQUENCE RRM	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 CULTIVO CELULAR	34
5.2 PREPARACIÓN DE LOS CEMENTOS	34
5.3 OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS	35

5.4 EFECTO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y CEMENTOBLASTOS HUMANOS POR ENSAYO DEL MTT	36
5.5 VISUALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS POST EXPOSICIÓN A CEMENTOS CON MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	36
5.6 VISUALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS POST EXPOSICIÓN A CEMENTOS CON MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	36
5.7 GENOTOXICIDAD POR ENSAYO COMETA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	37
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
6. RESULTADOS	39
6.1 EFECTO DEL BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS POR ENSAYO DEL MTT	39
6.1.1 EFECTO DEL BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS POR ENSAYO DEL MTT	39
6.1.2 EFECTO DEL BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA SOBRE CEMENTOBLASTOS HUMANOS POR ENSAYO DEL MTT	40
6.2 ENSAYO LIVE/DEAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE LOS CEMENTOS BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA.	41
6.2.1 ENSAYO LIVE/DEAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.	41
6.2.2 ENSAYO LIVE/DEAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SOBRE CEMENTOBLASTOS HUMANOS.	43
6.3 ENSAYO CALCEÍNA M POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE LOS CEMENTOS BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA.	45
6.3.1 ENSAYO CALCEÍNA M POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS DE LOS CEMENTOS BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA.	45
6.3.2 ENSAYO CALCEÍNA M POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SOBRE CEMENTOBLASTOS HUMANOS DE LOS CEMENTOS BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA.	46
6.4 GENOTOXICIDAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MEDIANTE ENSAYO COMETA DE LOS CEMENTOS BIODENTINE, ENDOSEQUENCE RRM Y NEOMTA.	47
6.4.1 GENOTOXICIDAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MEDIANTE ENSAYO COMETA SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.	47
6.4.2 GENOTOXICIDAD POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MEDIANTE ENSAYO COMETA SOBRE CEMENTOBLASTOS HUMANOS.	48
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
9. LITERATURA CITADA	53
10. RESUMEN BIOGRÁFICO	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Criterios establecidos por el Comité de Nomenclatura de la muerte celular para identificar una célula muerta y diferenciarla de una moribunda. de los individuos del tratamiento.....	18
II. Características de los cementos biocerámicos bifásicos.....	24
III. Características de los cementos biocerámicos premezclados.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Características de los materiales bioactivos.....	23
2. Línea del tiempo del MTA.....	28
3. Presentación comercial de Biodentine.....	29
4. Presentación comercial de Endosequence RRM.....	31
5. Resumen gráfico de metodologías.....	33
6. Porcentaje de Viabilidad Celular de fibroblastos después de la exposición de 24 horas de los medios condicionados con cementos reparadores.....	38
7. Porcentaje de Viabilidad Celular de cementoblastos después de la exposición de 24 horas de los medios condicionados con cementos reparadores.....	39
8. Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos a 24h de exposición a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16.	41
9. Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre cementoblastos humanos a 24h de exposición a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16.....	43
10. Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA	44
11. Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre cementoblastos humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA.....	45
12. Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos gingivales humanos.....	46
13. Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos cementoblastos humano.....	47

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
μl	microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ca ²⁺	Calcio
Ca (OH) 2	Hidróxido de calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EthD-1	homodímero 1 de etidio
HGFs	Fibroblastos gingivales humanos
MEM	Medio esencial mínimo
MTA	Mineral trióxido agregado
MTT	4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
Min	minutos
mL	mililitros
nm	nanómetros
pH	potencial de hidrógeno
RRM	Root Repair Material

TESISTA: JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO
DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
CODIRECTOR DE TESIS: DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EFFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y CEMENTOBLASTOS HUMANOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La citotoxicidad de un material de reparación que está en comunicación con la región perirradicular puede comprometer la viabilidad de las células, causando muerte celular. Actualmente se cuentan con diversos materiales reparadores hidráulicos de silicato que destacan por presentar características biocompatibles, sin embargo, a la actualidad no existe suficiente evidencia sobre el efecto tóxico que puede tener en diferentes componentes celulares. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto citotóxico de los cementos reparadores Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos in vitro. **METODOLOGÍA:** Se realizó un cultivo celular de fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos, fueron expuestos a medios condicionados a varias concentraciones de cementos reparadores (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) para evaluar el efecto citotóxico mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, microscopía de fluorescencia mediante ensayo Live/Dead y Genotoxicidad mediante Ensayo Cometa. **RESULTADOS:** Después de 24h de exposición, en el ensayo MTT, los resultados para Biodentine fueron 47.34% para fibroblastos y 50.02% para cementoblastos. Endosequence RRM 92.25% y 91.9%, NeoMTA 75.05%. Los resultados se confirmaron con imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia Live/Dead, Calceína M y ensayo cometa. **CONCLUSIONES** Biodentine resultó ser el más citotóxico en la investigación. Endosequence RRM resultó ser el menos citotóxico. Los ensayos de live/dead, Calceína M y genotoxicidad nos ayudaron a confirmar los resultados cuantitativos del Ensayo MTT. El mecanismo por el cual Biodentine y NeoMTA son citotóxicos es por el daño a la membrana celular. Endosequence RRM puede aplicarse al entorno clínico de manera más segura y predecible en comparación con Biodentine y NeoMTA

TESISTA: JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO
DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
CODIRECTOR DE TESIS: DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

IN VITRO CYTOTOXIC EFFECT OF BIODENTINE, NEOMTA AND ENDOSEQUENCE BC RRM ON GINGIVAL FIBROBLASTS AND HUMAN CEMENTOBLASTS

ABSTRACT

INTRODUCTION: The cytotoxicity of a repair material that is in communication with the periradicular region can compromise the viability of the cells, causing cell death. Currently there are various hydraulic silicate repair materials that stand out for presenting biocompatible characteristics, however, at present there is not enough evidence about the toxic effect that it can have on different cellular components. **OBJECTIVE:** To evaluate the cytotoxic effect of Biodentine, Ecandoquence RRM and NeoMTA repair cements on human gingival fibroblasts and cementoblasts in vitro. **METHODOLOGY:** A cell culture of human gingival fibroblasts and cementoblasts was carried out, they were exposed to media conditioned to various concentrations of repair cements (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) to evaluate the cytotoxic effect by means of the test of MTT cell viability, fluorescence microscopy by Live / Dead assay and Genotoxicity by Comet Assay. **RESULTS:** After 24h of exposure, in the MTT test, the results for Biodentine were 47.34% for fibroblasts and 50.02% for cementoblasts. Endoquence RRM 92.25% and 91.9%, NeoMTA 75.05%. Results were confirmed with images obtained with Live / Dead fluorescence microscopy, Calcein M and comet assay. **CONCLUSIONS:** Biodentine turned out to be the most cytotoxic in the investigation. Endoquence RRM was found to be the least cytotoxic. Live / dead, Calcein M, and genotoxicity assays helped us to confirm the quantitative results of the MTT Assay. The mechanism by which Biodentine and NeoMTA are cytotoxic is by damage to the cell membrane. Endosquence RRM can be applied to the clinical setting in a safer and more predictable way compared to Biodentine and NeoMTA

1.- INTRODUCCIÓN

En el área de la endodoncia, los materiales que son empleados para la reparación radicular deben poseer una baja citotoxicidad con los tejidos perirradiculares con los que estará en contacto, para así promover la proliferación celular y cicatrización adecuadas. Uno de los cementos reparadores más utilizados es el Biodentine y recientemente se han agregado otros hidráulicos de silicato como Endosequence y NeoMTA.

La obturación completa del sistema de conductos radiculares después de la preparación quimomecánica es fundamental para el éxito del tratamiento endodóntico, así como para el sellado del ápice de la raíz, ya que muchos materiales exhiben un contacto limitado con tejidos vitales en la región apical. La citotoxicidad de un material de obturación radicular, cuando se utiliza en recubrimiento pulpar, reparación de perforaciones o como obturación retrógrada, puede influir en la viabilidad de las células perirradiculares y causar la muerte celular por apoptosis o necrosis. Se han desarrollado nuevos selladores endodónticos basados en silicato de calcio en base a sus excelentes propiedades biológicas y potencial bioactivo.

Los biocerámicos se introdujeron por primera vez como un material de obturación retrógrada en la década de 1990, más tarde como sellador, material reparador y en revestimientos de conos de gutapercha. En general, estos materiales son biocompatibles, no tóxicos, no se encogen y son químicamente estables dentro del entorno biológico. Además, muestran buenas propiedades físico-químicas y biológicas.

Biodentine es un cemento bioactivo a base de silicato de calcio bioactivo como un "sustituto de la dentina". Este material biológicamente activo ayuda a su penetración a través de los túbulos dentinarios abiertos para cristalizar el enclavamiento con la dentina y proporcionar propiedades mecánicas. Biodentine ha sido formulado utilizando tecnología de cemento basada en MTA y, por lo tanto; afirma mejoras de algunas de las propiedades, como las cualidades físicas y el manejo, incluida su otra amplia gama de

aplicaciones, como la reparación endodóntica y el recubrimiento pulpar en odontología restauradora.

EndoSequence RRM es un material que se comercializa como un material de reparación de raíz que puede usarse para reparación de perforación, reparación de reabsorción, procedimientos de cierre del ápice, recubrimiento pulpar y obturación retrógrada durante los procedimientos quirúrgicos. Está disponible en consistencia de pasta o masilla, y el fabricante afirma que tiene potencial osteogénico.

Recientemente, se han introducido nuevos materiales, entre ellos, NeoMTA, un silicato hidráulico tricálcico a base de óxido de tantalio como agente radiopacificante en lugar de óxido de bismuto, por lo tanto, evita la decoloración y puede mejorar el potencial de mineralización al inducir la diferenciación en células secretoras de minerales.

Es importante estudiar la citotoxicidad de los materiales dentales que se emplean en el tratamiento odontológico. La obturación adecuada en el tratamiento endodóntico es fundamental para el éxito a largo plazo del procedimiento. En base a lo mencionado anteriormente se propone en este estudio evaluar la citotoxicidad de tres cementos reparadores Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA.

¿Tendrán Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA efecto citotóxico sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos?

No existe en la literatura una investigación completa sobre la citotoxicidad de estos diferentes cementos reparadores sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos con el uso de diferentes metodologías.

El objetivo de este trabajo tiene como propósito evaluar la citotoxicidad del cemento reparador biocerámico Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos in vitro mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, microscopía de fluorescencia mediante ensayo Live/Dead, Ensayo Calceína AM y Genotoxicidad mediante Ensayo Cometa.

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio se encontró que el cemento Biodentine sorpresivamente resultó ser el más citotóxico. En cambio, el cemento Endosequence RRM resultó ser el menos citotóxico. Los ensayos de live/dead, Calceína M y genotoxicidad nos ayudaron a confirmar los resultados cuantitativos del Ensayo de viabilidad celular MTT. Basado en los resultados obtenidos de esta investigación Endosequence RRM pueden aplicarse al entorno clínico de manera más segura y predecible en comparación con Biodentine y NeomTA

2.- HIPÓTESIS

El Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA tendrán nula citotoxicidad in vitro sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico in vitro del Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto citotóxico de Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos mediante el ensayo de viabilidad celular MTT.
- Analizar la viabilidad y morfología celular de los fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos post-exposición a Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA por medio del Ensayo Live/dead y microscopía de fluorescencia.
- Evaluar la permeabilidad de membrana mediante el ensayo de Calceína M y microscopía de fluorescencia
- Evaluar la genotoxicidad del Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA mediante el Ensayo Cometa y microscopía de fluorescencia.

4. ANTECEDENTES

4.1 Materiales dentales

En odontología se utiliza una amplia gama de materiales, incluidos materiales de obturación, materiales de restauración, medicamentos intraconducto, materiales protésicos, diferentes tipos de implantes, revestimientos e irrigantes.. El uso clínico satisfactorio de los materiales dentales se basa en sus propiedades fisicoquímicas, así como en su fiabilidad biológica y toxicológica (Shahi et al., 2019).

La colocación de estos materiales en la cavidad bucal durante un período prolongado puede producir reacciones no deseadas. La biocompatibilidad de un biomaterial utilizado para el reemplazo o empaste de tejido biológico, como los dientes, siempre han tenido una gran preocupación dentro de las disciplinas de atención de la salud de los pacientes (Shahi et al., 2019). En las últimas décadas, ha habido un aumento en la demanda de evaluación y control de la seguridad de los materiales dentales utilizados a diario en odontología. Se espera que los materiales dentales no causen daño o lesiones a las estructuras circundantes en la cavidad bucal (Mallineni et al., 2013).

4.2 Biocompatibilidad y toxicidad en odontología

Biocompatibilidad se define como la capacidad de existir en armonía con el ambiente biológico circundante (Academy of Prosthodontics, 2005). En otra definición se describe como la habilidad de un material o sustancia de actuar teniendo respuesta apropiada del huésped al aplicarse como era destinado (Peter et al., 2013).

En general, se calcula basándose en la citotoxicidad localizada, la respuesta sistémica, la alergenicidad y la carcinogenicidad (Anusavice et al., 1996) y debe cumplir con los siguientes criterios: no ser dañino para la pulpa y los tejidos blandos, no contener sustancias tóxicas que se puedan difundir, liberar y absorber en el sistema circulatorio para causar respuesta tóxica sistémica, debe estar libre de agentes sensibilizantes que puedan llegar a causar respuestas alérgicas y no tener potencial carcinogénico.

Biomaterial se define como cualquier sustancia que se pueda usar por cualquier período de tiempo como parte de un sistema que trate, aumente o reemplace algún órgano, tejido o función del cuerpo (Academy of Prosthodontics, 2005).

Los materiales utilizados en endodoncia deben ser preferiblemente biocompatibles. Esto es particularmente deseable cuando se colocan en contacto directo con el tejido vivo, como el recubrimiento de la pulpa, la reparación de perforaciones o cuando se usa como obturación retrógrada.

