

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, TIJUANA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



**“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL PRO ROOT,
BIODENTINE Y ENDOSEQUENCE RRM: ESTUDIO IN VITRO”**

Tesis que para obtener:
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA
SERGIO FERNANDO CUEVA CONTRERAS

DIRECTOR
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

MO MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO
SINODAL

DRA. MARIA NICOLASA RENTERÍA AGUILERA
SINODAL

Tijuana, Baja California

17 de Junio 2014

**“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL PRO ROOT,
BIODENTINE Y ENDOSEQUENCE RRM: ESTUDIO IN
VITRO”**

ALUMNO: SERGIO FERNANDO CUEVA CONTRERAS

DIRECTOR: ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ

CO DIRECTOR: DRA. TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS

ASESORES: DR. ALEXEI FEDOROVISH LICEA NAVARRO

Índice

I.	Resumen	4
II.	Introducción	5
III.	Marco Teórico	5
-	Descripción de materiales comerciales basados en el uso del Mineral Trióxido Agregado	9
-	ProRoot MTA	9
-	Biodentine	13
-	Endosequence RRM	16
-	Citotoxicidad	17
IV.	Justificación	22
V.	Planteamiento del problema	22
VI.	Hipótesis	23
VII.	Objetivo	23
VIII.	Variables	23
IX.	Material y metodología	
-	Tipo de estudio	24
-	Muestra	24
-	Universo de trabajo	24
-	Objeto del estudio	24

- Criterios de inclusión	24
- Criterios de exclusión	24
- Criterios de eliminación	24
- Materiales utilizados	25
- Metodología	25
- Ensayo de citotoxicidad en células L929	27
X. Análisis Estadístico	29
XI. Resultados	30
XII. Discusión	34
XIII. Conclusiones	35
XIV. Dedicatoria	37
XV. Agradecimientos	38
XVI. Bibliografía	41

RESUMEN

A lo largo del tiempo se han fabricado una gran cantidad de materiales dentales, con el fin de proveer mejores resultados durante la ejecución de los procedimientos odontológicos.

Hablando particularmente de cementos, cabe recalcar la trascendental importancia de la introducción del Mineral Trióxido Agregado al área de la odontología, conocido comercialmente como "ProRoot MTA". Este material, ha revolucionado diferentes campos del área clínica, debido a sus distintas propiedades y aplicaciones. Por lo que el ingreso de dicho cemento, ha promovido la generación de materiales más modernos; tales como el Biodentine y Endosequence RRM, ambos utilizan como principio activo el Mineral Trióxido Agregado (MTA). El cemento MTA, está conformado principalmente por partículas de silicato, sulfato y óxidos y es utilizado en diferentes tratamientos endodónticos por sus excelentes propiedades de sellado y su buen comportamiento a nivel clínico.

Se ha llevado a cabo la fabricación de nuevos cementos mediante la adición y eliminación de algunos componentes a fin de mejorar las propiedades del MTA.

Es por eso, de vital importancia, conocer, cual es el comportamiento de estos materiales al estar en contacto con los tejidos, para así determinar que biocompatibilidad ofrecen.

En el presente estudio, se realizaron pruebas de citotoxicidad utilizando fibroblastos murinos L929 y se analizó la proliferación celular al estar en contacto con los materiales estudiados en diferentes intervalos de tiempo. Para determinar así, cual cemento ofrece la mayor biocompatibilidad, entre ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM. Como control negativo, se utilizaron el Hidróxido de calcio puro y Dycal. Como control positivo, el medio de cultivo RPMI con 21,000 células sin presencia de material para permitir el crecimiento normal de los fibroblastos L929. Basándonos en nuestras pruebas de citotoxicidad, se concluyó que el cemento ProRoot ofreció el comportamiento más estable, en comparación al Biodentine y al Endosequence RRM según el análisis de los resultados obtenidos por espectrofotometría.

Introducción

La odontología es la parte de la medicina que se encarga de mantener la función y estética buco facial, utilizando como bases la prevención, el tratamiento y la conservación de los órganos dentarios.

Día a día cambia de conceptos e ideas; gracias a la gran variedad de investigación que se realiza en cada uno de sus campos. Es por eso que a la fecha representa una de las áreas mas importantes de las ciencias médicas y requiere la creación de distintas especialidades, para así enriquecer de manera específica cada uno de sus sectores.

La presente investigación pretende llevar su enfoque al campo de la endodoncia, enfocándose en la parte de materiales dentales y su efecto al estar en contacto con los tejidos.

A lo largo del tiempo se han fabricado una gran variedad de materiales, con el fin proporcionar una mayor comodidad para el operador y ofrecer propiedades físicas, químicas y biológicas cada vez más predecibles durante los tratamientos.

Hablando de materiales con multiples beneficios, cabe recalcar la introducción del Mineral Trióxido Agregado (MTA); desarrollado a inicios de los 90's por Mahmoud Torabinejad y [que ofrece](#) una serie de propiedades benéficas al campo de la Endodoncia.

Este material, consiste en partículas hidrofílicas a manera de gel, que al ser mezcladas alcanza un pH de 10.2 y al concluir su endurecimiento llega a un pH de 12.5 volviéndose un medio [básico que dificulta el crecimiento](#) bacteriano. Ofrece un tiempo de fraguado de 4 horas y alcanza su máxima resistencia a la compresión a los 21 días, ofreciendo 70 MPa, lo cual lo hace comparable al IRM® (Óxido de Zinc-Eugenol) y al SuperEBA® (Óxido de zinc-eugenol-ácido etoxibenzóico), pero significativamente menor a la amalgama (311 MPa) ^{(1) (2)}.

En 1993, Lee et al, publicaron el primer trabajo científico utilizando el MTA. Los autores inicialmente recomendaron su utilización como material para el sellado de comunicaciones entre el sistema de conductos radiculares, los tejidos periapicales y para obturar el extremo apical en la cirugía peri radicular (3).

Posterior a ello, se han realizado una serie de estudios, tanto in vitro como in vivo, todos con el propósito de evaluar el comportamiento físico, químico y biológico del MTA como material de obturación del extremo apical. En ellos queda demostrado que el MTA es superior a los otros materiales empleados con el mismo propósito, como los son la amalgama, IRM® y el SuperEBA® (1) (2).



Figura 1.- Formación de Cemento (C), posterior a la obturación con MTA en premolar mandibular limpio y conformado (Tinción tricromática de Masson), magnificación a 50aX. Cortesía del Dr. Shahrok Shabahang. Imagen utilizada por M. Torabinejad en el Journal of Endodontics Vol. 25, No. 3, MARCH 1999.

En la actualidad, se ha extendido su utilización en la terapia endodóntica a otras aplicaciones clínicas. Se le considera un excelente material para el sellado de perforaciones resultantes de resorciones internas y externas, además, en los dientes con ápices inmaduros, funciona exitosamente, tanto para preservar vital el tejido pulpar radicular, como en la apicoformación y para lograr una barrera apical que permita la obturación (1) (2) (3).

Debido a la naturaleza de las partículas hidrofílicas del polvo del MTA y su biocompatibilidad, puede emplearse en condiciones de humedad, razón por la cual es ampliamente utilizando en endodoncia (1) (2) (4).

El MTA es un material que se fabricó a partir del cemento Portland (Cemex). Posterior a varios años de investigación, en los cuales se llevaron a cabo procesos de eliminación de los componentes tóxicos para el organismo, tratando de perseguir una configuración mediante la cual se pudiera utilizar sin producir reacciones adversas al estar en contacto con el cuerpo.

A partir del MTA ProRoot, se han introducido otros materiales al mercado, tales como el MTA Angelus; el cual requiere de un menor tiempo para concluir su fase de fraguado, el Biodentine (Septodont); en el cual se cambió el tamaño de las partículas, se controló su pureza y disminuyó el contenido líquido, para acelerar su fraguado y darle mejores propiedades mecánicas, convirtiéndolo en un sustituto de la dentina; el Endosequence RRM (Brasseler); el cual ya no requiere el paso de mezclado polvo/líquido, ya que su fase de fraguado se activa al estar en contacto con el medio y además contiene componentes biocerámicos, el BC Sealer (Brasseler); el cual tiene un maleabilidad que lo vuelve bastante cómodo durante su utilización, teniendo una presentación y forma de manejo, tan sencilla, como la colocación de Cavit (3M Espe).