Se ha presentado en la literatura una gran cantidad de casos relacionados con reacciones tisulares orales a biomateriales usados durante los procedimientos restauradores, sugiriéndose que algunos metales como el níquel o el cobre liberados de ciertas aleaciones podrían ser tóxicos debido a reacciones tisulares expresadas como inflamación gingival (Taylor et al., 1991).

Para evaluar la biocompatibilidad de cualquier material de uso odontológico se utilizan pruebas que tienen como propósito eliminar cualquier producto o componente potencial de una sustancia que pueda causar lesión o daño a los tejidos orales o maxilofaciales (Anusavice et al., 1996).

Estas pruebas dividen los materiales en tres grupos:

-Grupo I o de pruebas primarias: Consisten en evaluaciones de citotoxicidad y genotoxicidad, en las que los materiales se ponen en contacto con cultivos celulares para determinar el efecto en la viabilidad celular e en el material genético.

-Grupo II o de pruebas secundarias: Evalúan la toxicidad sistémica, la dosis letal 50, el grado de irritación y sensibilización que incluyen las pruebas de inhalación y de implantación.

-Grupo III o pruebas de uso preclínico: se hacen para medir el efecto de los materiales que estarán en contacto con dentina y pulpa.

Los efectos adversos que pueden llegar a causar cualquier material sobre los tejidos incluyen citotoxicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad, biodegradación, liberación de componentes, exposición y toxicidad, alergia e hipersensibilidad y alergia por contacto:

La citotoxicidad es un mecanismo de toxicidad mediado inmunológicamente que produce muerte celular local ya sea por apoptosis o necrosis (Restrepo et al., 2010).

4.2.1 Citotoxicidad

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, determina la cantidad de células que están vivas o muertas basándose en la muestra total de células, mientras que la proliferación celular es un indicador vital para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes, proteínas y vías implicadas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos (Thermo Fisher Scientific, 2017). La muerte celular, puede ser definida como la degeneración permanente de las funciones celulares vitales. El Comité de Nomenclatura de la muerte celular (NCCD) (Galluzzi et al., 2012) propuso tres criterios para identificar a las células muertas, y cuatro procesos celulares que son considerados puntos no reversibles de una célula moribunda.

Criterios morfológicos y moleculares para identificar a una célula muerta	La pérdida de la integridad de la membrana plasmática, llevando a la destrucción de la identidad celular
	La fragmentación de la célula (incluido su núcleo)
	La fagocitosis de la célula, por células dotadas con actividad fagocítica
«Puntos de no regreso» que identifican a una célula moribunda	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial
	Permeabilización de la membrana mitocondrial
	Exposición extracelular de fosfatidilserina

Tabla 1 Criterios establecidos por el Comité de Nomenclatura de la muerte celular para identificar una célula muerta y diferenciarla de una moribunda.

La citotoxicidad se define como la capacidad de un material de impactar sobre la viabilidad celular. Por lo tanto, las pruebas de citotoxicidad son pruebas primarias de biocompatibilidad que determinan la lisis de células, la inhibición de crecimiento celular y otros efectos causados por sustancias (Peter et al., 2013). Un material se considera citotóxico si evita la adhesión celular, causa cambios morfológicos dramáticos, afecta negativamente la tasa de replicación o conduce a una reducción en la viabilidad celular (Hovarth et. al 1980).

Los modelos animales se han utilizado con frecuencia para pruebas de citotoxicidad y toxicidad tisular de materiales. Sin embargo, varios métodos in vitro han remplazado los modelos animales (Shen et al., 2015).

La evaluación citotóxica es uno de los estudios *in vitro* utilizados más comúnmente para la determinación de biocompatibilidad de un material. Es un estudio simple, rápido y económico que proporciona valiosa información de los materiales que deben ser descartados o aquellos que deben ser sometidos a más estudio (Osorio et al., 1988). Se han empleado muchos métodos para determinar la citotoxicidad de los materiales dentales, Estos métodos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño o muerte celular (Leonardo et al., 2000).

La citotoxicidad de un material de obturación radicular, cuando se utiliza en la reparación de perforaciones o como obturación retrógrada, puede influir en la viabilidad de las células perirradiculares y causar la muerte celular por apoptosis o necrosis (Gomes et al., 2011). Para promover la curación y la restauración de la función del diente, los materiales dentales deberían estimular la reparación o ser biológicamente neutros (Damas et al., 2011). Por lo tanto, es importante evitar materiales dentales que sean tóxicos para los tejidos pulpar y periapical que puedan comprometer el resultado clínico (Bodrumlu, 2008).

4.2.2 Métodos para el estudio de la actividad citotóxica *in vitro*

Existe una gran variedad de modelos biológicos que sirven para estudiar el efecto citotóxico de un determinado agente. Estos modelos pueden dividirse en dos: *in vivo* e *in vitro*.

Los modelos *in vitro* son más apropiados cuando se quiere evaluar de manera general el efecto de un agente sobre células. Ya que estos modelos nos permiten observar los efectos a nivel celular del agente a evaluar sobre una variedad de cultivos celular (Martínez-Torres et al., 2016)

4.2.2.1 MTT

Fue desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (Mosmann, 1983; Denizot, 1986) y se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán, que es un compuesto de color azul, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método

se utiliza para determinar el efecto citotóxico de un compuesto determinado sobre cultivos de células normales y osteoblastos (Monteiro-Riviere, 2009). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido que resulta en su actividad metabólica (Arencibia, 2003)

Los estudios toman como base la norma ISO 10993 que describe métodos de prueba para evaluar la citotoxicidad in vitro de dispositivos médicos donde se destaca la clasificación de citotoxicidad con base a el porcentaje de viabilidad celular: 100-75%: No citotóxico, 74-50%: Ligeramente citotóxico, 49-25%: Moderadamente citotóxicos, 24-0%: Extremadamente citotóxico (Young, 2005).

4.2.2.2 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta utilizada en muchas áreas de la biología celular. Hay una gran variedad de información que se puede obtener a partir de ensayos utilizando la microscopía de fluorescencia. Casi todos los ensayos que pueden analizarse por citometría de flujo, pueden también observarse en un microscopio de fluorescencia. La diferencia radica en la información obtenida. La citometría de flujo da información cuantitativa de un cierto parámetro a observar, mientras que la microscopía de fluorescencia da sobre todo información cualitativa y permite observar las características morfológicas de las células analizadas (Martinez-Torres et al., 2016)

4.2.2.3 Ensayo cometa

Actualmente, una de las técnicas más utilizadas para evaluar quiebres en el ADN, es la electroforesis en gel de células individuales o Ensayo Cometa, desarrollado en 1978 como una metodología que permita estimar el daño en células individuales (Urrego et al., 2005). En esta técnica las células son embebidas en agarosa y son añadidas en láminas de microscopía para ser sometidas a una electroforesis neutral, tras la lisis en presencia de sales y detergentes. Las células con una elevada frecuencia de rupturas de doble cadena (RDC) mostraron una significativa migración del ADN hacia el ánodo. Ellos observaron que la cantidad de ADN que migraba hacia el ánodo incrementaba en las células irradiadas en una forma dosis dependiente. De esta forma Ostling y Johanson fueron capaces de

cuantificar la relación dosis/respuesta midiéndose la intensidad de la fluorescencia desde la cabeza del cometa hacia varias posiciones de la cola (Singh et al., 1988).

Esta técnica es aplicada para determinar el grado de toxicidad de determinadas sustancias que causan daño al ADN ya que brinda información del mecanismo de daño, para lo cual se utilizan endonucleasas específicas que reconocen varios tipos de bases dañadas.

También puede ser útil para probar si una sustancia tiene un efecto directo en la carcinogénesis por la adición de enzimas capaces de metabolizar el carcinógeno de forma indirecta hacia su forma activa. Por el contrario, el Cometa también puede utilizarse para determinar el carácter protector de una sustancia, por ejemplo, su capacidad antioxidante de reducir el efecto oxidativo generado por sustancia como el peróxido de hidrógeno (Rodríguez et al., 2016).

4.3 Biocerámicos

Los biocerámicos son materiales cerámicos diseñados específicamente para uso médico y dental. Durante las décadas de 1960 y 1970, estos materiales se desarrollaron para su uso en el cuerpo humano, como implantes quirúrgicos, reemplazo de articulaciones, placas óseas, órganos artificiales, cemento óseo, ligamentos y tendones artificiales, prótesis de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, dispositivos de reparación de la piel (tejido artificial), reemplazos cocleares, y lentes de contacto (Ree et al., 2014; Veljović et al., 2012).

4.3.1 Cementos biocerámicos

Los biocerámicos se introdujeron por primera vez como un material de obturación retrógrada en la década de 1990, más tarde como sellador, material reparador y en revestimientos de conos de gutapercha (Haapasalo et al., 2015).

Los diversos cementos biocerámicos son similares en composición (silicatos de calcio, óxido de circonio, óxido de tantalio y fosfato de calcio monobásico), con excelentes propiedades. Además de ser hidrófilos, también son insolubles, radiopacos y libres de aluminio. El tiempo de trabajo es superior a 30 min y el tiempo de mantenimiento es de

aproximadamente 4 h en condiciones normales, dependiendo de la cantidad de humedad disponible (Trope et al., 2015).

Los cementos a base de silicato de calcio o biocerámicos, han recibido mayor atención en la literatura dental, en especial en endodoncia pues muestran propiedades físicas y biológicas favorables para procedimientos clínicos como la preservación de la vitalidad de la pulpa y las técnicas regenerativas, además tienen la capacidad de establecerse en presencia de sangre y otros fluidos biológicos y han demostrado una excelente biocompatibilidad (Parirokh et al., 2010).

Algunas otras propiedades favorables de los biocerámicos en endodoncia son la liberación de Ca^{2+} , pH y radiopacidad (Candeiro et al., 2015). La capacidad de sellado es excelente, ya que promueve un sellado hermético y satisfactorio, así como la capacidad de aumentar la resistencia de los dientes (Antunes et al., 2016).

Estos materiales apoyan la reconstitución de una cubierta similar al cemento sobre las superficies radiculares, tienen baja solubilidad después del fraguado, pueden contribuir a la actividad antibacteriana y tienen la capacidad de inducir la formación de tejido mineralizado (Zhou et al., 2013; Silva et al. 2017). Desde su introducción han demostrado que producen excelentes respuestas biológicas (Eldeniz et al 2016).

Representan un nuevo concepto en la obturación de los conductos radiculares y su interacción con los tejidos periapicales se considera importante (Costa et al 2016).

Sin embargo, existen algunos inconvenientes asociados con el uso de los cementos biocerámicos, que incluyen un tiempo de fraguado prolongado, una manipulación difícil, una resistencia limitada a la irrigación antes del fraguado y la posibilidad de manchar la estructura dental (Wei et al., 2012).

Estos materiales se recomiendan para el recubrimiento pulpar, pulpotomía, reparación de perforaciones y obturación de dientes inmaduros con ápices abiertos, así como para el sellado del conducto radicular de dientes maduros con ápices cerrados (Debelian et al., 2016).

Los biocerámicos tienen distintas propiedades como lo son que sean bioactivos, bioinertes, bioinductores y biodegradables (Wang et al., 2015).

Los materiales bioactivos son los que promueven la regeneración, ayudando a que se lleve a cabo la señalización celular y molecular, incorporando factores de crecimiento, lo cual regula la proliferación, migración, diferenciación, expresión de proteínas y la mineralización (Hench et al., 1998)



Figura 1. Características de los materiales bioactivos

4.3.2 Cementos reparadores

Los cementos reparadores y los selladores presentan diferencias tanto en su composición, como en sus características e indicaciones para su uso en la práctica clínica (Özcan et al., 2012); Los cementos reparadores pueden utilizarse para diferentes situaciones, tales como accidentes operatorios, tratamiento de ápice abierto, terapia pulpar vital, entre otros.

Estos cementos reparadores se unen química y mecánicamente a la dentina y la sellan. Se han introducido pocos materiales que cumplan casi todas las características deseables de un material de reparación perfecto (Alsubait, 2017).

El primer material utilizado para la terapia pulpar vital o tratamiento de ápice abierto fue el hidróxido de calcio. Este polvo posee propiedades importantes como un pH alcalino de 12,4 que le confiere propiedades bactericidas. El hidróxido de calcio, produce una inflamación leve, lo cual provoca una necrosis superficial y la formación del puente dentinario cuando es colocado directamente sobre la pulpa (Yepes et al., 2013).

El agregado de trióxido mineral (MTA) fue el primer material biocerámico de este tipo patentado por Torabinejad en 1995. El MTA presenta propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, lo cual posibilita su uso para realizar recubrimientos pulpares directos o apicoformación. Además, se ha demostrado que estimula la formación de dentina debido a su alcalinidad, biocompatibilidad y propiedades remineralizantes (Llanos, 2019).

En el 2011 se desarrolló el Biodentine, un silicato de calcio que puede ser usado como sustituto de dentina. Debido a sus propiedades mecánicas mejoradas y a su rápido fraguado, en comparación a otros, este silicato puede ser utilizado como un material definitivo de sustitución de dentina tanto coronal como radicular (Llanos, 2019).

4.3.2.1 Clasificación de los Biocerámicos reparadores

De acuerdo a su presentación, los biocerámicos están disponibles en dos fases, que son los que deben de ser mezcladas, ya que su presentación es polvo - líquido o en una fase, que vienen en presentación premezclada, directa para aplicar.

MARCA COMERCIAL	EMPRESA	ADITIVOS	TIEMPO FRAGUADO	TIEMPO TRABAJO	VEHICULO	RADIOPACIFICADOR	TINCION
ProRoot MTA Gris	Dentsply, Tulsa Dental, Johnson, USA	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, tricálcico, aluminato, sulfato de calcio dihidratado o yeso, aluminoferrite de calcio.	5 minutos	4 horas	Agua	Oxido de bismuto	Si
ProRoot MTA Blanco	Dentsply, Tulsa Dental, Johnson, USA	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, tricálcico, aluminato, sulfato de calcio dihidratado o yeso.	5 minutos	4 horas	Agua	Oxido de bismuto	Si
MTA Angelus Gris	Angelus, Londrina PR, Brasil	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, tricálcico, aluminato, óxido de calcio, óxido de aluminio, dióxido de silicio.	10 minutos	80 minutos	Agua	Oxido de bismuto	Si
MTA Angelus Blanco	Angelus, Londrina PR, Brasil	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de bismuto, tricálcico, aluminato, óxido de calcio, óxido de aluminio, dióxido de silicio.	10 minutos	80 minutos	Agua	Oxido de bismuto	Si
MTA Angelus HP	Angelus, Londrina PR, Brasil	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de calcio, tungstato de calcio.	5 minutos	15 minutos	Agua y plastificante	Tungstato de calcio	No
Endo - S MTAFlow	Ultradent, South Jordan, Utah, USA	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, sulfato de calcio, sílice, trióxido de bismuto.	15 minutos	Sin información	Gel soluble en agua a base de silicona	Trióxido de bismuto	Si
Biodentine	Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Francia	Silicato tricálcico, carbonato de calcio, óxido de calcio, óxido de zirconio.	9 minutos	9 minutos	Solución acuosa de cloruro de calcio y poliacrilato modificado	Oxido de Zirconio	No
Bioroot RCS	Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Francia	Silicato tricálcico, óxido de zirconio y povidona.	10 minutos	4 horas	solución acuosa de cloruro de calcio y poliacrilato	Oxido de Zirconio	No
MTA CPM	EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina	Silicato tricálcico, óxido tricálcico, aluminato tricálcico y otros óxidos.	15 minutos	27 minutos	solución salina y cloruro de calcio	Sin información	Si

Tabla 2. Características de los cementos biocerámicos bifásicos

Biocerámicos Premezclados

MARCA COMERCIAL	EMPRESA	ADITIVOS	TIEMPO FRAGUADO	TIEMPO TRABAJO	RADIOPACIFICADOR	TINCION
TotalFill BC Sealer	FKG Dentaire SA La Chaux-de-Fonds, Suiza	Óxido de zirconio, silicatos de calcio, fosfato monocálcico, hidróxido de calcio, agentes de relleno y espesantes	4 horas	4 horas	Óxido de zirconio	No
TotalFill BC RRM Paste	FKG Dentaire SA La Chaux-de-Fonds, Suiza	Silicatos de calcio, óxido de zirconio, óxido de tántalo, fosfato de calcio monobásico	2 horas	>30 minutos	Óxido de zirconio	No
TotalFill BC RRM Putty	FKG Dentaire SA La Chaux-de-Fonds, Suiza	Silicatos de calcio, óxido de zirconio, óxido de tántalo, fosfato de calcio monobásico	2 horas	>30 minutos	Óxido de zirconio	No
TotalFill BC RRM Fast Set Putty	FKG Dentaire SA La Chaux-de-Fonds, Suiza	Silicatos de calcio, óxido de zirconio, óxido de tántalo, fosfato de calcio monobásico	20 minutos	>20 minutos	Óxido de zirconio	No
BIO-C Sealer	Angelus, Londrina PR, Brasil	Silicato de calcio, aluminato de calcio, óxido de calcio, óxido de zirconio, óxido de hierro, dióxido de silicio y agente de dispersión	120 minutos	60 minutos	Óxido de zirconio	No

Tabla 3. Características de los cementos biocerámicos premezclados

4.3.2.2 Indicaciones para la utilización de cementos reparadores

4.3.2.2.1 Perforación

Durante el tratamiento Endodóntico pueden suceder accidentes que pueden perjudicar el pronóstico del tratamiento, como es la perforación, la cual es una comunicación artificial entre el conducto radicular y los tejidos periodontales de la cavidad oral (Sahebi et al., 2013).

Las perforaciones del conducto radicular en endodoncia pueden ocurrir durante diferentes momentos del procedimiento, como lo es la preparación de la cavidad de acceso, instrumentación del conducto radicular y preparación del espacio para postes (Tomer, 2016).

Es importante proporcionar un sellado adecuado de inmediato para evitar una nueva contaminación del área. Clínicamente, se utiliza un cemento de reparación endodóntica para el sitio de perforación de inmediato para reducir la carga bacteriana y la irritación de

los tejidos periodontales, lo que ocurre debido a la utilización frecuente de irrigantes del conducto radicular (Al Qathami et al., 2004).

4.3.2.2.2 Apexificación

Con la introducción del MTA, los largos procedimientos de apexificación necesarios para crear una barrera en el extremo de la raíz se redujeron a una o dos sesiones clínicas donde se creó una barrera apical y el diente pudo restaurarse inmediatamente de manera normal. Las características principales de MTA que lo hacen adecuado para los procedimientos de apexificación es su naturaleza hidráulica y también las propiedades relacionadas con la formación y liberación de hidróxido de calcio (Camilleri, 2017).

4.3.2.2.3 Cirugía apical

En los procedimientos quirúrgicos la principal preocupación es la calidad de los materiales de obturación. Debería sellar eficazmente el área dañada y también presentar propiedades biocompatibles y osteogénicas. Aunque todos los materiales disponibles tienen un cierto grado de disolución que conduce a la microfiltración, hay un punto crítico más allá del cual el tratamiento conduce al fracaso (Camilleri et al., 2015).

Diferentes materiales fueron utilizados en el pasado como la amalgama, cuyos principales inconvenientes incluyeron corrosión, cambios volumétricos y decoloración de las encías, fue reemplazada por materiales con mejores propiedades, como IRM, Super-EBA, resinas compuestas y cementos de ionómero de vidrio. Los efectos tóxicos, los problemas de manipulación y el efecto de la humedad llevaron a introducir al MTA y después otros biocerámicos (Demirkaya et al., 2016).

4.3.3 MTA

Uno de los materiales más revolucionarios introducidos en Endodoncia fue el Mineral Trióxido Agregado (MTA). Las investigaciones sobre la formulación de MTA permitieron a los investigadores revelar la composición y también algunos problemas clínicos relacionados con la aplicación clínica de este material, lo que resultó en el desarrollo de una nueva generación de materiales de endodoncia, los cementos a base de silicato de calcio (Tanomaru-Filho et al., 2016).

El agregado de trióxido mineral (MTA) es un material de reparación compuesto principalmente de cemento de silicato de calcio, al cual se le ha agregado óxido de bismuto para efectos de radiopacidad. Se ha encontrado que la radiopacidad media para MTA es de 7,17 mm de espesor equivalente de aluminio. El MTA inicialmente era una mezcla mecánica de tres ingredientes en polvo: cemento portland (75%), óxido de bismuto (20%) y yeso (5%) (Ghilotti et al., 2020). Actualmente los principales componentes del MTA son: silicato tricálcico, silicato dicálcico y óxido de bismuto. Mientras que los componentes de la versión blanca, WMTA, son silicato tricálcico y óxido de bismuto (Corral et al., 2016).

Las principales propiedades que tiene el MTA son su biocompatibilidad, favorecida por su citotoxicidad baja; así como la inducción de la proliferación y adhesión celular y expresión adecuada de citocinas inflamatorias durante su contacto con la pulpa e inflamación pulpar reducida luego de la fase aguda (Zafar et al., 2020).

Tiene pH de 10.2 después de mezclarse, aumenta a 12.5 después de 3 horas, esto se atribuye a la liberación de iones de calcio del MTA y la formación de hidróxido de calcio (Wang, 2015).

Se prepara mezclando con agua estéril en proporción 3:1. Si se coloca una torunda de algodón húmeda sobre el MTA por 24 horas puede incrementar la fuerza flexible (Wang, 2015).

El MTA induce resultados satisfactorios, incluso en los casos en que el material puede entrar en contacto con el tejido pulpar, los líquidos o la sangre (Cuadros et al., 2016; Kundzina et al., 2017).

Sin embargo, el MTA tiene algunos inconvenientes, incluida la dificultad en el manejo y aplicación, debido a su consistencia granular (Rajasekharan et al., 2018); una posible decoloración dental y el largo tiempo de fraguado, el cual es de 140 min (Leindecker et al., 2012).

Desde la introducción del agregado de trióxido mineral (MTA) (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) en el campo de los materiales de reparación de raíces (Torabinejad, 1993), los materiales a base de silicato de calcio han atraído una atención

considerable (Camilleri, 2011) debido a su sellado superior capacidad, biocompatibilidad, capacidades regenerativas y propiedades antibacterianas (El Sayed, 2012).

Por lo tanto, se han utilizado ampliamente como materiales de reparación endodóntica y como sustitutos de la dentina (Sawyer, 2013). Se utiliza como material de obturación retrógrada, recubrimiento pulpar, pulpotomía, apicoformación, apicogénesis y reparación de perforaciones (Wang, 2015).

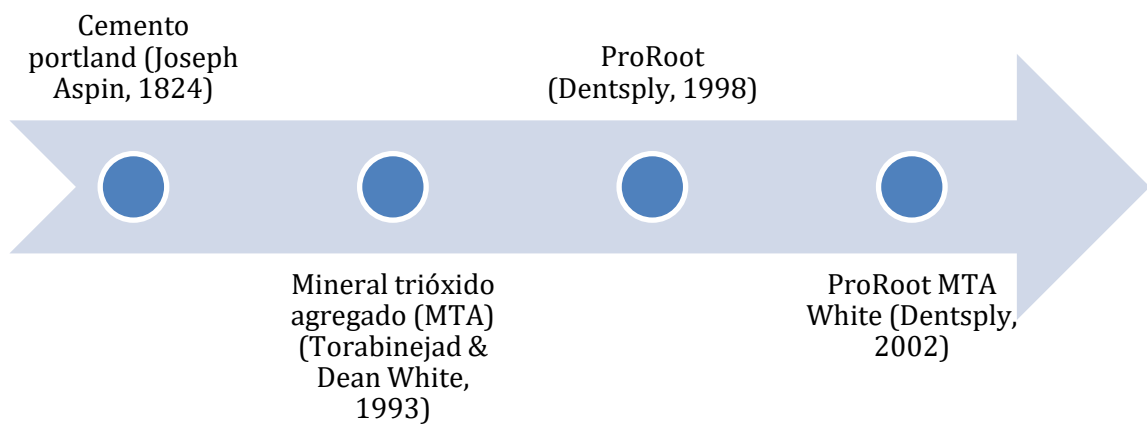


Figura 2. Línea del tiempo del MTA

4.3.4 Neo MTA

Recientemente, se han introducido nuevos materiales, entre ellos, NeoMTA-Plus, un silicato hidráulico tricálcico a base de óxido de tantalio como agente radiopacificante en lugar de óxido de bismuto, por lo tanto, evita la decoloración bioactivos (Farrugia et al., 2018; Pedano et al., 2018) y puede mejorar el potencial de mineralización al inducir la diferenciación en células secretoras de minerales (Tomas - Catala et al., 2017, 2018).

Este cemento está disponible en sistema polvo-gel, ha sido prescrito para terapias vitales dentales, como material de obturación retrógrada y material reparador en perforaciones laterales (Camilleri et al., 2016). El agente radiopacificante, que era óxido de bismuto en MTA Plus, fue reemplazado por óxido de tantalio. Además de no provocar decoloración,

la adición de óxido de tantalio proporcionó radiopacidad y no ejerció ningún efecto sobre la hidratación (Camilleri et al., 2016).

Además, se ha informado que NeoMTA-Plus tiene una capacidad para liberar calcio, prevenir fugas bacterianas, radiopacidad adecuada y una capacidad de sellado satisfactoria; se puede usar como sellador endodóntico o reparación de cemento (Quintana et al., 2018). NeoMTA ha demostrado una capacidad de sellado satisfactoria, resistencia a la filtración (Tran et al., 2016), radiopacidad adecuada y capacidad para liberar iones de calcio e hidroxilo (Siboni et al., 2017).

Una caracterización química de NeoMTA Plus concluyó que este material es adecuado para ser utilizado en el tratamiento de dientes inmaduros porque producen hidróxido de calcio, que es necesario para inducir la formación del puente de dentina y la formación continua de la raíz (Tran et al., 2016). Además, se pueden usar como una alternativa a MTA, no producen decoloración, debido a la ausencia de óxido de bismuto (Camilleri, 2015).

4.3.5 Biodentine



Figura 3. Presentación comercial de Biodentine

Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desfossés, Cedex, Francia) ha sido reconocido en la literatura como un biomaterial representante de los cementos a base de silicato tricálcico, actualmente utilizados en odontología (Giraud et al., 2019).

Biodentine fue uno de los primeros cementos de silicato de calcio que contiene silicato tricálcico puro introducido en el mercado. Ha demostrado un rendimiento similar al MTA con respecto a la inducción de la deposición de tejido duro y sin tener una respuesta inflamatoria y a la vez tiene la propiedad de inducir la capacidad de regeneración de la pulpa (Camilleri et al., 2015; Kaur et al., 2017).

Biodentine ha sido formulado utilizando tecnología de cemento basada en MTA y, por lo tanto; afirma mejoras de algunas de las propiedades, como las cualidades físicas y el manejo, incluida su otra amplia gama de aplicaciones, (Kaur et al., 2017)

La presentación de biodentine es en forma de una cápsula que contiene el polvo y un líquido contenido en una ampolla (Llanosm 2015). La composición del polvo es el silicato tricálcico (80,1%), carbonato de calcio (14,9%), óxido de circonio (5%) y óxido de hierro, mientras que el líquido contiene cloruro de calcio que actúa como un acelerador (Narváz et al., 2015).