Toda esta evolución se ha presentado con el fin de mejorar las propiedades del MTA y ampliar la gama de tratamientos en los cuales puede ser utilizado (endodoncia, restauración, pediatría y cirugía) y por lo tanto facilitar la utilización para el odontólogo.

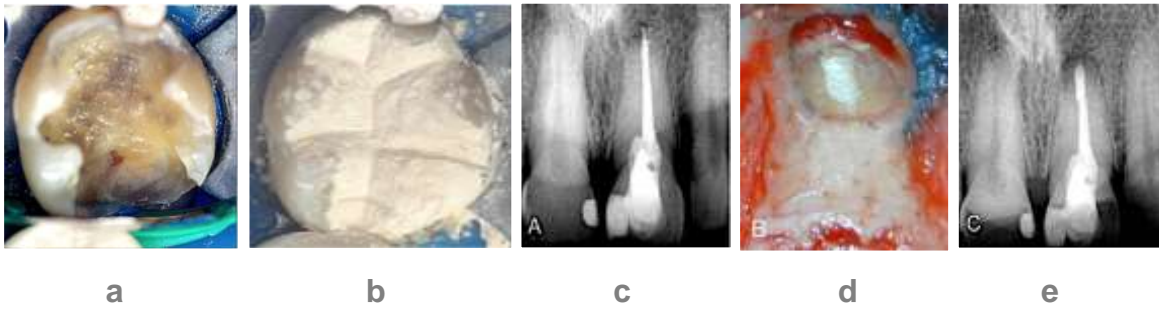


Figura 2.- (a) Comunicación pulpar, (b) Colocación de Biodentine, (c) Conducto sobre obturado, (d) Obturación retrograda, (e) Radiografía de obturación final.
 Imágenes de Cedillo J et al, revista RODY B, [Vol.](#) 2, No.2, May 2013.

En la endodoncia, el MTA ha demostrado ser un material efectivo y con múltiples utilidades, tales como recubrimientos pulpaes, sellado de perforaciones, apexificaciones, revascularizaciones, pulpotomias y retro obturaciones. Ofreciendo excelentes resultados en comparación a cementos utilizados previamente y a la vez mejorando el pronóstico para el paciente (2).



Figura 3.- (a) Dx. Falta de cierre de las paredes dentinarias, ocasionada por traumatismo, (b) Colocación de Mineral trióxido agregado. Endodoncia Especializada de Sergio Cueva & Astrid Gómez, Mayo 2014.

DESCRIPCIÓN DE MATERIALES COMERCIALES BASADOS EN EL USO DEL MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO

ProRoot Mineral Trióxido Agregado (MTA)

El Mineral [Trióxido Agregado](#) fue propuesto por Mahmoud Torabinejad a inicios de los 90 y lanzado por primera vez al mercado en el año de 1999.



Figura 4.- Presentación comercial del Mineral Trióxido Agregado ProRoot MTA.

Ha sido reconocido como un material de reparación de uso común y se compone de silicato tricálcico, aluminio tricálcico, óxido tricálcico y óxido de silicato, así como una pequeña cantidad de óxidos minerales, responsables de las propiedades físicas y químicas de este agregado, se le ha adicionado también óxido de bismuto que le proporciona la radiopacidad.

Fue desarrollado inicialmente como un material de obturación en el ápice radicular y posteriormente se ha utilizado para reparar perforaciones, como una barrera apical de los dientes con ápices abiertos, como un material de relleno del conducto radicular, para pulpotomía, para recubrimiento de la pulpa, y como

agente de sellado para retro obturaciones. Se trata de un material vocativo y biocompatible. Se ha demostrado que estimula la liberación de citocinas de las células óseas y que promueve activamente la formación de tejido duro (1) (2) (3).

El MTA es biocompatible, ya que libera Ca^{2+} y precipita Hidroxiapatita en presecencia de fluidos tisulares; por lo que juega un papel en la formación de nuevo tejido duro (2) (3).

El éxito clínico del MTA se debe a su naturaleza bioactiva. Sarkar (JOE 2005) cree que la actividad osteogénica del MTA se debe a la liberación de iones Ca^{2+} , que interactúan con los grupos fosfato en los alrededores del entorno biológico para formar la hidroxiapatita (2) (4).

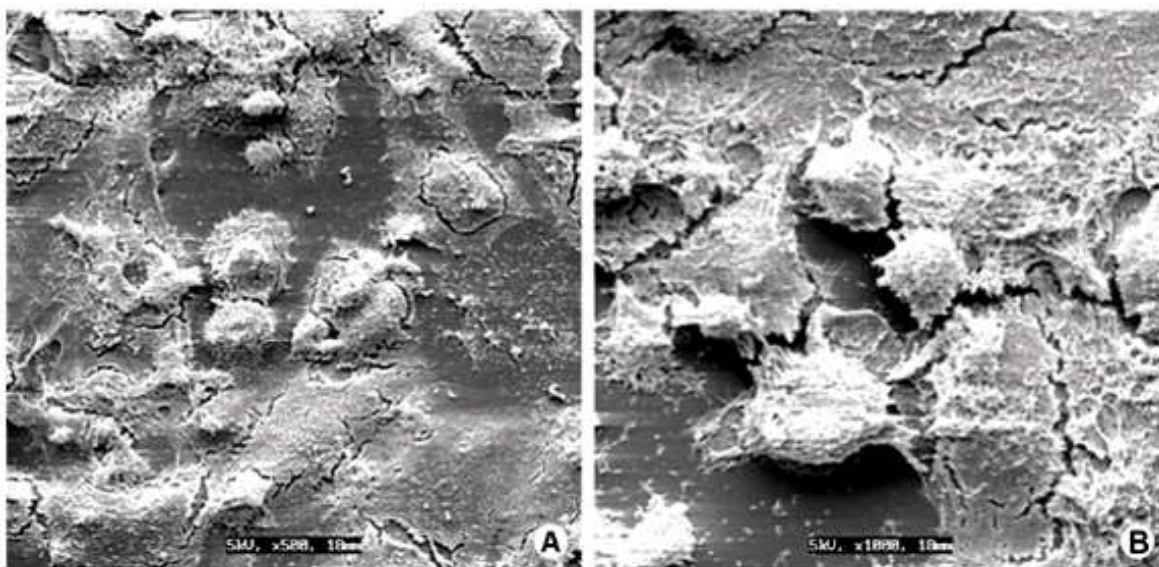


Figura 5.- (A) MTA blanco, (B) MTA gris, imágenes del Prof. Carlos Alberto de Souza Costa, Braz. Dent. J. vol.21 no.1 Ribeirão Preto Jan. 2010

Se conocen dos presentaciones el MTA: gris (GMTA) y el MTA blanco (WMTA), encontrando entre ellas diferencias que les permiten contar con características propias. El GMTA, tal vez tiene una mayor alcalinidad, que produce un mayor precipitado de cristal hidroxiapatita que el WMTA, propiedad que es importante para mejorar la formación de hueso/cemento (2) (3). La preocupación clínica es la tinción metálica del GMTA en las zonas de aplicación que afectan la

estética del paciente. El WMTA, carece de aluminato férrico tetracálcico el cual es encargado de la coloración en el GMTA (2).

Sakar et al. en el 2005, determinó que las precipitaciones sobre las superficies del MTA blanco y gris, parecen ser hidroxiapatita. Si la bioactividad del MTA es debido a la liberación de Ca^{2+} y el resultante de la formación de HA, esto sugiere que los dos tipos de MTA podrían ser utilizados indistintamente. Sin embargo, durante la elaboración de otros estudios se ha llegado a conclusión de reemplazar el GMTA debido a ser irregular, sus cristales cuboidales o áreas de material granular con características parecidas al coral, su color, mayor tiempo de trabajo, mayor filtración de bacterias (4).

El MTA es un material difícil de manejar debido a su consistencia granular. Presenta tiempo de fraguado lento y disolución; por esto se han realizado estudios para incorporarle aditivos, tratando de mejorar dos de sus características críticas que son la manipulación y el tiempo largo de fraguado pero sin afectar la biocompatibilidad :

- La metilcelulosa (MC), un ingrediente anti-washout (moldeabilidad).
- Cloruro de calcio (CaCl_2), un acelerador del tiempo de fraguado (incrementa).

La MC, se utiliza como aditivo para mejorar el rendimiento del cemento portland cuando se encuentra en un ambiente húmedo, aumentando la viscosidad y la resistencia a la dispersión. Concentraciones más altas de MC tienen la capacidad para atrapar el aire y retener mayores cantidades de H_2O , alterar la fuerza compresiva y retardar el fraguado. El CaCl_2 es consumido parcialmente durante la hidratación, reaccionando con el aluminato tricálcico y así forman cloroaluminato.

Concentraciones mayores al 2% de CaCl_2 afectan al cemento, aumentando el riesgo de contracción por secado y la reducción de resistencia a la fractura del

material. Todas las concentraciones de MC y las de MC/CaCl₂ mejoraron considerablemente las características de manipulación (2).

Características del Mineral Trióxido Agregado

- ❖ Biocompatible
- ❖ Excelente sellado a la microfiltración
- ❖ Buena adaptación marginal
- ❖ Regeneración tisular después de la primera semana
- ❖ Mayor duración
- ❖ Se observa como un cemento nuevo en la superficie del materias
- ❖ Elevado tiempo de trabajo
- ❖ Difícil manipulación
- ❖ Tiempo de fraguado 4 horas
- ❖ Basado en Cemento Portland

Utilidad del MTA

- ❖ Pulpotomias
- ❖ Apexificaciones
- ❖ Revascularizaciones
- ❖ Sellado de perforaciones
- ❖ Obturación de conductos radiculares
- ❖ Retro obturación

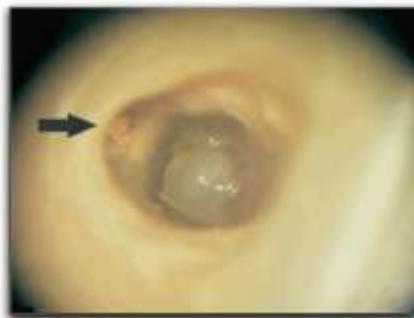


Figura 6.- Sellado de perforación utilizando ProRoot WMTA. Imagen del Dr. Carlos Bóveda, página de internet, www.carlosboveda.com

BIODENTINE (Septodont)

Los cementos de silicato de calcio utilizados hasta ahora, en reparaciones de perforaciones radiculares y del piso pulpar, en apexificaciones y obturación apical en endodoncia quirúrgica, en reparaciones de las resorciones internas y externas, están basados en los materiales del cemento Portland (75% silicato tricálcico: (3CaO-SiO_2) ; aluminato tricálcico: $(3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3)$; silicato dicálcico: (2CaO-SiO_2) ; Aluminato férrico tetracálcico: $(4\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-Fe}_2\text{O}_3)$; 20% óxido de bismuto: (Bi_2O_3) ; 4.4 % sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4\text{-2H}_2\text{O}$) y contienen bajas concentraciones de impurezas metálicas, provenientes de los minerales naturales utilizados como materia prima (1) (5).



Figura 7.- Presentación comercial del cemento Biodentine, de la casa Septodont.

Por lo que los desarrolladores de materiales dentales de la casa Septodont, han propuesto controlar cada paso de la formulación del material a partir de la pureza de las materias primas, produciendo así, su propio silicato de calcio, garantizando una mayor pureza del producto (5) (6).

Los rellenos sin reaccionar del silicato tricálcico son envueltos por capas del gel hidratado de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) el cual es impermeable al agua, de este modo atrasa los efectos de futuras reacciones. La química del agua trae consigo una alta biocompatibilidad, comparada con el cemento usado comúnmente en endodoncia basado en MTA (2). Este cemento tiene bajas propiedades mecánicas, principalmente por su componente de aluminio, el cual hace el producto frágil. En este cemento se controla la pureza del silicato de calcio, eliminando el aluminio y otras impurezas. Por tal motivo, incrementa las propiedades físico-químicas (endurecimiento rápido, alta dureza mecánica) (6).

Actualmente, los cementos dentales basados en silicato de calcio son reconocidos por su biocompatibilidad y por ser inductores de tejidos mineralizados (2), pero carecen de propiedades mecánicas y son difíciles de manipular (7). La principal mejoría realizada en Biodentine fue orientada a desarrollar un material basado en silicato de calcio, con propiedades superiores a los ya existentes en relación al tiempo de fraguado, propiedades mecánicas y manipulación (3) (4) (6).

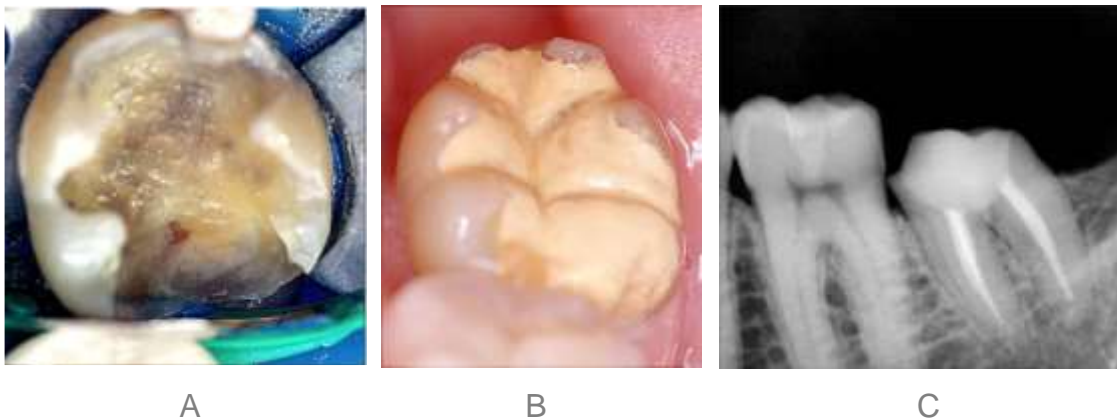


Figura 8.- (A) Comunicación pulpar, (B) Restauración después de dos semanas, (C) Radiografía con el cemento condensado. Imágenes de Cedillo J et al, revista RODY B, Vol. 2, No.2, Mayo 2013.

Este cemento reúne grandes propiedades mecánicas, es de fácil manipulación y tiene una excelente biocompatibilidad, lo que lo hace un material indicado tanto para restauraciones, como para procedimientos endodónticos (6).

Biodentine tiene un tiempo de fraguado inicial, superior a 6 minutos y un tiempo de fraguado final de 10-12 minutos. Esta mejoría en el tiempo, se logró como resultado de la combinación de diferentes efectos: el tamaño de las partículas, ya que a mayor superficie es más corto el tiempo de fraguado; la adición de cloruro de calcio al líquido, que acelera la reacción y la disminución del contenido líquido, que reduce el tiempo de fraguado ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾.

Una de las principales desventajas de los cementos ya existentes en base a silicato de calcio, son las bajas propiedades mecánicas, debido a la presencia de componentes como los aluminatos, que finalmente determinan la fragilidad del producto. Un segundo eje fue lograr un bajo nivel de porosidad, debido a que una menor porosidad determina una mayor resistencia mecánica. Para ello, se incorporó al contenido líquido, un agente reductor de agua, que corresponde al polímero hidrosoluble, cuya función es mantener el balance entre el contenido del agua y la consistencia de la mezcla. Estas características hacen a Biodentine, un excelente sustituto de la dentina y un material ideal para ser utilizado en restauraciones, ya que su resistencia mecánica puede llegar a 300 MPa en un mes ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾.

Según los estudios clínicos realizados con Biodentine ®, este cemento no es citotóxico, mutagénico, sensibilizante o irritante. Por lo tanto, es un material seguro para su uso en clínica, teniendo al menos una biocompatibilidad equivalente al MTA ⁽¹⁰⁾.

Estudios clínicos realizados por About en el 2007, muestran que el uso del Biodentine en contacto directo con el tejido pulpar, induce el desarrollo de dentina reparativa (primer signo de formación de puente dentinario), manteniendo la vitalidad pulpar. Según estos estudios, se puede concluir que Biodentine es capaz de estimular la iniciación y desarrollo de mineralización, haciéndolo comparable con el MTA. Otro estudio evaluó el comportamiento de Biodentine en recubrimientos pulpares indirectos, demostrando que existe formación de dentina reaccionaria, llegando a estabilizarse en un período de tres meses ⁽²⁾ ⁽¹¹⁾.

Como resultado a toda esta serie de investigaciones, experimentos y pruebas, el Biodentine esta indicado en casos de: a) recubrimiento pulpar directo seguido de una exposición pulpar por caries, b) recubrimiento pulpar directo seguido de un traumatismo dentoalveolar, c) reparación de perforaciones en canales radiculares o piso de cámara pulpar, d) cirugía endodóntica retrógrada, e) pulpotomía en molares temporales y f) apexificación ⁽²⁾ ⁽⁶⁾.