Su mejor manipulación, es una de sus principales propiedades; además del tiempo de fraguado más rápido, mejor resistencia a la compresión, porosidad disminuida y síntesis temprana de dentina reparativa, en comparación al MTA. Asimismo, la acción antibacteriana de este biomaterial está determinada por los componentes de calcio, los cuales se convierten en soluciones acuosas de hidróxido de calcio (Laurent et al., 2008). Por su bioactividad, el biodentine se puede considerar como un material apropiado para la regeneración del complejo dentino pulpar en recubrimientos pulpares directos, pues no induce daño a las células pulpares; además, estimula la formación de dentina reparadora (Parinyaprom et al., 2018).

El biodentine presenta un menor tiempo de fraguado, comparado con los silicatos de calcio tradicionales debido al tamaño más pequeño de las partículas del polvo. Esta condición permitiría una mayor área de reacción por la adición de la solución acuosa de cloruro de calcio que es un potente acelerador de la reacción en estos materiales. Con esto, el biodentine obtuvo una mejora en comparación con el MTA respecto al tiempo de fraguado (Narváz et al., 2015).

Puede usarse tanto como material de restauración coronal para la reparación de perforaciones como como material de recubrimiento pulpar en contacto directo con la

pulpa (Laurent et al., 2008). Está diseñado para colocarse en contacto permanente y cercano con el tejido perirradicular y, por lo tanto, es importante evaluar sus posibles efectos citotóxicos en los fibroblastos gingivales humanos (Nagaraja et al., 2005). Se ha demostrado que el Biodentine libera más iones de calcio en solución que la MTA y se ha informado de su éxito cuando se usa como un tapón apical en los casos de apexificación (Vidal et al., 2016; Evren et al., 2016; Nirranjan et al., 2016).

4.3.6 Endosequence RRM



Figura 4. Presentación comercial de Endosequence RRM

Endosequence RRM es un cemento bioactivo premezclado listo para usar (Ma, 2011). Está compuesto por óxido de circonio, silicatos de calcio, óxido de tantalio, fosfato de calcio monobásico y agentes de relleno y espesantes (Parirokh, 2017). Se puede utilizar en muchos de los mismos procedimientos que el MTA pero con la ventaja de un tiempo de fraguado más corto de 20 minutos y mejores propiedades de manejo, además sin potencial de pigmentación (Kahli, 2015), igualmente que el MTA, Endosequence tiene un pH alcalino el cual es de 12 (Brasseler USA, Savannah, GA). Este pH alcalino, no solo se produce durante el fraguado, sino que se mantiene tras completar este, manteniendo la alcalinidad al menos 5 semanas. Los valores fueron superiores a los de otro cemento en base a biosilicatos (Fillapex) y a los de cementos en base de resina epóxica (AH Plus) (Zhou ,2013).

El cemento EndoSequence BC RRM (Brasseler USA, Savannah, GA) es un material que se comercializa como un cemento de reparación radicular que puede usarse para reparar perforaciones, reabsorciones, procedimientos de cierre apical, recubrimiento pulpar y

obtención retrógrada durante los procedimientos quirúrgicos. Está disponible en consistencia de pasta o masilla, y el fabricante afirma que tiene potencial osteogénico (Brasseler USA, 2015).

Algunos estudios han evaluado la citotoxicidad de este cemento, determinando que es baja (Alanezi, 2010) y que muestra una biocompatibilidad in vitro similar a la del MTA (Ma, 2011).

Además, otros estudios aseguran que EndoSequence BC RRM tiene efectos antimicrobianos (Lovato, 2011) y antifúngicos (Alsalleeh, 2014) parecidos a los de MTA. En un modelo animal de rata, ambos materiales indujeron reacciones inflamatorias después de la implantación en tejidos subcutáneos, pero EndoSequence BC RRM fue menos dañino que MTA (Khalil, 2015).

El uso de EndoSequence BC RRM como material de retrobturación se ha vuelto más frecuente en los últimos años ya que cumple las características ideales según lo descrito por el Dr. Kim: tolerado por tejidos, muestra propiedades antimicrobianas, se adhiere al diente, dimensionalmente estable, fácil de manejar y usar, no corrosivo, no mancha el tejido ni el diente, resistente a la disolución, electroquímicamente inactivo, promueve la cementogénesis y es radiopaco (Kim, 2001).

La colocación de este cemento como barrera apical está indicada para dientes con pulpas necróticas, ápices abiertos y paredes dentinarias radiculares delgadas (Trope, 2016). El objetivo es crear un tope apical como medio para contener el material de obturación.

EndoSequence BC RRM es una opción posible sin potencial de tinción y un manejo más fácil; sin embargo, solo pocos estudios evidencian el uso de este cemento en reportes de casos y existen reportan el uso de otros biocerámicos como barreras apicales (Torabinejad, 2018).

En un estudio in vivo se compararon materiales para procedimientos de recubrimiento pulpar directo, MTA y EndoSequence BC RRM, se evaluó por la formación de puentes de dentina, en ambas no hubo la inflamación pulpar observada con Ca (OH) 2, pero no hubo decoloración observado con EndoSequence BC RRM (Shi, 2016).

La Citotoxicidad de MTA y EndoSequence BC RRM es muy similar, comparada con el material Dycal® (Dentsply Sirona, York, PA) el cual ha demostrado tener efectos citotóxicos (Hirschman, 2012).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

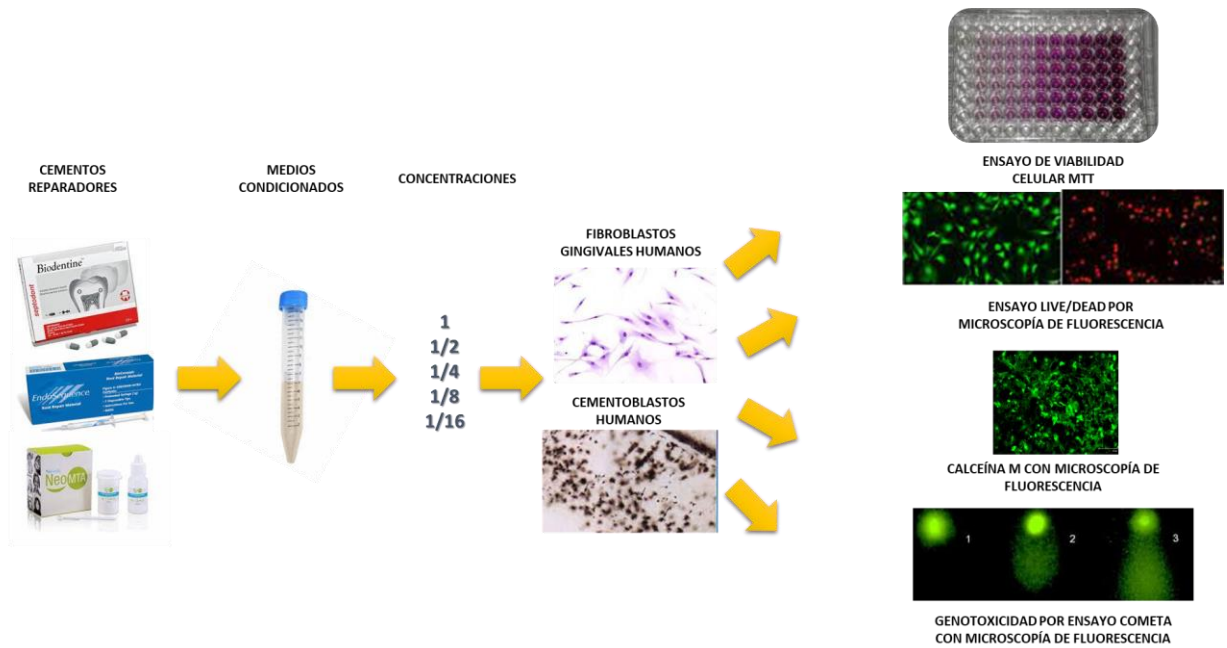


Figura 5. Resumen gráfico de metodologías

5.1 Cultivo celular

Los fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10 % de suero bovino fetal, respectivamente (FBS , BioWest , Nuaille , Francia) a 37 ° C con 5% de CO₂ , en placas de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific , MA , EE.UU.) brevemente se realizó un lavado con EDTA 0.68 mM y después se agregó tripsina-EDTA durante 5 minutos en la incubadora a 37 ° C con 5% de CO₂ posterior se realizó el conteo de celular con un Hematocitómetro para calcular 1×10^{-5} en placas de 96 para obtener una mono capa confluyente aproximadamente 48 horas, se corroboró con microscopio invertido modelo Motic AE31 (Hernández-Delgadillo et al., 2016).

5.2 Preparación de los cementos

Los cementos se prepararon según las instrucciones del fabricante como se describe a continuación.

Biodentine: Se tomó una cápsula y se golpeó levemente en una superficie dura para descomprimir el polvo. Se abrió la cápsula y se colocó en el soporte blanco. Se separó una monodosis de líquido. Se vertieron 5 gotas de la monodosis en la cápsula. Se cerró la cápsula. Se colocó la cápsula en un amalgamador a una velocidad de unas 4000 a 4200 oscilaciones/min. Se mezcló durante 30 segundos. Se abrió la cápsula y verificó la consistencia del material. Se recuperó el material Biodentine con la espátula presente en la caja (Septodont).

Endosequence RRM: Se retiró la tapa de la jeringa de la jeringa. Se fijó con seguridad una punta BC con un giro en el sentido de las agujas del reloj al centro de la jeringa. Se dispensó suavemente el material comprimiendo el émbolo de la jeringa (Brasseler).

NeoMTA: Se dispensó 1 cucharada de NeoMTA Powder sobre una loseta de vidrio o una almohadilla no absorbente. Se dispensó una gota de NeoMTA Gel como una raya de 0.5-0.75 de largo al lado del Polvo. Se agregó gradualmente el gel al polvo. Se incorporó el gel espatulando firmemente la mezcla de polvo / gel contra la loseta de vidrio mientras se mezcló para asegurar que todo el polvo se humedezca completamente con el gel hasta obtener una consistencia similar a la masilla (Nusmile).

5.3 Obtención de medios condicionados

Para los medios condicionados los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA se prepararon según las instrucciones de los fabricantes. Teniendo el cemento listo se incubó en 5ml de medio de cultivo celular durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se utilizó medio de cultivo como control negativo, después de la incubación se colocaron em vortex durante 5 minutos (Teixeira et al., 2020).

Estos medios condicionados subsecuentemente en las siguientes metodologías se le agregaron a una monocapa de fibroblastos gingivales o cementoblastos humanos a diferentes concentraciones: 1, es tal como lo preparamos para uso clínico, ½ es realizando la dilución al 50% y así sucesivamente se diluyó hasta llegar a la concentración 1/16.

5.4 Efecto del Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos por ensayo del MTT

Se analizó la posible citotoxicidad de Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA sobre los cultivos de fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos utilizando el ensayo de la viabilidad celular MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Biotium, Hayward, CA) (Mosmann, 1983; Liu y cols, 1997). Se le colocaron 1×10^4 de células a cada pozo, se incubarán a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h. Se colocaron los medios condicionados con cementos reparadores en una placa de 96 pozos en concentraciones de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 en cada pozo correspondiente, dejándolos interactuar durante 24 horas. Se utilizó células libres de medio condicionado como control negativo. Después de la incubación, se añadieron $10 \mu\text{l}$ de MTT a cada pocillo y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 por 2 horas en condiciones de oscuridad. Después de lo cual, el medio se retiró y $100 \mu\text{l}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) se añadió para disolver el producto formazan MTT reducido. El MTT reducido se cuantificó a 595 nm usando un lector de microplaca de absorbancia (Biotek, Winooski, VT) y el DMSO se empleó como blanco. El ensayo se realizó por triplicado y la densidad óptica cuantificada se analizó mediante estadística descriptiva (Hernández-Delgadillo et al., 2016).

5.5 Visualización de las células post exposición a cementos con microscopía de fluorescencia mediante el ensayo Live/Dead

Después del tratamiento con Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA durante 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con $100 \mu\text{L}$ / pocillo de homodímero 1 de etidio (EthD-1) y Calceína AM (LIVE / DEAD. Viability / Cytotoxicity Kit, life technologies) durante 30 min. Los pocillos se fotografiaron utilizando microscopía de fluorescencia y se analizaron imágenes elegidas al azar para cada pocillo.

5.6 Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia

Para determinar si la membrana de la célula permanecía intacta o se degradaba post a la exposición con los diferentes cementos se realizó el Ensayo de Calceína M. Después de la exposición de las células a Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA durante 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con $100 \mu\text{L}$ / pocillo de

Calceína AM (LIVE / DEAD. Viability / Cytotoxicity Kit, life technologies) durante 30 min. Los pocillos se fotografiaron utilizando microscopía de fluorescencia y se analizaron imágenes elegidas al azar para cada pocillo.

5.7 Genotoxicidad por ensayo cometa y microscopía de fluorescencia

Para determinar el posible efecto genotóxico de los materiales de reparación de la raíz, se incubaron cementoblastos humanos y fibroblastos gingivales durante la noche a 37 ° C / 5% de CO₂ con medio acondicionado 1: 1 de Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA, clorhexidina 100 µM como control positivo o medio de cultivo como control de crecimiento. Después de la incubación, se determinó el daño celular con el kit de ensayo OxiSelect™ Comet (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se recolectaron raspando y centrifugando (700 xg, 2 minutos) y se lavaron con PBS. Las suspensiones celulares se mezclaron con Comet Agarosa licuada en una proporción 1:10 (v / v) y se pipetearon en un OxiSelect Comet Slide (75 µL / pocillo). Después de un paso de inclusión de 15 minutos (4 ° C, oscuro, posición horizontal), las células se lisaron (25 ml de tampón de lisis / portaobjetos, incubación de 30 minutos, 4 ° C, oscuro, posición horizontal) y se trataron con una solución alcalina (25 mL / portaobjetos, 30 minutos, 4 ° C, oscuro) para desnaturalizar el ADN. Finalmente, las muestras se someten a electroforesis en una cámara horizontal (300 mA durante 30 minutos) para separar el ADN intacto de los fragmentos dañados. A continuación, las muestras se lavan con agua estéril, se tratan con etanol frío al 70% durante 5 minutos, se secan al aire y se tiñen con el tinte de DAPI (100 µL / pocillo), y se observan con un microscopio de epifluorescencia utilizando un filtro DAPI (Thornwood , Nueva York, EE. UU.).