Por lo que se considera una alternativa con mejores propiedades en todos los sentidos, en comparación al Pro Root MTA.

ENDOSEQUENCE RRM (Brasseler)



Figura 9.- Presentación comercial del Endosequence RRM (Brasseler).

Es un material biocerámico, que se compone principalmente de silicatos de calcio, fosfato de calcio monobásico y óxido de zirconio. De acuerdo a la fabricación, el Endosequence RRM (ERRM) es hidrófilo y radiopaco; tiene un pH alto, lo que le confiere algunas propiedades antimicrobianas. Se presenta en 2 consistencias premezclados: fluido en una jeringa y en una masilla ⁽¹¹⁾.

Los materiales presentan una unión mecánica en ajuste como consecuencia del tamaño mínimo de las moléculas, que permiten que las partículas de ERRM penetren en los túbulos dentinales.

El material se coloca en presencia de humedad, no se contrae, y tiene un tiempo de trabajo de 30 minutos. El conjunto final puede tardar hasta 12 horas ⁽¹²⁾.

El ERRM está indicado para tratamientos como Pulpotomías, Apexificaciones, Cirugía endodóntica, Revascularizaciones, Sellado de perforaciones y obturación de conductos radiculares.

Según algunos estudios, se ha demostrado una excelente biocompatibilidad y un nivel de citotoxicidad similar entre los cementos que se compararán en el presente estudio ⁽¹²⁾ ⁽¹³⁾.

CITOTOXICIDAD

Es importante mencionar que cualquier nuevo material que se proponga introducir a nivel clínico, deberá cumplir con ciertos estándares, pruebas y a la vez haber pasado por los 3 niveles de investigación (in vitro, animales e in vivo), comprobándose así su buen comportamiento con el organismo y su efectividad.

Una de las pruebas más importantes antes de utilizar un nuevo material, además de las pruebas de eficacia clínica, es la evaluación de citotoxicidad, ya que éste [resultado](#) da pauta para poder integrarlo a la variedad de medicamentos biocompatibles, disponibles para uso médico.



Se le considera Citotoxicidad a la cualidad de alguna sustancia, partícula o elemento que al estar en contacto con tejido produce alteración o daño celular.

La citotoxicidad celular constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario,

consistente en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas ⁽¹⁴⁾.

Este mecanismo de respuesta interviene en la defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas, así como en la destrucción de células alogénicas en trasplante de órganos. Se consideran como prototipos de las células especializadas en dicha función a una subpoblación de linfocitos T citotóxicos (T_c, CTL o cytotoxic T lymphocyte) y a las células natural killer (NK) ⁽¹⁴⁾.

El desarrollo de los biomateriales, considerando el sensible ambiente biológico al que están destinados, requiere conocimientos de todos los campos de las ciencias naturales y de los métodos de manufactura. La evaluación citotóxica es uno de los estudios in vitro más comúnmente usados para determinar la bicompatibilidad de un material y presenta una correspondencia del 97% con los ensayos de implantación. Es un estudio simple, rápido y económico que proporciona una valiosa información de los materiales que deben ser descartados o aquellos que deben ser sometidos a más estudios ⁽¹⁴⁾.

Se han empleado muchos métodos para determinar la citotoxicidad de los biomateriales y equipos médicos implantables. Estos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño por muerte celular. Las pruebas de citotoxicidad empleadas con mayor frecuencia incluyen: citotoxicidad por contacto directo (tinción con colorantes vitales y liberación de cromo radiactivo) e indirecto (extendido en agar, elución de extractos, método de filtro mili poro, tipos celulares y fibroblastos) ^{(14) (15)}.

La citotoxicidad de un material de obturación apical se evalúa generalmente utilizando tres pasos: 1) se investiga el material, utilizando una serie de ensayos de citotoxicidad in vitro, 2) determinar que el material no es citotóxico in vivo, se puede implantar en el tejido subcutáneo o el músculo y se evalúa la reacción tisular local. 3) la reacción in vivo del tejido blanco versus el material de prueba se debe evaluar en sujetos humanos o animales. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad in vitro pueden no correlacionarse con los obtenidos in vivo. Sin embargo, se puede asegurar que, si un material de prueba induce constantemente

una fuerte reacción citotóxica en las pruebas de cultivo celular, es muy probable que también ejerza toxicidad en el tejido vivo ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾.

El MTA tanto fresco como fraguado, es significativamente menos tóxico que el Super EBA y el IRM en todas sus fases, conclusión que se desprende cuando se analiza utilizando métodos de extendido en agar y la liberación de [cromo](#) radioactivo ⁽¹⁷⁾.

En otro estudio realizado por Osorio y col. (1998) donde se midió la citotoxicidad de algunos selladores de conductos radiculares, Endomet, CRCS y AH26 y de los materiales de obturación apical a retro: amalgama, Gallium GF2, Ketac Silver, MTA y Super EBA, se corrobora el bajo grado de citotoxicidad que presenta el MTA en comparación con los otros materiales utilizados en esta investigación ⁽¹⁶⁾.

Debido a la limitación de las pruebas de citotoxicidad, se recomiendan las técnicas de implantación subcutánea in vivo e intraósea en pequeños animales de laboratorio [\(Friend y Browne \(1969\); Langeland \(1975\) y Spångberg \(1990\) citados por Torabinejad y Pitt Ford \(1996\)\)](#) ⁽²⁾.

Los resultados de los estudios de implantación muestran que los materiales de obturación causan inicialmente inflamación y se vuelven más biocompatibles con el envejecimiento; como resultado del trauma quirúrgico y también a la liberación de sustancias antigénicas de estos materiales ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾.

En un estudio realizado por Torabinejad y colaboradores en 1998, donde examinan la reacción ósea ante la implantación del MTA, amalgama, IRM y Super EBA en tibias y mandíbulas de cobayos; el MTA presentó la respuesta histológica más favorable. Ellos afirman que la ausencia de inflamación, junto con la gran incidencia de formación de tejido duro alrededor de los implantes con MTA, evidencian la biocompatibilidad del mismo y corroboran los resultados de investigaciones previas sobre el MTA, cuando es utilizado como material de obturación retrógrada ⁽²⁾, y como material para recubrimiento pulpar directo (Pitt Ford y col. [1996](#)).

En otro estudio realizado por Holland y col. (1999), ⁽²¹⁾ se evaluó la reacción del tejido conjuntivo subcutáneo en ratas, ante la implantación de conductos radiculares obturados con MTA e hidróxido de calcio. En este experimento se observan cristales y un tejido calcificado que asemeja una barrera en la entrada de los túbulos. Esta deposición de cristales dentro de los túbulos dentinarios podrían ser responsables de la menor permeabilidad de la dentina, descrito por Pashley y col. (1986) ⁽²²⁾, después del empleo del hidróxido de calcio (Holland y col. 1999). Los mismos resultados reportados para el hidróxido de calcio se observan con el MTA en este experimento. Este fenómeno se sucede y sabemos que el MTA no contiene hidróxido de calcio en su composición ⁽²¹⁾.

De acuerdo con Lee y col. (1993), los componentes principales presentes en el MTA son silicato tricálcico, aluminio tricálcico, óxido tricálcico, y óxido de silicato. Además de los trióxidos, hay algunos otros óxidos minerales que son responsables de las propiedades químicas y físicas de este agregado mineral. Así, el MTA no tiene hidróxido de calcio, pero contiene óxido de calcio que al reaccionar con los fluidos tisulares puede formar hidróxido de calcio, *in situ* ⁽²³⁾.

Es posible que el mecanismo de acción del MTA, por el cual estimula la deposición de tejido duro, tenga alguna similitud con el del hidróxido de calcio. Es necesario continuar con las investigaciones para confirmar los datos observados ⁽²⁴⁾.

Un material ideal de obturación apical debe ser dimensionalmente estable, y no mutagénico (Gartner y Dorn 1980). Kettering y Torabinejad, (1995), realizaron un estudio para evaluar el potencial mutagénico del IRM, Super EBA y MTA utilizando la Prueba de Ames. Los resultados demuestran que el MTA, IRM y Super EBA, no son mutagénicos ⁽²⁾ ⁽²⁵⁾.