5.8 Análisis estadístico

Se calcularon las absorbancias medias que contenían el mismo medio condicionado y su desviación estándar. Los valores de densidad óptica de los cultivos de prueba se expresaron como porcentaje de la densidad óptica obtenida para el medio de control. Se consideró que el valor de absorción obtenido con el control indicaba una viabilidad del

100%. Los datos proporcionados por el lector de ELISA se analizaron con estadística descriptiva (medias \pm desviaciones estándar).

6. RESULTADOS

6.1 Viabilidad celular mediante ensayo MTT

6.1.1 Efecto del Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA sobre fibroblastos gingivales humanos por ensayo del MTT

Para evaluar la viabilidad celular de los cementos reparadores se realizó el Ensayo de viabilidad celular MTT sobre fibroblastos gingivales humanos a concentraciones de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

La figura 8 muestra el porcentaje de viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos expuestos a los diferentes cementos reparadores en diferentes concentraciones. A la mayor concentración Biodentine mostró la viabilidad celular más baja con un 47.34%, seguido de NeoMTA que obtuvo un 77%. Por su parte Endosequence RRM expresó la mayor viabilidad celular con un 92.25%. Conforme se va disminuyendo en concentraciones podemos observar que en los 3 grupos de cementos la viabilidad aumenta. En la menor concentración ya podemos observar viabilidades por encima del 90% en los 3 grupos. Con estos datos se demuestra que a la mayor concentración de Biodentine, que es la que aplicamos en la clínica, la viabilidad celular está por debajo del 50% mostrando ser citotóxico.

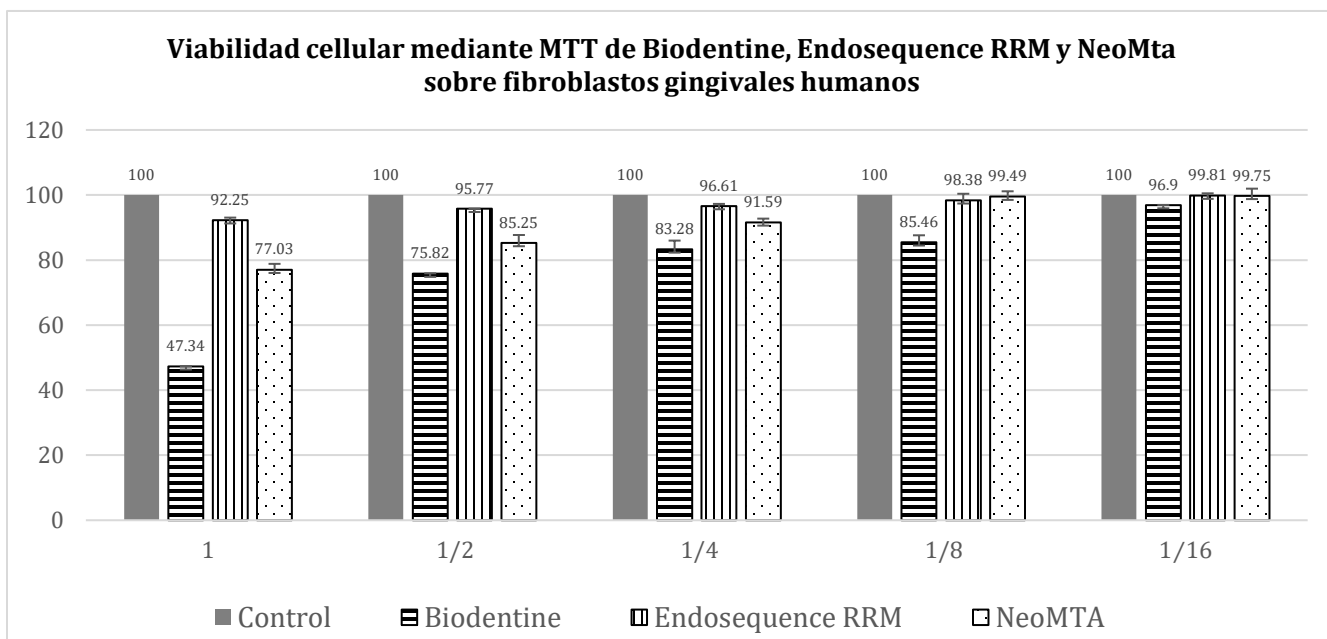


Figura 6. Porcentaje de Viabilidad Celular de fibroblastos después de la exposición de 24 horas de los medios condicionados con cementos reparadores.

6.1.2 Efecto del Biodentine, EndoSequence RRM y NeoMTA sobre cementoblastos humanos por ensayo del MTT

Para evaluar la viabilidad celular de los cementos reparadores se realizó el Ensayo de viabilidad celular MTT sobre cementoblastos humanos a concentraciones de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

La figura 9 muestra el porcentaje de viabilidad de los cementoblastos humanos expuestos a los diferentes cementos reparadores en diferentes concentraciones. A la mayor concentración Biodentine mostró la viabilidad celular más baja con un 50.02%, seguido de NeoMTA que obtuvo un 75.05%. Por su parte Endosequence RRM expresó la mayor viabilidad celular con un 91.99%. Conforme se va disminuyendo en concentraciones podemos observar que en los 3 grupos de cementos la viabilidad aumenta. En la menor concentración ya podemos observar viabilidades por encima del 90% en los 3 grupos. Con estos datos se demuestra que a la mayor concentración de Biodentine, que es la que aplicamos clínicamente, la viabilidad celular está en un 50% mostrando ser citotóxico.

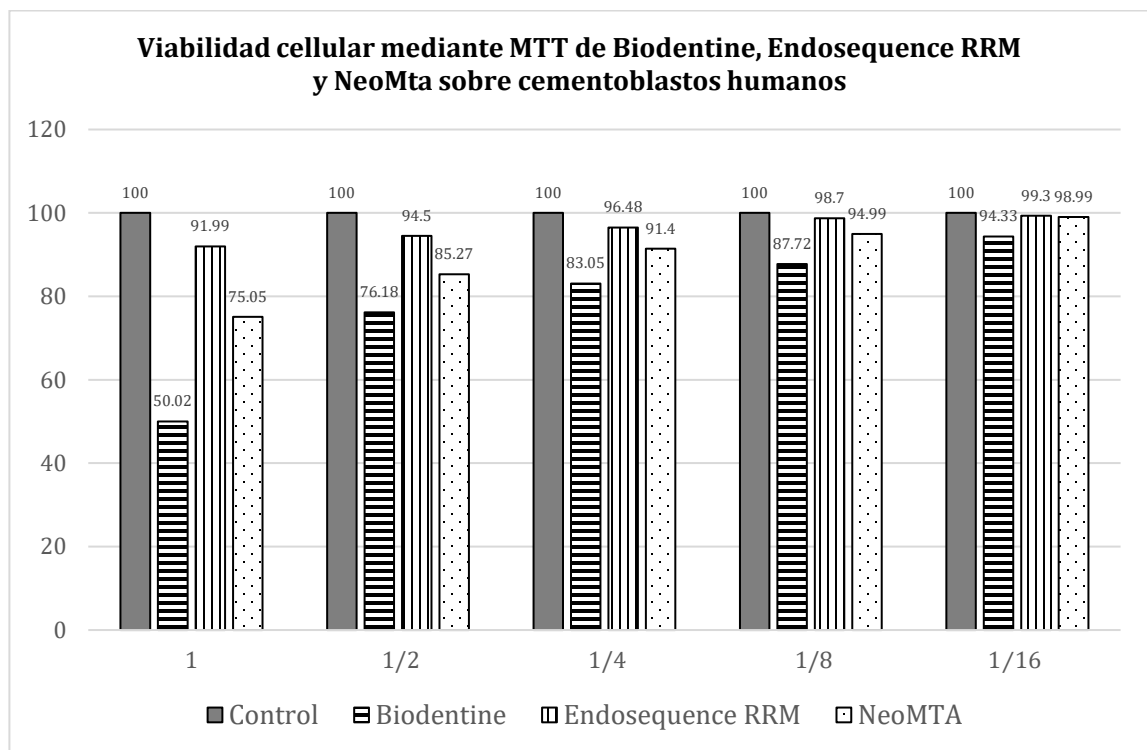


Figura 7. Porcentaje de Viabilidad Celular de cementoblastos después de la exposición de 24 horas de los medios condicionados con cementos reparadores.

6.2 Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA.

6.2.1 Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos.

El efecto citotóxico se evaluó mediante el ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia. Se expuso una monocapa de fibroblastos durante 24h a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16. La primera columna muestra imágenes con presencia de células vivas teñidas de verde con Calceina M. La segunda columna muestra la presencia de células muertas teñidas de rojo, donde se indica la pérdida de la integridad de la membrana plasmática con el homodímero de etidio -1. Finalmente en la tercera columna se muestra la superposición de las imágenes previas. La presencia de color rojo o amarillo corresponde a muerte celular, en cambio la tinción verde significará la presencia de células vivas.

El cemento Biodentine a su mayor concentración presenta más células muertas, confirmando el resultado que se obtuvo en el MTT donde hubo un porcentaje del 47% de viabilidad celular. En la concentración menor de 1/16 se observa mayor cantidad de células vivas, correlacionado igualmente a los resultados del Ensayo de MTT con un porcentaje de 96.9%. Por su parte en el cemento Endosequence RRM se observan células vivas en gran cantidad tanto a su mayor como a su menor concentración, con una gran similitud al grupo control, confirmando los altos porcentajes obtenidos en el Ensayo MTT 92.25% a concentración 1 y 99.8% a concentración de 1/16.

En el cemento NeoMTA se observan las imágenes de las células teñidas de verde en su mayoría, confirmando el resultado del Ensayo MTT el cual fue del 77% a su mayor concentración. La cantidad de células vivas aumenta en la imagen a menor concentración, las cuales se relacionan con el ensayo MTT donde se obtuvo porcentaje de 99.75%.

Con los resultados anteriores se puede resaltar que el cemento Biodentine obtuvo la mayor intensidad fluorescente con el homodímero de etidio -1, definiéndolo como el cemento con mayor toxicidad, seguido de NeoMTA y finalmente Endosequence RRM, con el que se

obtuvieron imágenes con mayor intensidad fluorescente con Calceína M, determinando menor toxicidad.

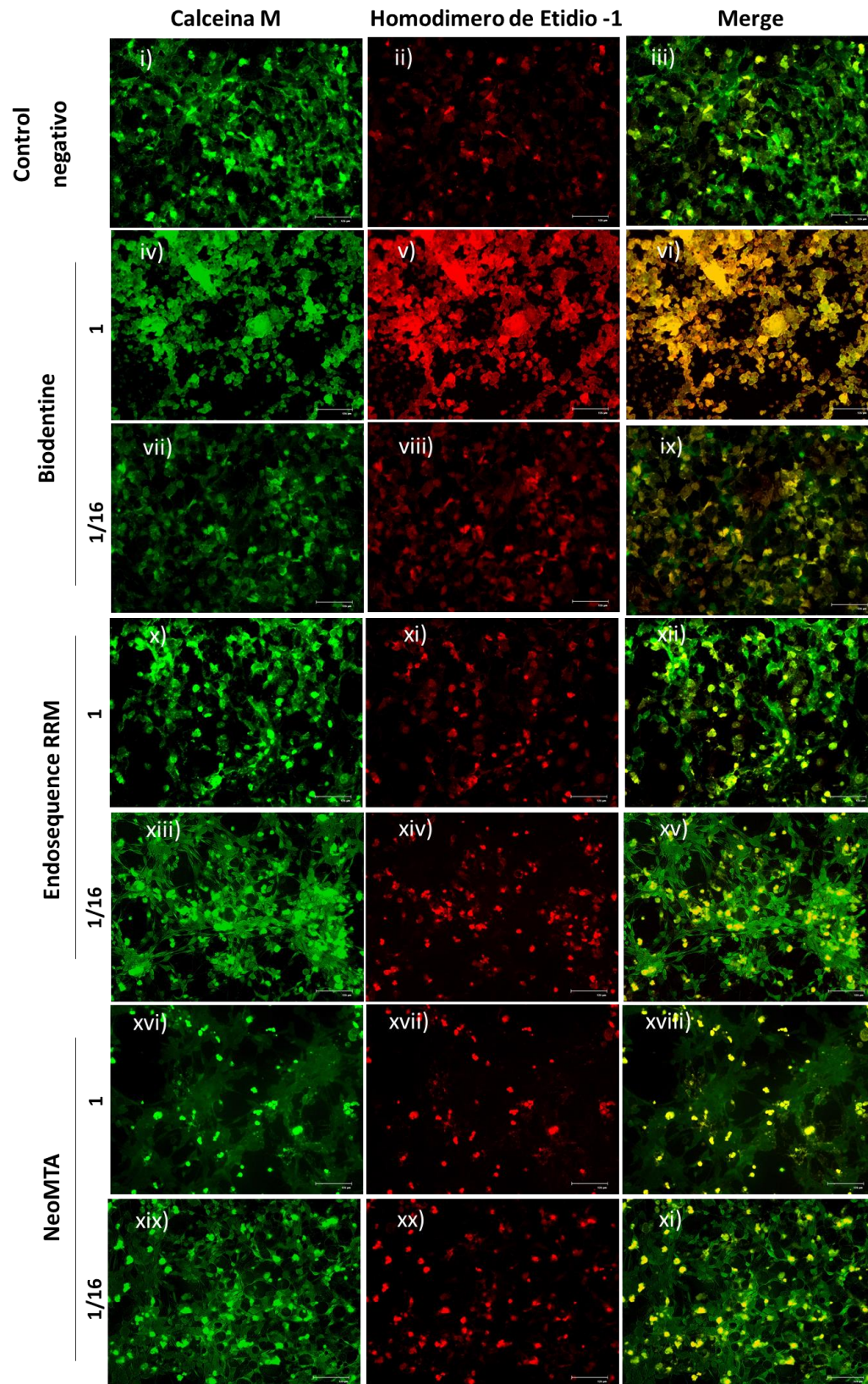


Figura 8 Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos a 24h de exposición a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16. En la primera columna se observan células vivas teñidas de verde con Calceína M. En la segunda columna se observan células muertas teñidas de rojo con el Homodimero de etidio -1. La tercera columna muestra la superposición de las imágenes previas.