Una de las pruebas más determinantes para poder lanzar un medicamento al mercado es el análisis de citotoxicidad. El cual puede llevarse a cabo, de acuerdo al protocolo preferencial de cada investigador. Una gran cantidad de investigadores se han encargado de determinar la citotoxicidad producida por

medicamentos como los utilizados en el presente estudio; entre los cuales destacan:

Hui-min Zhou et. al. (2013); compararon el grado de citotoxicidad producido entre el Biodentine, Mineral Trióxido Agregado Blanco (MTA) y cemento de ionómero vítrio. Encontrando que tanto el Biodentine como el MTA demostraron una viabilidad similar y menor grado de citotoxicidad en comparación al Cemento ionomérico GC Fuji ⁽²⁶⁾.

Silva et. al. (2013), evaluaron la citotoxicidad producida por los cementos AH Plus y MTA Fillapex, encontrando que el cemento AH Plus al momento de su colocación produce citotoxicidad moderada, reduciéndose a la mitad a los 7 días y sin evidencia de citotoxicidad a las 2 semanas, mientras que el MTA Fillapex demostró altos niveles de citotoxicidad durante todo el experimento ⁽²⁷⁾.

Merdad et. al. (2007) utilizó algunos cementos de obturación, colocándolos sobre filtros mili poro en contacto directo e indirecto con células para así observar la reacción durante determinados intervalos de tiempo, encontrando que no hay una diferencia significativa en el grado de producción e citotoxicidad al comparar el AH Plus y Guttapercha con el sistema Epihaphany y Resilon ⁽²⁸⁾.

Beth et. al. (2011) llevaron a cabo un estudio de citotoxicidad en 4 tipos de cementos destinados al mismo fin (MTA ProRoot, MTA-Angelus, Endosequence RRM y Endosequence RR); para esto utilizaron fibroblastos en medio de cultivo, buscando resultados en un margen de 24hrs. Finalmente encontraron que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre los 4 cementos empleados ⁽²⁹⁾.

Entre las características ideales que debe cumplir un material a utilizar se encuentran: 1) la capacidad de adherirse a la dentina, 2) mantener un sellado hermético, 3) que sea insoluble en los fluidos del tejido, 4) dimensionalmente estable, 5) no reabsorbible en el tiempo, 6) radiopaco, 7) de fácil manipulación, 8)

tiempo de trabajo adecuado, 9) tiempo de fraguado rápido, y 10) sobre todo biocompatible con el tejido humano. Debido a que en muchos procedimientos de endodoncia necesariamente debe colocarse el material directamente sobre los tejidos de la pulpa o bien en contacto directo con los tejido periapicales con el objetivo de promover la curación y devolver la función a los dientes, es necesario que el material no sea tóxico para los tejidos pulpares y periapicales.

Justificación

Como se mencionó anteriormente es muy importante verificar la biocompatibilidad de los materiales que van a ser empleados en los tejidos.

El presente estudio, mediante experimentación *in vitro*, pretende comparar la Citotoxicidad de 3 materiales basados en el mineral trióxido agregado, para determinar así cual material, entre MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM, produce el menor grado de alteración en los tejidos orgánicos, bajo la identificación de la reacción desencadenada a nivel celular.

Mediante pruebas de citotoxicidad, se pretende evaluar la viabilidad celular en contacto con los cementos ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM; que se medirá utilizando la técnica cultivo de fibroblastos murinos L929; para así observar respuesta después de 24hrs.

Planteamiento del Problema

El MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM, han demostrado, según la literatura e investigaciones recientes, excelentes resultados tanto a nivel clínico como radiográfico. Sin embargo, es importante considerar si existe algún riesgo de producir daño al entrar en contacto con los tejidos.

Hipótesis

Ho.- No existe una diferencia en la citotoxicidad entre los materiales MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM.

H1.- Existe una diferencia en la citotoxicidad entre los materiales MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM.

Objetivo general

Determinar cuál material produce mayor citotoxicidad entre MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la citotoxicidad in vitro de los materiales MTA ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM empleando fibroblastos murinos L929.
- 2.- Analizar la morfología celular de los FL929 crecidos en presencia de los materiales ProRoot, Biodentine y Endosequence RRM.
- 3.- Analizar la capacidad de regeneración celular, posterior al contacto con los cementos.

Variables independientes

MTA ProRoot

Biodentine

Endosequence RRM

Variable dependiente

Citotoxicidad

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Estudio

Experimental, Longitudinal.

Muestra

Cajas Petri con fibroblastos L929 y medio de cultivo RPMI

Universo de trabajo

192 pozos para cultivo celular

Objeto del estudio

Encontrar el material que ofrezca mayor biocompatibilidad.

Criterios de inclusión

- Línea celular de murinos L929
- Cementos en estado estéril
- Cementos, tinciones y medios de cultivo vigentes

Criterios de exclusión

- Líneas celulares en crio preservas muertas
- Materiales a investigar vencidos
- Sustancias contaminadas previas a su manejo

Criterios de eliminación

- Muestras contaminadas durante el protocolo
- Líneas celulares muertas ó contaminadas durante el proceso de transporte
- Líneas celulares muertas durante la tripsinización

Metodología

**Desarrollada en el Centro de Investigación Científica y Educación Superior
de Ensenada (CICESE)**

Materiales utilizados.

- 1.- Células de fibrosarcoma de ratón L929 (ATCC)
- 2.- Placas de cultivo celular de 75 cm² (Cell Growth, CORNING)
- 3.- Medio de cultivo RPMI (Cell Growth, CORNING)
- 4.- Suero de caballo al 10% (Cell Growth, CORNING)
- 5.- PBS 1X sin Mg²⁺ y Ca²⁺ (Cell Growth, CORNING)
- 6.- Tripsina-EDTA 1 mM (CORNING)
- 7.- Azul tripano al 0.4%
- 8.- Cámara de Neubauer (Invitrogen)
- 9.- Centrifuga 5810R (EPPENDORF)
- 10.- Amalgamador (SEMADI)
- 11.- Placas de 96 posos (CORSAR)
- 12.- Pesa (METTLER TOLEDO)
- 13.- Lozetas de vidrio (Kerr)
- 14.- ProRoot MTA (Dentsply)
- 15.- Biodentine (Septodont)
- 16.- Endosequence RRM (Brasseler)
- 17.- Hidróxido de Calcio (Dentsply)
- 18.- Dycal (Dentsply)
- 19.- Estufa de cultivo (YWR)
- 20.- Refrigerador (THERMO SCIENTIFIC)
- 21.- Campana de flujo laminar (Logic)
- 22.- Lysol IC (Lysol)
- 23.- Microscópio óptico invertido (EVOS XL)
- 24.- Solución fisiológica

- 25.- Agua bidestilada
- 26.- Micropipetas (POSEIDON)
- 27.- Cámara de Neubauer (Invitrogen)
- 28.- Microscopio óptico invertido (Life)
- 29.- Cubre objetos (Invitrogen)
- 30.- Pipeta / micropipeta con puntas (Invitrogen)
- 31.- Buffer para diluciones (PBS)
- 32.- Colorante DMS (Promega)
- 33.- Colorante Azul Tripano (Promega)
- 34.- Tubos Corning (Corning)
- 35.- USB´s (Life)
- 36.- PC (Microsoft)
- 37.- MacBook Air (Apple)
- 38.- Mini Mac (Apple)
- 39.- MacBook Pro (Apple)
- 40.- Imac G6 (Apple)
- 41.- MacPro G7 (Apple)
- 42.- Lector de DNA/RNA Smart Spec 3000 (BIORAD)
- 43.- Centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- 44.- Ethanol
- 45.- Cloro al 10%
- 46.- Lector de placas de Elisa Epoch (Biotek)
- 47.- Reactivo MTT (Promega)
- 48.- Reactivo MTS (Promega)

Ensayo de citotoxicidad en células L929.

Se emplearon fibroblastos L929 almacenados previamente en placas Petri de 75 cm² (Cell Growth, CORNING), incubados con 5% de CO₂ a 37° C en atmósfera húmeda, hasta formar una monocapa. Posterior a esto, mediante un proceso de tripsinización (Cell Growth, CORNING), se realizaron pasajes celulares para después utilizarlos en el presente experimento en nuevas placas de cultivo con medio RPMI (Cell Growth, CORNING).

Mediante la utilización de la cámara de Neubauer se llevo a cabo una estimación de la

cantidad de unidades disponibles, resultando un total de 21,000 células para cada pozo. Al mismo tiempo, se llevó a cabo la colocación de los cementos en 2 placas de 96 pozos (Corsar), preparados de acuerdo a las indicaciones de cada fabricante y manejando la siguiente disposición: en la placa 1, se utilizó la línea A

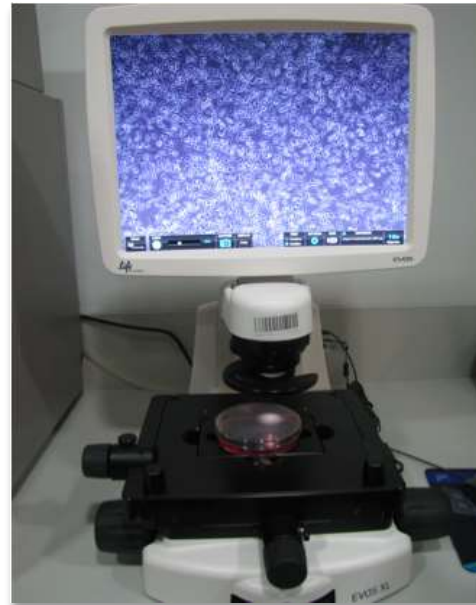


Figura 10.- Microscopio óptico invertido (EVOS XL).

para el ProRoot (A1-A12), la línea B para el Biodentine (B1-B12), la línea C para el Endosequence RRM (C1-C12), línea D para el Hidróxido de Calcio (D1-D12) y la línea E para el Dycal (E1-E12). En la placa 2, se utilizó la línea B para el ProRoot (B2-B10), la línea C para el Biodentine (C2-C10), la línea D para el Endosequence

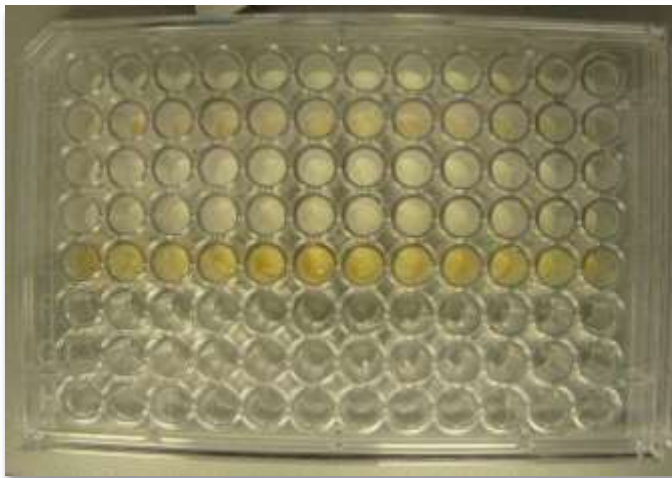


Figura 11.- Placa CORSAR de 96 pozos con los cementos a experimentar y controles.

RRM (D2-D10), la línea E para el Hidróxido de Calcio (E2-E10), la línea F para el Dycal (F2-F10) y la línea G para controles positivo; utilizando medio de cultivo RPMI con células (G2-G4) y negativo; utilizando DMSO (G5-G7).

Por lo que entre ambas placas resultó un total de 21 pozos para cada cemento, colocados a manera de triplicado para cada uno de los tiempos a investigar t0 (2 hrs), t1 (4 hrs), t2 (6 hrs), t3 (24 hrs) y t4 (36 hrs).



Figura 12.- Placa CORSAR conteniendo los cementos con el reactor MTS, listos para el análisis.

Ya concluida la instalación de los cementos, se colocaron las placas en la campana de flujo laminar con UV durante 8hrs, para mantener la esterilidad de los materiales. Posteriormente, se colocaron 21,000 células por pozo. Agregando a esto el reactivo MTS (Promega) a los siguientes tiempos: 0, 2, 6, 24 y 36 hrs. Para posteriormente llevar a cabo lecturas

con el lector de placas.

Como control positivo, se emplearon células con medio RPMI que crecieron directamente en el pozo y como control negativo se emplearon células tratadas con 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). Finalmente, obteniendo resultados basados en el nivel de intensidad de color leído y decifrado por el lector de placas.

Posterior al chequeo de placas, se tomaron muestras triplicadas de t5, manejando el método de tripsinización y colocando los paquetes celulares con medio de cultivo en tubos de Corning. Los cuales a la vez fueron analizados bajo microscopio invertido (Evos) al tiempo cero y a las 24 hrs con el fin de determinar el poder de regeneración de las células correspondientes a cada uno de los cementos, recopilando todos los datos obtenidos en una matriz de datos.



Figura 13.- Lector de placas de ELISA (Epoch)

Análisis Estadístico:

Con base a la utilización del análisis de varianza Anova, mediante el uso de medianas para realizar las debidas comparaciones, obtuvimos los siguientes datos:

One Way Analysis of Variance		miércoles, octubre 08, 2014, 12:57:47 p. m.			
Data source: Data 2 in Datos Sergio Odontologia sep 2014					
Normality Test (Shapiro-Wilk)	Passed	(P = 0.607)			
Equal Variance Test:	Passed	(P = 0.224)			
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ProRoot	4	0	2.433	0.522	0.261
Biodentine	4	0	2.235	1.22	0.61
Endos RRM	4	0	1.837	0.885	0.443
Dycal	4	0	0.784	0.123	0.0615
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	6.489	2.163	3.38	0.054
Residual	12	7.68	0.64		
Total	15	14.169			

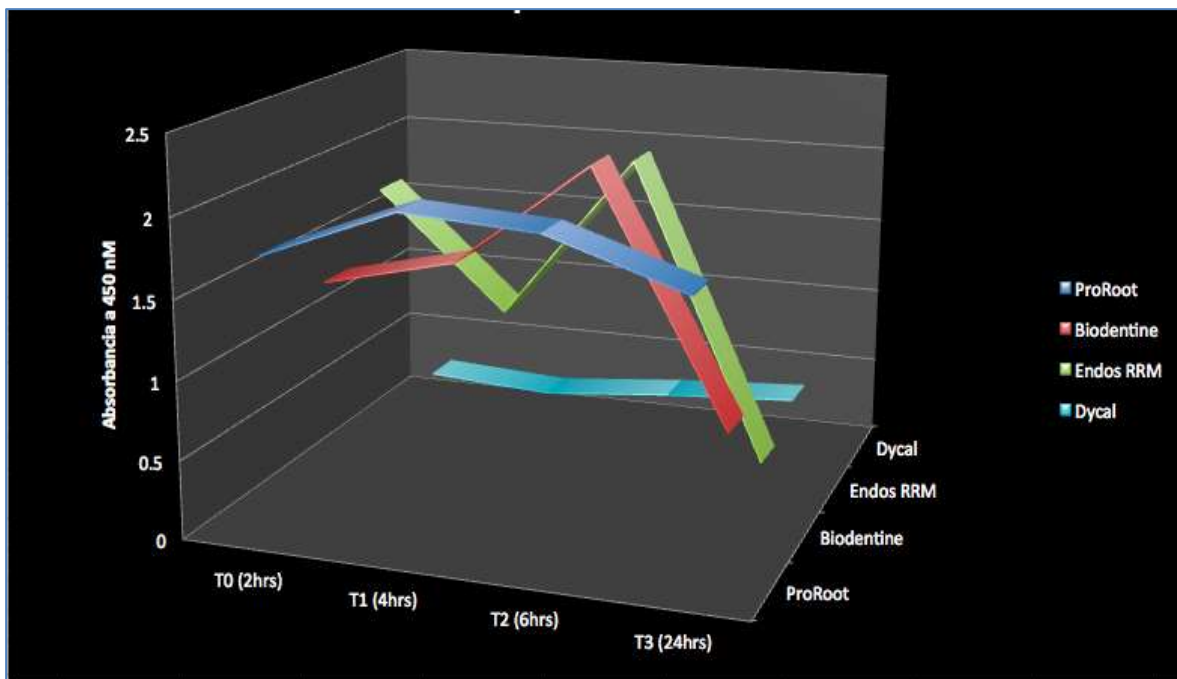
Las diferencias de los valores entre los grupos de tratamiento no son suficientemente grandes, para excluir la posibilidad que la diferencia es debido a la variabilidad de muestreo arbitraria, por lo que se concluye que no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.054$).