6.2.2 Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre cementoblastos humanos.

El efecto citotóxico se evaluó mediante el ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia. Se expuso una monocapa de fibroblastos durante 24h a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16. La primer columna muestra imágenes con presencia de células vivas teñidas de verde con Calceína M. La segunda columna muestra la presencia de células muertas teñidas de rojo, donde se indica la pérdida de la integridad de la membrana plasmática con el homodimero de etidio -1. Finalmente en la tercer columna se muestra la superposición de las imágenes previas. La presencia de color rojo o amarillo corresponde a muerte celular, en cambio la tinción verde significará la presencia de células vivas.

El cemento Biodentine a su mayor concentración presenta más celulas muertas, confirmando el resultado que se obtuvo en el MTT donde hubo un porcentaje del 50.02% de viabilidad celular. En la concentración menor de 1/16 se observa mayor cantidad de células vivas, correlacionado igualmente a los resultados del Ensayo de MTT con un porcentaje de 94.33%. Por su parte en el cemento Endosequence RRM se observan células vivas en gran cantidad tanto a su mayor como a su menor concentración, con una gran similitud al grupo control, confirmando los altos porcentajes obtenidos en el Ensayo MTT 91.99% a concetración 1 y 94.33% a concentración de 1/16.

En el cemento NeoMTA se observan las imagenes de las células teñidas de verde en su mayoría, confirmando el resultado del Ensayo MTT el cual fue del 75.03 % a su mayor concentración. La cantidad de células vivas aumenta en la imagen a menor concentración, las cuales se relacionan con el ensayo MTT donde se obtuvo porcentaje de 98.99%.

Con los resultados anteriores se puede resaltar que el cemento Biodentine obtuvo la mayor intensidad fluorescente con el homodimero de etidio 1-, definiendolo como el cemento con mayor toxicidad, segudido de NeoMTA y finalmente Endosequence RRM, con el que se obtuvieron imágenes con mayor intensidad fluorescente con Calceína M, determinando menor toxicidad.

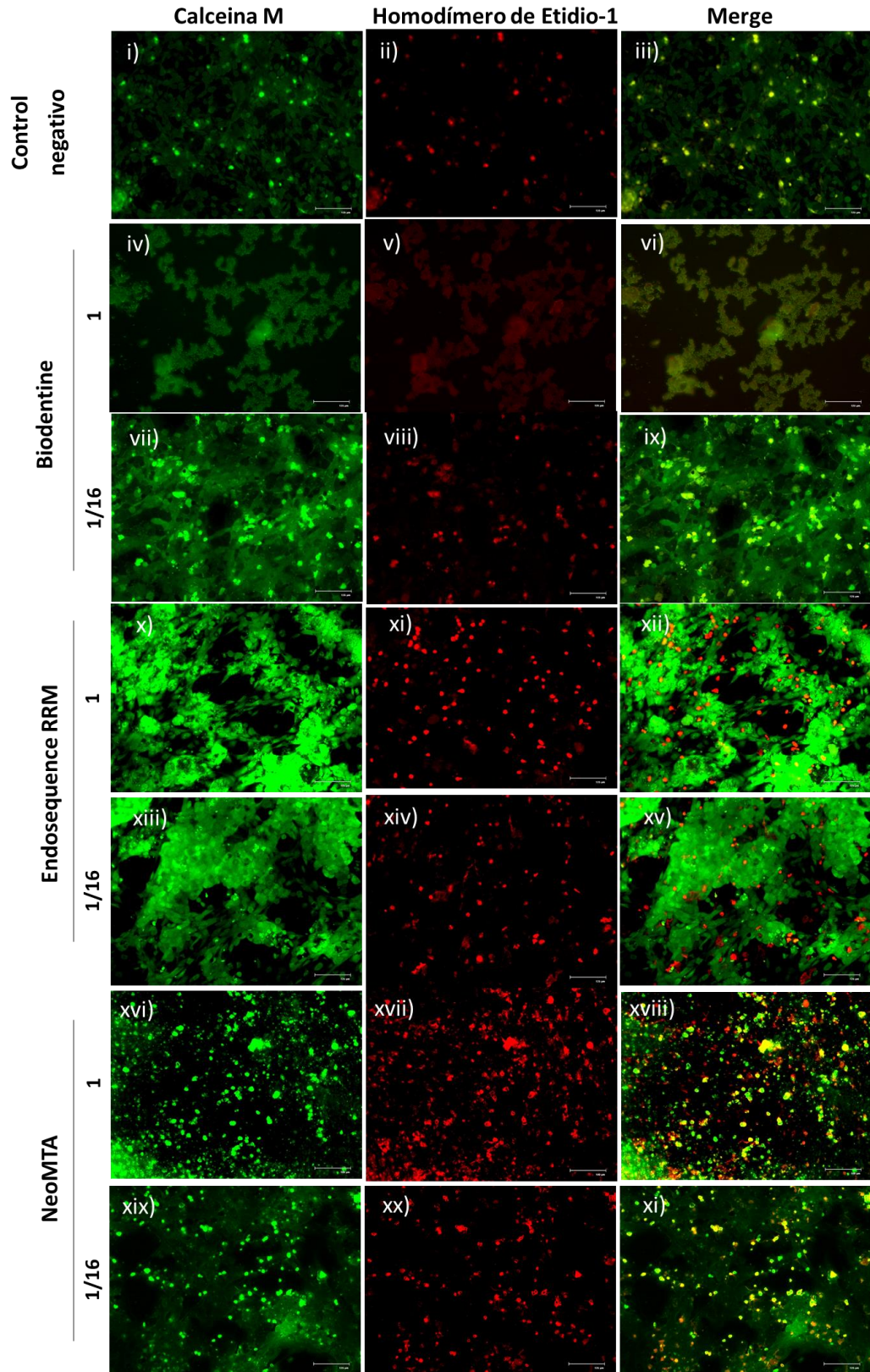


Figura 9. Ensayo Live/Dead por microscopía de fluorescencia sobre cementoblastos humanos a 24h de exposición a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA a concentración 1 y 1/16. En la primera columna se observan células vivas teñidas de verde con Calceína M. En la segunda columna se observan células muertas teñidas de rojo con el Homodímero de etidio -1. La tercera columna muestra la superposición de las imágenes previas.

6.3 Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA

6.3.1 Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA

Se realizó el ensayo de Calceína M para evaluar si la membrana de las células permanecía intacta o se degradaba después de la exposición con los diferentes cementos. En el grupo control se puede ver la morfología normal que presentan los fibroblastos, éste nos servirá de referencia para la comparación con los cementos

En el caso de Biodentine podemos observar que se altera la membrana plasmática, esto se refleja en la alteración la morfología de las células.

En la imagen obtenida para Endosequence RRM podemos observar la morfología celular muy similar a la del grupo control, en la cual no hubo alteración de la membrana. Finalmente, en la imagen obtenida en NeoMTA se puede observar un cambio en la morfología celular con alteración de la membrana plasmática.

Con los resultados de este estudio se puede concluir que uno de los mecanismos de acción de citotoxicidad de los cementos Biodentine y NeoMTA es dañar la membrana celular de los fibroblastos gingivales humanos.

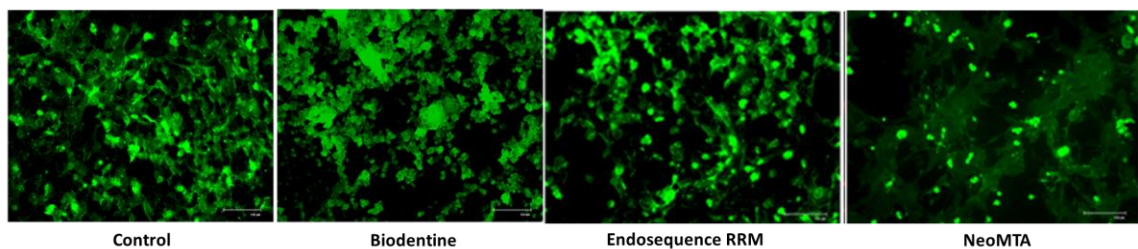


Figura 10. Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA

6.3.2 Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre fibroblastos gingivales humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA

Se realizó el ensayo de Calceína M para evaluar si la membrana de las células permanecía intacta o se degradaba después de la exposición con los diferentes cementos.

En el grupo control se puede observar la morfología normal que presentan los cementoblastos, sirviendo de referencia para la comparación con las imágenes de los demás cementos. En la imagen obtenida para Biodentine podemos observar una alteración de la membrana plasmática y esto se refleja en la modificación de la morfología de las células.

En la imagen obtenida para Endosequence RRM podemos observar la morfología celular muy similar a la del grupo control, en la cual no hubo alteración de la membrana por lo que permaneció intacta ante la exposición al cemento. Finalmente, en la imagen obtenida en NeoMTA se puede observar un cambio en la morfología celular con alteración de la membrana plasmática.

Con los resultados obtenidos de este estudio podemos concluir que uno de los mecanismos de acción de citotoxicidad de los cementos Biodentine y NeoMTA es dañar la membrana celular de los cementoblastos humanos.

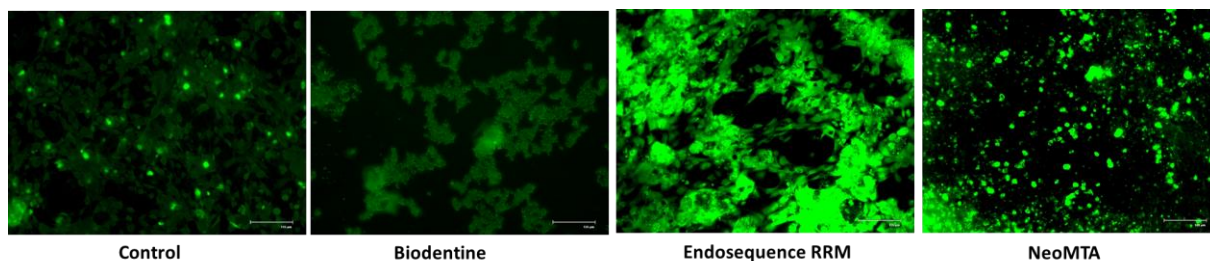


Figura 11. Ensayo Calceína M por microscopía de fluorescencia sobre cementoblastos humanos de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA

6.4 Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa de los cementos Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA.

6.4.1 Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos gingivales humanos

El posible daño al ADN celular por los diferentes cementos reparadores fue determinado con el ensayo Cometa por microscopía de fluorescencia.

En el control negativo se observa la integridad normal de los núcleos de los fibroblastos, circulares, bien definidos. Esto sirve de referencia para la comparación con los grupos de cementos. Por otro lado, en el grupo control positivo se utilizó la clorhexidina, en donde se observa en la desintegración del núcleo representado como una estela de un cometa.

Se pudo observar que a 24h tras la exposición de la monocapa de fibroblastos a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA ninguno de los grupos presentó la estela clásica de un cometa en comparación con el control positivo (Clorhexidina).

Estos resultados sugieren la ausencia de efectos tóxicos a nivel ADN, por lo cual se descarta que este sea mecanismo de acción en nuestras condiciones experimentales.

Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos gingivales humanos

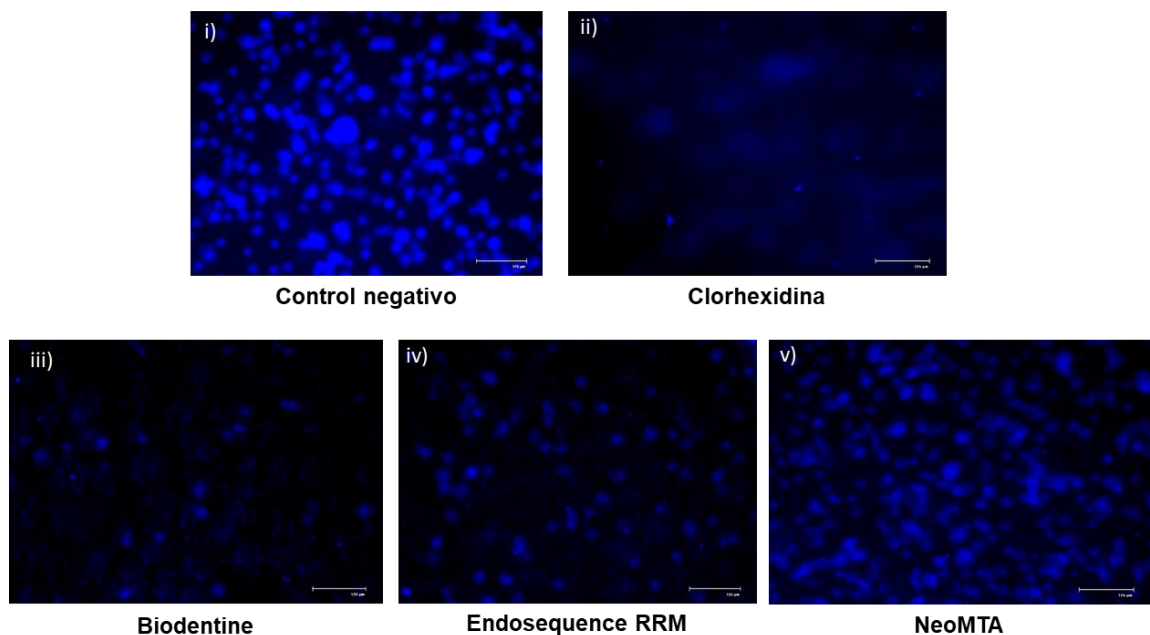


Figura 12. Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos gingivales humanos (i) Control negativo, (ii) Clorhexidina, (iii) Biodentine, (iv) Endosequence RRM y (v) NeoMTA a concentración 1.