Resultados:

Promedio de triplicados

	ProRoot	Biodentine	Endos RRM	Dycal
T0 (2hrs)	1.7453333	1.367	1.7883333	0.246
T1 (4hrs)	2.078	1.569	1.025	0.198
T2 (6hrs)	2.025	2.2413333	2.101	0.2803333
T3 (24hrs)	1.7446667	0.6676667	0.183	0.338

Tasa de proliferación celular



Durante las primeras 4hrs (T0 y T1), encontramos un comportamiento muy estable en los 3 materiales a estudiar, siendo hasta las 6hrs (T2) cuando todos demostraron un pico de biocompatibilidad, llegando a un nivel entre 2.5 y 3 en la escala de absorbancia a 450nm (del 0 al 4). Siendo a las 24hrs (T3) cuando se

despliega una inhibición exagerada de crecimiento celular por parte del Biodentine y Endosequence RRM, mientras que el ProRoot continuo ofreciendo un comportamiento bastante estable.

Respecto a los controles negativos, el Dycal ofreció un comportamiento muy estable durante todo el experimento, inhibiendo perfectamente el crecimiento celular, mientras que el Ca(OH)_2 , ofreció un comportamiento inesperado; situación por la cual, se omitió al momento de colocar resultados en la tabla y la gráfica. Encontrando y determinando tanto al Biodentine como al Endosequence RRM con una citotoxicidad similar.

Cabe mencionar, que durante la utilización del lector de placas de Elisa, se utilizaron como controles de calibración RPMI con células para control positivo y RPMI con células y DMSO para control negativo.

Durante el T4 (36hrs), tanto el Biodentine como el Endosequence RRM desplegaron un elevado índice de proliferación celular, situación que se omitió al momento de colocar y graficar resultados, debido a que bajo la utilización del MOI confirmamos la ausencia de células. Situación por la cual, sospechamos que hubo una interacción entre los materiales y el reactivo, dando falso positivo.

Otra situación a considerar fue al momento de realizar el análisis estadístico, en el cual se utilizaron medianas para realizar la comparación de los materiales, debido a que durante el análisis de las absorbancias en los T0, T1, T2 y T3 existieron algunas diferencias marcadas dentro de los mismos triplicados, lo cual impidió la utilización de medias, considerando la magnitud de la desviación estándar.

ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA

(0-24Hrs)

Las muestras correspondientes al T4 (36hrs), fueron utilizadas para hacer un análisis referente a la morfología celular, el cual se realizó tripsinizando los especímenes y agregándoles nuevo medio de cultivo, para posteriormente ser observados al MOI en el momento de la tripsinización (Tiempo cero) y a las 24hrs, encontrando los siguientes resultados:

Morfología L929	
ProRoot	Excelente crecimiento, forma natural
Biodentine	Sin presencia de células
Endosequence RRM	Sin presencia de células
Ca(OH) ₂	Células muertas, contraídas, deformes
Dycal	Pérdida de integridad de la membrana, deformes

CAPACIDAD DE REGENERACIÓN CELULAR

(0-24Hrs)

Con los especímenes del T5, realizamos el mismo proceso con la finalidad de observar la capacidad de las células, de regenerarse, posterior a haber estado por un periodo de 36hrs con los cementos.

Regeneración Celular FL929	
ProRoot	✓✓✓
Biodentine	X
Endosequence RRM	X
Ca(OH) ₂	X
Dycal	X

Según el ensayo de regeneración celular, realizado bajo microscopio óptico invertido EVOS, encontramos poder de regeneración celular únicamente en el cemento ProRoot. En el Biodentine, encontramos la presencia de cristales correspondientes a la composición del mismo y en el Endosquence RRM sospechamos de un posible desprendimiento del material, pero sin presencia de células. Respecto a los controles negativos Dycal y Ca(OH)_2 observamos muerte celular posterior a las 24 hrs de haber agregado el RPMI, ofreciendo el resultado esperado al ser utilizados ambos cementos como control negativo.

Determinando al material ProRoot como el mas biocompatible durante todos los ensayos.

Discusión:

Los materiales utilizados en endodoncia frecuentemente son colocados en contacto directo con el tejido periodontal. Esto es particularmente cierto para los materiales usados como selladores de obturación retrógrada. Por lo que es esencial que los cementos, además de cumplir con otras demandas propias de los mismos, no sean tóxicos sino biocompatibles para los tejidos periodontales. (30)

El potencial citotóxico es uno de los parámetros más comúnmente usado en estudios in vitro para determinar el grado de biocompatibilidad de un material sellador endodóntico. Por lo general se trata de pruebas simples y rápidas por medio de las cuales se obtienen resultados cuantificables y por lo tanto valiosos para poder evaluar la posibilidad de uso clínico de un material determinado. Diversos métodos de cultivos celulares como la observación de la inhibición del crecimiento celular, pruebas de permeabilidad de la membrana celular, pruebas de actividad enzimática o el registro de injuria y/o muerte celular han sido usados para determinar la citotoxicidad de distintos materiales dentales. (31) (32)

En el 2011 Beth Ann et al, realizaron un estudio, en el cual determinaron que en un lapso de 24 horas los cementos ProRoot, Angelus, EndoSequence RRM y EndoSequence RR Putty ofrecen una viabilidad igual o mayor al 91.8%, concluyendo que no existe una diferencia significativa entre ninguno de los cementos. Situación con la cual quedamos en absoluta controversia, debido a que en nuestro ensayo encontramos una diferencia bastante marcada entre el ProRoot y el Endosequence RRM.

Wade R. Hirschman et al, en el 2012, compararon la citotoxicidad de los cementos MTA-Angelus, Endosequence RRM, Ultra-blend Plus y Dycal, analizando los materiales en intervalos de 2, 5 y 8 días. Reportando una viabilidad bastante similar a la ofrecida por el control positivo (Medio de cultivo con células). Finalmente concluyendo que no había diferencia estadísticamente significativa en

el grado de citotoxicidad producido por cualquiera de los cementos, con excepción del Dycal, utilizado como control negativo.

Situación que de la misma manera, basándonos en nuestro trabajo, manejado mediante microscopio óptico invertido, antagonizamos absolutamente; ya que, al realizar nuestro ensayo para determinar la capacidad de regeneración celular de 0 a 24 horas (posterior a 36 hrs de contacto medio de cultivo-celulas-cemento), encontramos ausencia total de células en el cemento Endosequence RRM, por lo cual lo hallamos como un material que ofrece mayor citotoxicidad en comparación al ProRoot y al Biodentine.

Por otro lado Hui-min Zhou et al, en el 2013, compararon la citotoxicidad producida por el Biodentine, ProRoot y el GIC (Ionómero de vidrio), manejando intervalos de 1, 3 y 7 días. Reportando que tanto el ProRoot como el Biodentine demostraron una mayor viabilidad en comparación con el GIC y entre ellos (ProRoot y Biodentine), no existía una diferencia significativa en el grado de producción de citotoxicidad. Situación en la cual concordamos con la excelente biocompatibilidad ofrecida por parte del ProRoot, exceptuando que nosotros encontramos una menor viabilidad por parte del Biodentine. Sin embargo, no dejamos de mencionar nuestro reporte sobre una diferencia estadísticamente no significativa entre los materiales.

Conclusión y recomendaciones:

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, encontramos al cemento ProRoot como el material mas biocompatible (tomando como base los ensayos de absorbancia, morfología y regeneración), mientras que el Endosequence RRM fue el material que produjo un mayor grado de citotoxicidad. Tanto el Endosequence RRM como el Biodentine, demostraron ser materiales muy inestables al estar en contacto con las células, ofreciendo un comportamiento disparado en los distintos intervalos de registro.

Sin embargo con base a nuestro análisis de varianza de Anova, encontramos que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los cementos y su citotoxicidad.

Al analizar nuestra gráfica, cabe mencionar que el ProRoot es el mejor compuesto, debido a que mantuvo una gran estabilidad durante los tiempos en que se analizó, al igual que el Dycal; ofreciendo un excelente comportamiento al ser utilizado como control negativo.

Los materiales Dycal y Ca(OH)_2 , ocasionan muerte celular, presentando el comportamiento esperado, para ser utilizados a manera de control negativo. Debido a los resultados obtenidos en el T4 (36hrs) en el lector de placas de Elisa, nuestra recomendación es la realización de mayores análisis para determinar si Endosequence RRM y Biodentine son biocompatibles al utilizarlos como se menciona en los métodos, ya que se sospecha de la posible liberación de alguna partícula ó molécula, que pudiera estar interactuando con el reactivo MTS, por lo que se sugiere probar otros reactivos para evitar posibles falsos positivos durante el análisis de absorbancia.