6.4.1 Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre cementoblastos humanos

El posible daño al ADN celular por los diferentes cementos reparadores fue determinado con el ensayo Cometa por microscopía de fluorescencia.

En el control negativo se observa la integridad normal de los núcleos de los fibroblastos, circulares, bien definidos. Esto sirve de referencia para la comparación con los grupos de cementos. Por otro lado, en el grupo control positivo se utilizó la clorhexidina, en donde se observa en la desintegración del núcleo representado como una estela de un cometa.

Se pudo observar que a 24h tras la exposición de la monocapa de cementoblastos a Biodentine, Endosequence RRM y NeoMTA ninguno de los grupos presentó la estela clásica de un cometa en comparación con el control positivo (Clorhexidina).

Estos resultados sugieren la ausencia de efectos tóxicos a nivel ADN, por lo cual se descarta que este sea mecanismo de acción en nuestras condiciones experimentales.

Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre cementoblastos humanos

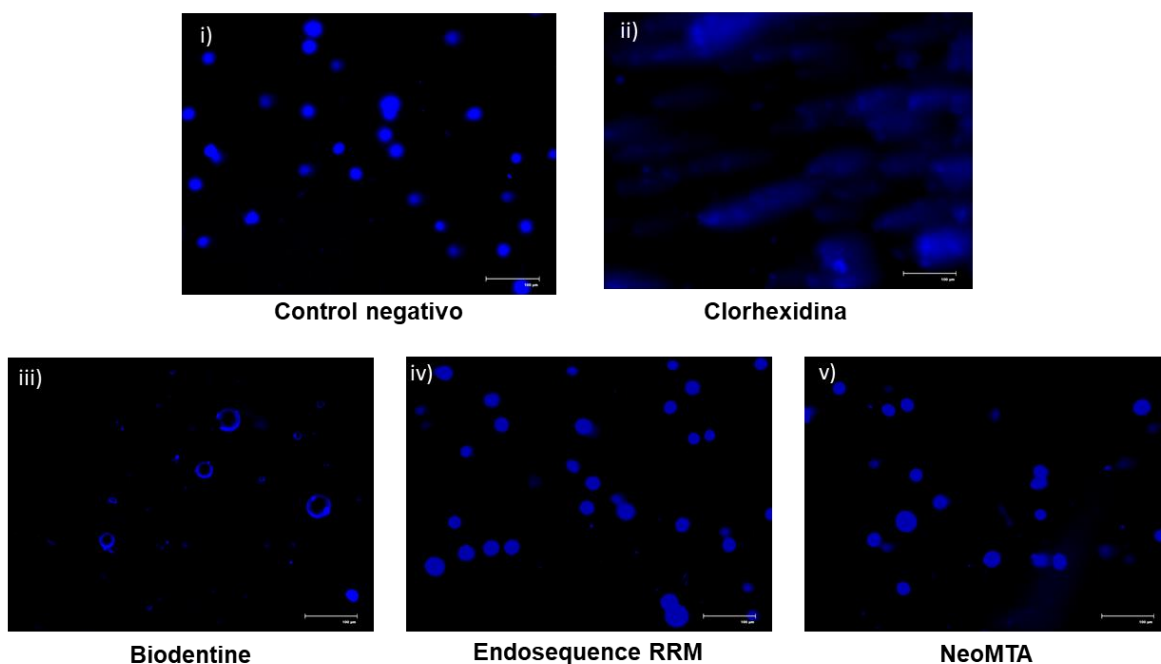


Figura 13. Genotoxicidad por microscopía de fluorescencia mediante ensayo cometa sobre fibroblastos cementoblastos humanos (i) Control negativo, (ii) Clorhexidina, (iii) Biodentine, (iv) Endosequence RRM y (v) NeoMTA a concentración 1.

7. DISCUSIÓN

En el área de la endodoncia, los materiales que son empleados para la reparación radicular deben poseer una baja citotoxicidad con los tejidos perirradiculares con los que estará en contacto, para así promover la proliferación celular y cicatrización adecuadas.

Uno de los cementos reparadores más utilizados es el Biodentine y recientemente se han agregado otros hidráulicos de silicato como Endosequence y NeoMTA.

Estudios previos sobre Biodentine han obtenido resultados en los que se menciona que la citotoxicidad que produce es mínima o nula (Tang et al., 2019) donde obtuvo porcentaje del 97% de viabilidad celular sobre fibroblastos pulpares.

En el caso de Endosequence, en la mayoría de los estudios, se han obtenido resultados favorables como, López-García y cols en el 2020 realizaron un estudio MTT sobre células madre de ligamento periodontal, donde los resultados de la viabilidad celular fueron similares o en ciertas concentraciones superiores a los del grupo control confirmando su gran citocompatibilidad.

Para NeoMTA actualmente existen pocos estudios que evalúen su citotoxicidad, Pinheiro y cols en el 2018 realizaron MTT e inmunocitofluorescencia sobre hDPSCs donde sus resultados sugieren una biocompatibilidad satisfactoria.

En el presente estudio además de utilizar el Ensayo MTT se buscó complementar los datos cuantitativos con datos cualitativos que nos permitan observar el efecto que tienen los cementos sobre las células a estudiar. Por lo tanto se complementó con las metodologías del Ensayo Live/dead, Calceína M y genotoxicidad por Ensayo Cometa.

Los resultados obtenidos de nuestro estudio respecto a la toxicidad de los cementos coinciden con los reportados previamente por Youseff en el 2019. La diferencia es que en su estudio se utilizó células madre del ligamento periodontal, mientras que en el presente se utilizaron dos grupos celulares distintos, fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos. Los resultados coinciden demostrando que Biodentine es el cemento con mayor citotoxicidad con un porcentaje menor al 50% en comparación del grupo control.

Abuarqoub y cols. en su estudio concluyen que Biodentine obtuvo menor citotoxicidad sobre células de ligamento periodontal a bajas concentraciones. Mientras que una alta concentración dio como resultado un aumento en los porcentajes de muerte celular

(Abuarqoub et al., 2020). Estos resultados igualmente son similares a los de nuestro estudio, donde a concentraciones altas Biodentine es citotóxico, pero conforme baja la concentración la viabilidad aumenta.

En contraste con la presente investigación, en un estudio del año 2020, el cemento Biodentine mostró una mayor viabilidad sobre hPDLSCs comparada con las células del grupo control a las 24 h mediante ensayo MTT (Ghilotti et al., 2020). En ese estudio solo realizaron el ensayo MTT como evaluador de la citotoxicidad, a comparación del nuestro donde se hicieron diferentes metodologías para tener resultados más completos.

En el estudio realizado por Damas et al., 2011, evaluaron la citotoxicidad de MTA y Biodentine, declarando que no había una diferencia significativa entre las viabilidades celulares de los fibroblastos expuestos a los materiales.

Para el cemento Endosequence, existe un estudio donde menciona que tiene un nivel de citotoxicidad bajo con un 94% de viabilidad sobre fibroblastos humanos dérmicos mediante ensayo MTT (Damas et al., 2011). Resultados que coinciden con nuestro estudio, donde Endosequence demostró tener bajo nivel de toxicidad en todas sus concentraciones y en los dos grupos celulares.

En un estudio del año 2017, NeoMTA sin diluir mostró un aumento significativo en la viabilidad celular mayor que el en el control mediante ensayo MTT sobre hDPSCs (Tomás-Catalá et al., 2017). Resultado que contrasta con nuestro estudio, pues a la concentración mayor, que es como el fabricante recomienda, el cemento NeoMTA muestra una disminución de la viabilidad celular alrededor del 70% para los dos grupos celulares.

La baja citotoxicidad es deseada en la aplicación clínica pues además de obtener un sellado mecánico con los cementos reparadores en endodoncia, es primordial obtener un sellado biológico donde la respuesta periápice-sellador garantice una reparación fisiológica de la zona (Silva et al., 2014). Las células más implicadas en esta zona son las del ligamento periodontal (Rodríguez Lozano et al., 2012). Por lo que se escogieron los dos grupos celulares de fibroblastos gingivales y cementoblastos humanos para tener una aproximación a los tejidos celulares con los que estará en contacto el cemento clínicamente, tal y como lo hicieron en el estudio de Samyuktha et al., 2014.

Se evaluó la viabilidad celular de cementoblastos y fibroblastos gingivales humanos después de la exposición a los cementos reparadores Endosequence RRM, Biodentine y Neo MTA, la prueba se realizó mediante el ensayo MTT en el presente estudio, con un procedimiento similar al de Damas et al., en el 2011.

Nuestros resultados evidencian que el cemento reparador Endosequence RRM induce menos citotoxicidad que el resto de los cementos reparadores estudiados, mostrando resultados similares al de Samyuktha et al., 2014 en donde Endosequence mostró una mayor viabilidad celular que MTA y Biodentine.

8. CONCLUSIONES

El cemento reparador Biodentine sorprendentemente resultó ser el más citotóxico en la presente investigación. En cambio, el cemento Endosequence RRM resultó ser el menos citotóxico. Los ensayos de live/dead, Calceína M y genotoxicidad nos ayudaron a confirmar los resultados cuantitativos del Ensayo de viabilidad celular MTT. El mecanismo por el cual Biodentine y NeoMTA son citotóxicos es por el daño a la membrana celular. En conclusión, basado en los resultados obtenidos de esta investigación Endosequence RRM pueden aplicarse al entorno clínico de manera más segura y predecible en comparación con Biodentine y NeoMTA

9. LITERATURA CITADA

1. Academy of Prosthodontics The glossary of prosthodontic terms. *J Prosthet Dent.* 2005;94:10-92.
2. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LA, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e122-5.
3. Alsalleeh F, Chung N, Stephenson L. Antifungal activity of EndoSequence root repair material and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2014;40:1815-19.
4. Alsubait S, Al-Haidar S, Al-Sharyan N. A comparison of the discoloration potential for EndoSequence bioceramic root repair material fast set putty and ProRoot MTA in human teeth: an in vitro study. *J Esthetic Rest Dent.* 2017; 29(1):59-67.
5. Al-Qathami H, Balto H, Al-Nazha S, Siddiqui Y. Effect of root perforation repair materials on morphology and attachment behavior of human PDL fibroblasts in vitro. *Saudi Dent J*, 2004;16(3):5.
6. Antunes HS, Gominho LF, Andrade-Junior CV, Dessaune neto N, Alves FR, Rôças IN. Sealing ability of two root-end filling materials in a bacterial nutrient leakage model. *Int Endod J.* 2016;49(10):960-965.
7. Anusavice, K.J. Philip's Science of dental materials. Tenth ed. Biocompatibility. 1996, Philadelphia: Saunders Company. 75-99.
8. Arencibia D.F., Rosario L.A., Curveco D.L.. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología.* 2003; 40-52.
9. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J.* 2008;34:30–5.
10. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater* 2011;27:836–44.
11. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod.* 2015; 41(7):1139-1145.
12. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Characterization of unhydrated and hydrated BioAggregate™ and MTA Angelus™. *Clin Oral Investig.* 2015;19(3):689–98.
13. Camilleri, J. Will bioceramics be the future root canal filling materials?. *Curr. Oral Health Rep.* 2017;4(3), 228-238.
14. Candeiro GT, Moura-netto C, D'Almeida-couto RS, Azambuja-Júnio N, Marques MM, Cai S, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J.* 2015;49(9):858-864.
15. Corral-Núñez, C., Fernández-Godoy, E., Casielles, J. M., Estay, J., Bersezio-Miranda, C., Cisternas-Pinto, P., & Batista-de Oliveira Jr, O. The current state of calcium silicate cements in restorative dentistry: A review. *Rev Fac Odontol Univ Antioq,* 2016;27(2), 425-441.
16. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate based endodontic sealers. *J Endod,* 2016; 42, 113–9
17. Cuadros-Fernández C, Lorente Rodríguez AI, Sáez-Martínez S, García-Binimelis J, About I, Mercadé M. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars

- using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2016;20(7):1639-45.
18. da Silva EJNL, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Investig.* 2017;21(5):1531-1536..
 19. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod* 2011;37:372–5.
 20. De Castro, C. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT. *Fac de Med. Fundación Universitaria San Martín*, 2016;1-11.2006.
 21. Debelian, G, Trope, M.. The use of premixed bioceramic materials in endodontics. *Giornale italiano di endodonzia*, 2016;30(2), 70-80.
 22. Demirkaya K, Can Demirdögen B, Öncel Torun Z, Erdem O, Çetinkaya S, Akay C. In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium Curr Oral Health Replevels in rats. *Eur J Oral Sci.* 2016;124(1):75–81.
 23. Denizot F., Lang R. .Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifcations to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immuno Methods*, 1986; 89: 271–277
 24. Eldeniz A, Shehata M, Högg C, Reichl F. DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. *Int Endod J.* 2016;49:1141–1151
 25. EndoSequence BC RRM. Brasseler USA Dental Instrumentation. Available at: <http://brasselerusadental.com/products/bc-rrm/>. Accessed August 16, 2015.
 26. El Sayed M, Saeed M. In vitro comparative study of sealing ability of Diadent BioAggregate and other root-end filling materials. *J Conserv Dent.* 2012;15(3):249-52.
 27. Evren OK, Altunsoy M, Tanriver M, Capar ID, Kalkan A, Gok T. Fracture resistance of simulated immature teeth after apexification with calcium silicate-based materials. *Eur J Dent.* 2016;10(2):188– 92.
 28. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. *J Endod.* 2018;44(7):1115-1120.
 29. Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny, M. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 2012;19(1), 107-120.
 30. Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L, Spagnuolo G. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials (Basel)*. 2020.10;13(9):2189
 31. Giraud, T., Jeanneau, C., Rombouts, C., Bakhtiar, H., Laurent, P., About, I. (2019). Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dental Materials*, 35(1), 24-35.
 32. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, et al. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 2011;37: 203–10.

33. Haapasalo M, Parhar M, Huang X, Wei X., Lin J, Shen Y. Clinical use of bioceramic materials. *Endodontic topics*, 2015;32(1), 97-117.
34. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 1998;15;41(4):511-8
35. Hirschman W, Wheeler M, Bringas J, Hoen M. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic repair putty. *J Endod* 2012;38:385-8.
36. Horvath, S. Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology*,1980;16(1), 59-66.
37. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(8):ZG01-ZG05.
38. Khalil W, Abunasef S. Can mineral trioxide aggregate and nanoparticulate endosequence root repair material produce injurious effects to rat subcutaneous tissue? *J Endod* 2015; 41:1151-1156
39. Khedmat S, Dehghan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar M, Dummer H. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restorative dentistry & endodontics*. 2014;39(3);149-154.
40. Kim S. *Color atlas of microsurgery in endodontics*. W.B. Saunders Company. Harcourt Health Sciences Company, 2001.
41. Kundzina R, Stangvaltaite L, Eriksen HM, Kerosuo E. Capping carious exposures in adults: a randomized controlled trial investigating mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2017;50(10):924-932.
42. Laurent P, Camps J, De Meo M, et al. Induction of specific cell responses to a Ca(3) SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater* 2008;24:1486-94.
43. Lee B, Hong J, Kim S, Jang J, Chang H, Hwang Y, Oh W. M. Anti-inflammatory and osteogenic effects of calcium silicate-based root canal sealers. *J Endod* 2019;45:73-8
44. Leiendecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod*. 2012;38(6):829-33 Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod*, 2000; 26:328-30.
45. Llanos-Carazas, M. Evolución de los cementos biocerámicos en endodoncia. *Conocimiento para el Desarrollo*, 2019;10(1), 151-162.
46. Lovato K, Sedgley C. Antibacterial activity of EndoSequence root repair material and ProRoot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*;37:1542-1546.
47. Ma J, Shen, Ya, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod* 2011;31:793-97.
48. Mallineni SK, Nuvvula S, Matinlinna JP, Yiu CK, King NM. Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *J Investig Clin Dent*. 2013 Feb;4(1):9-19.
49. Martinez-Torres A. C, Uscanga-Palomeque A. C, Rodríguez-Padilla, C. Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. *OmniaScience Monographs*, 2016.
50. Menyhárt O, Harami-Papp H, Sukumar S, Schäfer R, Magnani L, de Barrios O, Györffy B. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866(2):300-319.

51. Monteiro-Riviere N.A, Inman A.O, Zhang L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology Applied Pharmacology* , 2009; 234,(2),222-235.
52. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*, 1983; 65: 55–63.
53. Morales, R., Jacinto-Alemán, L. F., Portilla-Robertson, J., Mendoza-Espinosa, B. I., Tinajero-Morales C. Evaluation of the cytotoxicity of Biodentine, IRM and MTA in cultures of human periodontal ligament fibroblasts. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 2019;76(2), 72-76
54. Nagaraja Upadhya P, Kishore G. Glass ionomer cement: the different generations. *Trends Biomater Artif Organs* 2005;18:158–65.
55. Narváez, S. H., & Rodríguez, A. L. V. Biodentine: Un nuevo material en terapia pulpar/Biodentine: A New Material for Pulp Therapy. *Universitas Odontologica*, 2015;34(73), 69-76.
56. Niranjan B, Shashikiran ND, Dubey A, Singla S, Gupta N. Biodentine: a new novel bio-inductive material for treatment of traumatically injured tooth (single visit apexification). *J Clin Diagn Res*. 2016;10(9):ZJ03–4.
57. Oliveira, N. G., de Souza Araújo, P. R., da Silveira, M. T., Sobral, A. P. V., & de Vasconcelos Carvalho, M. Comparison of the biocompatibility of calcium silicate-based materials to mineral trioxide aggregate: Systematic review. *Eur J Dent*. 2018;12(2):317–326.
58. Osorio R, Hefti A, Vertucci, F, Shawley, A. L. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*, 1998;24(2), 91-96.
59. Özcan E, Çapar İD, Çetin AR, Tunçdemir AR, Aydınbelge HA. The effect of calcium silicate-based sealer on the push-out bond strength of fibre posts. *Aust Dent J*. 2012;57(2):166-70
60. Parinyaprom N, Nirunsittirat A, Chuveera P, Na Lampang S, Srisuwan T, Sastraruji T, Bua-On P, Simprasert S, Khoipanich I, Sutharaphan T, Theppimarn S, Ue-Srichai N, Tangtrakooljaroen W, Chompu-Inwai P. Outcomes of Direct Pulp Capping by Using Either ProRoot Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine in Permanent Teeth with Carious Pulp Exposure in 6- to 18-Year-Old Patients: A Randomized Controlled Trial. *J Endod*. 2018;44(3):341-348.
61. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregates and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part I: vital pulp therapy. *Int Endod J* 2017;51:177-205.
62. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010;36:400–13.
63. Pedano MS, Li X, Li S, Sun Z, Cokic SM, Putzeys E, Yoshihara K, Yoshida Y, Chen Z, Van Landuyt K, Van Meerbeek B. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells. *Dent Mater*. 2018 May;34(5):797-808.
64. Peters, O. A. Research that matters—biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int endod J*. 2012;46(3), 195-197.
65. Pinheiro LS, Iglesias JE, Boijink D, Mestieri LB, Poli Kopper PM, Figueiredo JAP, Grecca FS. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study. *J Endod*. 2018;44(7):1140-1145.

66. Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR, Grazziotin-Soares R, Ardenghi DM, Scarparo RK, Grecca FS, Kopper PMP. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig*. 2019 Mar;23(3):1359-1366.
67. Ree M, Schwartz R. Clinical applications of bioceramics materials in endodontics. *Endod Pract* 2014;7:32—40.
68. Restrepo Ospina, D. P, Medina, A. Reacciones adversas ocasionadas por los biomateriales usados en prostodoncia. *Avances en Odontoestomatología*, 2010;26(1), 19-30.
69. Rodríguez-Rey, Alexis, Noris-García, Elena, & Fundora Torres, María Teresa. Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2016;35(2), 184-194.
70. Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez MD, Meseguer L, Meseguer-Henarejos AB, Marín N, Martínez S, Moraleta JM. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov 1;17(6):e1062-7
71. Sahebi S, Moazami F, Sadat Shojaee N, Layeghneghad M. Comparison of MTA and CEM Cement Microleakage in Repairing Furcal Perforation, an In Vitro Study. *J Dent (Shiraz)*. 2013;14(1):31-6.
72. Sawyer AN, Nikonov SY, Pancio AK, et al. Effects of calcium silicate-based materials on the flexural properties of dentin. *J Endod* 2012;38:680–3.
73. Shahi S, Özcan M, Maleki Dizaj S, Sharifi S, Al-Haj Husain N, Eftekhari A, Ahmadian E. A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicol Mech Methods*. 2019;29(5):368-377.
74. Shi S, Bao ZF, Liu Y, Zhang DD, Chen X, Jiang LM, Zhong M. Comparison of in vivo dental pulp responses to capping with iRoot BP Plus and mineral trioxide aggregate. *IEJ* 2016;49:154–160.
75. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J*. 2017 Dec;50 Suppl 2:e120-e136.
76. Samyuktha V, Ravikumar P, Nagesh B, Ranganathan K, Jayaprakash T, Sayesh V. Cytotoxicity evaluation of root repair materials in human-cultured periodontal ligament fibroblasts. *Journal of conservative dentistry: JCD*. 2014;17(5), 467.
77. Silva LAB, Pieroni KAMG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Hernández-Gatón P, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, de Queiroz AM. Furcation Perforation: Periradicular Tissue Response to Biodentine as a Repair Material by Histopathologic and Indirect Immunofluorescence Analyses. *J Endod*. 2017 Jul;43(7):1137-1142.
78. S Silva LA, Barnett F, Pumarola-Suñé J, Cañadas PS, Nelson-Filho P, Silva RA. Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility in vivo. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1424-8.
79. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl Cell Res. PubMed*. 1988 Mar;175(1):184-91.
80. Tanomaru-Filho M, Torres F, Bosso-Martelo R, Chávez-Andrade G, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru J. A novel model for evaluating the flow of endodontic materials using micro-computed Tomography. *J Endod* 2017;43:796–800.
81. Tanomaru-Filho M, Torres F, Chávez-Andrade G, de Almeida M, Navarro L, Steier L, Guerreiro-Tanomaru J. Physicochemical properties and volumetric change of

- silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017;43:2097–2101
82. Tanomaru-Filho, Mario, Raqueli Viapiana, and Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru. "From MTA to new biomaterials based on calcium silicate." *Odvotos-International Journal of Dental Sciences* 18.1 2016; 18-22.
 83. Taylor TD, Morton Jr TH. Ulcerative lesions of the palate associated with removable partial denture castings. *J Prosthe Dent* 1991;66:213-21.
 84. Thermo Fisher Scientific Inc, Life Sciences, Cell viability. *The Molecular Probes Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling*, 2010, 11th Editio
 85. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, Castelo-Baz P, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e63-e72.
 86. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2018;44(1):126-132.
 87. Tomer, Anjali Miglani, Priyali Chauhan, Nidhi Malik and Anushree Gupta. Residual dentine thickness. *International Journal of Applied Dental Sciences* 2016; 2(4): 96-99
 88. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591–5.
 89. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J.* 2018;51:284-317.
 90. Tran D, He J, Glickman, G. N, Woodmansey, K. F. Comparative analysis of calcium silicate-based root filling materials using an open apex model. *Journal of endodontics*, 2016;42(4), 654-658.
 91. Trope M, Bunes A, Debelian G. Root filling material and techinis: Bioceramics a new hope? *Endod. Topics.* 2015;32:86-96
 92. Trope M, Barnett F, Sigurdsson A, Chivian N. The role of endodontics after dental traumatic injuries. In: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Pathways of the Pulp*. 11th ed. St. Louis: Mosby, Inc., 2016:769-773.
 93. Urrego, R. A., Pareja, A., Vásquez, N. A., Márquez, M. E. El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2005;18(3), 222-227.
 94. Veljović D, Čolić M, Kojić V, Bogdanović G, Kojić Z, Banjac A, Palcevskis E, Pretovic R, Janačković D. The effect of grain size on the biocompatibility, cell-materials interface, and mechanical properties of microwave-sintered bioceramics. *J. Biomed. Mater Res. A.* 2012;100(11), 3059-3070
 95. Vidal K, Martin G, Lozano O, Salas M, Trigueros J, Aguilar G. Apical closure in apexification: a review and case report of apexification treatment of an immature permanent tooth with Biodentine. *J Endod.* 2016;42(5):730–4.
 96. Wang Z, Ma J, Shen Y, Haapasalo M. Acidic pH weakens the microhardness and microstructure of three tricalcium silicate materials. *Int. Endod. J.* 2015; 48(4), 323-332.
 97. Wang, Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endodontic topics*, 2015. 32(1), 3-30.

98. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, et al. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. *J Endod* 2012;38:936–42.
99. Yepes Delgado FL, Castrillón Yepes CA. Calcium hydroxide as a clinical paradigm is surpassed by mineral trioxide aggregate(MTA).*Rev Fac Odontol Univ Antioquia*. diciembre de 2013; 25(1):176-207.
100. Young F.M., Phungtamdet W., Sanderson B.J. .Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicology In Vitro*,2005, 19(8):1051-9.
101. Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. *J Pak Med Assoc*. 2020 Mar;70(3):497-504
102. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013;39:478–83.
103. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod*. 2013;39(10):1281-6.

10. APÉNDICE

**INTERNATIONAL
ASSOCIATION FOR
DENTAL RESEARCH
IADR MEXICAN
DIVISION**



RECONOCIMIENTO A

JENNIFER ALONDRA BOCANEGRA CEDILLO

Por su destacada **Participación Académica** en el

Segundo Encuentro Académico en línea de la IADR
División Mexicana
de la International Association for Dental Research

con el tema: "Efecto citotóxico in vitro del biodentine, endosequence RRM y neomta
sobre fibroblastos gingivales humanos"

CDMX, 25 de mayo de 2021

**DRA. SOCORRO AÍDA
BORGES YÁÑEZ**

Presidenta IADR División Mexicana

**DRA. FABIOLA SALGADO
CHAVARRÍA**

Tesorera IADR División Mexicana

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Jennifer Alondra Bocanegra Cedillo

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Tesis: EFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DEL BIODENTINE, NEOMTA Y ENDOSEQUENCE BC RRM SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES Y CEMENTOBLASTOS HUMANOS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 21 de Agosto de 1996, hija de Jaime Bocanegra Hernández y Graciela Cedillo Castro.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2018 con mención honorífica por primer lugar en la generación y mérito académico.

Experiencia Profesional: Instructora de la unidad de aprendizaje de Bioquímica Pregrado en la Facultad de Odontología UANL 2014-2018.

PUBLICACIONES:

Alternative treatments to endodontic failure at different stages. International Journal of Applied Dental Sciences. 2020

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:

Reconocimiento por la participación en el segundo encuentro académico en línea de la IADR división mexicana de la International Association for Dental Research, 25 de mayo 2021.