Finalizando el presente trabajo y buscando cumplir con el objetivo general, concluimos que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el grado de producción de citotoxicidad entre los 3 materiales.

Dedicatoria.

A mi hijo Sergio Alejandro, la luz de mi existencia y por quien vale la pena concluir todos estos proyectos, de lo cual estoy seguro, le quedará como ejemplo para siempre luchar y buscar la educación superior.

Agradecimientos.

1.- A dios por haberme permitido realizar un paso mas en el área científica..

2.- A la Dra. Tania A. Camacho Villegas por su importantísimo e invaluable apoyo, por pasar horas de su valiosísimo tiempo conmigo en el laboratorio, sacrificar gran parte de su valioso tiempo, su familia y sus alumnos, por acompañarme durante toda mi estancia en el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, por haber tenido la atención de invitarme a seminarios y sobre todo por en tan poco tiempo haberme enseñado tanto, por lo cual se merece todo mi respeto y admiración.

3.- Al respetable Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro; cordinador del programa de maestría, doctorado y pos doctorado en ciencias de la vida. Por sus invaluable asesorías, por abrirme las puertas del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada para realizar mi estancia de laboratorio; con apoyo absoluto e incondicional en tiempo y recursos, por haberme abierto los ojos, la mente para así darme cuenta de lo mucho que me falta por aprender, por su amabilidad, excelencia, nivel y humildad como persona. Y sobre todo por reiterarme que todo proyecto se tiene que hacer a su máxima expresión.

4.- A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez por haberme aceptado en este programa, depositar su confianza en mi y por brindarme todo su apoyo durante la elaboración de mi proyecto, mediante su asesoría y consejos. Pero sobre todo le agradezco por haberme puesto este reto, el cual honestamente en un inicio vi como algo casi imposible de realizar y hoy en día me doy cuenta que todo se puede lograr cuando se hace con pasión, esfuerzo y tocando las puertas indicadas.

5.- A mi esposa Astrid Gómez, de quien he aprendido bastante, en todos los pasos de mi carrera, por apoyarme incondicionalmente durante toda la fase de mi maestría, enseñándome siempre conceptos de metodología, biología,

bioestadística, matemáticas, redacción de artículos, por ayudarme a darle los toques finales a este trabajo, por orientarme con los conceptos, apoyarme en la configuración de la presentación y siempre confiar en mi.

6.- A mi hijo Sergio Alejandro, por haber aguantado mis ausencias durante esta etapa y siempre recibirme con una sonrisa y un abrazo que me impulsaba a seguir adelante.

7.- A mis papas por siempre confiar en mi y darme su apoyo incondicional y sus invaluable consejos.

8.- A la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo, por su gran amabilidad, compromiso y apoyo para el desarrollo del análisis bio estadístico mas adecuado, sus consejos y su eficacia como profesional.

9.- Al Dr. Rufino Menchaca, quien fue un excelentísimo profesor y amigo, apoyándome con todas las dudas de bioestadística, metodología, brindándome siempre atinados consejos y dejándome la enseñanza de siempre buscar mas.

10.- Al Dr. José Luis Tinajero, quien siempre ha demostrado ser un excelentísimo colega y amigo, ha levantado con fuerza y vigor nuestro CCDE, el cual en estos momentos me toca presidir a su lado y en esta ocasión como en muchas otras fue la persona que me apoyo para lograr la realización de este proyecto en el Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada.

11.- A mis amigos Luz Dalia y Saúl Godina, por su gran apoyo, por las excelente veladas, por haberme ayudado a conseguir mis materiales para el trabajo de laboratorio, echarme infinidad de veces la mano y por ofrecerme su excelentísima amistad.

12.- Al Dr. Raul Gaytan, por su sencillez, humildad y por haber formado parte de mi cuadro de maestros, enseñarnos todas las bases para realizar una

investigación formal y habernos enseñado a manejar el método científico de la manera mas práctica.

13.- A la Dra. Haydeé Gómez Llanos, quien muy amablemente me apoyo durante la conformación del escrito y resolvió gran parte de mis dudas, durante la elaboración del escrito.

14.- A mis excelentísimos amigos Saul, Luz Dalia, Lulú, Roxana, Gilberto, Cristian, Perla, Irene y Ana María Ley, con quienes compartí memorables momentos, formando entre todos un grupo bastante agradable y unido. A quienes siempre voy a llevar con mucho cariño y aprecio en mi mente.

15.- A mis QQ:.HH:. y Ap:. de mi logia BJN1, quienes a pesar de estar ausente de mi cargo como 2do V:. me apoyaron con mis responsabilidades y comprendieron la demanda de tiempo del trabajo y la escuela.

16.- A mis colegas y amigos del CCDE, CEBC, ADM, AME y GLAGBC por comprender mi informalidad temporal durante la realización de mi maestría.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Katherine Blohm Lichaa et al, **Propiedades físicas, químicas y biológicas del agregado de trióxido mineral y del cemento de portland**, IUCV, Marzo 2009.
- 2.- Mahmoud Torabinejad et al, **Clinical Applications of Mineral Trioxide Aggregate**, JOE, VOL. 25, No. 3, MARCH 1999.
- 3.- Lee S et al, **Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations**. JOE, Abril 1993.
- 4.- Sakar et al, **Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate**. JOE — Volume 31, Number 2, February 2005.
- 5.- Marjorie Zanini et al, **Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization**, JOE Vol. 38, Issue 9, Pages 1220-1226, September 2012
- 6.- Cedillo J et al, **NUEVO SUSTITUTO BIOACTIVO DE LA DENTINA; SILICATO TRICALCICO PURIFICADO**, RODYB, Vol II. Número 2. Agosto 2013
- 7.- Torabinejad M. et al, **Physical and chemical properties of a new root-end filling material**. JOE 1995;21:349-53.
- 8.- Marjorie Zanini et al, **Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization**, JOE Vol. 38, Issue 9, Pages 1220-1226, September 2012
- 9.- O'Brien WJ et al, **Dental Materials and Their Selection**, third edition, Quintessence Publishing Co, Inc 2002, p.380.

- 10.- Goldberg M et al, **Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites**, research 2009, Chapter VI Emerging trends in (bio) material.
- 11.- Marjorie Zanini et al, **Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization**, JOE Vol. 38, Issue 9, Pages 1220-1226, September 2012.
- 12.- Karen F et al, **Antibacterial Activity of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis***, JOE Vol. 37, Issue 11, Pages 1542-1546, November 2011.
- 13.- Maria Ciasca et al, **A Comparison of the Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Production of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot Mineral Trioxide Aggregate in Human Osteoblast Cell Culture Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction**, JOE Vol. 38, Issue 4, Pages 486-489, April 2012
- 14.- J.M.Lozano et al, **Citotoxicidad Celular**, Inmunologia Molecular, Capitulo 14
- 15.- Amer Z. AlAnezi et al, **Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material**, OOO 2010;109:e122-e125
- 16.- Rosa Maria Osorio et al, **Cytotoxicity of Endodontic Materials**, JOURNAL OF ENDODONTICS, VOL. 24, No. 2, FEBRUARY 1998.
- 17.- M. Torabinejad et al, **Cytotoxicity of Four Root End Filling Materials**, JOE, MOL. 21, NO. 10, OCTOBER 1995.
- 18.- Elie M. Wolfson et al, **Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations**, JOE, VOL 1, NO 12, DECEMBER 1975.

- 19.- Patrick T. Cleary et al, **Histological Examination of Paraformaldehyde - Exposed Gutta-percha Implanted in Rats**, JOE, VOL. 18, No. 2, FEBRUARY 1992.
- 20.- F. Kris Olsen et al, **Osseous Reaction to Implanted ZOE Retrograde Filling Materials in the Tibia of Rats**, JOE, VOL. 20, NO. 8, AUGUST 1994.
- 21.- Roberto Holland et al, **Reaction of Rat Connective Tissue to Implanted Dentin Tubes Filled with Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide**, JOE, VOL. 25, NO. 3, MARCH 1999.
- 22.- David H. Pashley et al, **Dentin Permeability, Dentin Sensitivity, and Treatment Through Tubule Occlusion**, JOE, VOL. 12, No. 10, OCTOBER 1986.
- 23.- Seung-Jong Lee, **Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate for Repair of Lateral Root Perforations**, JOE, VOL. 19, NO. 11, NOVEMBER 1993.
- 24.- Holland R et al, **Recambio del hidróxido de calcio después de la pulpotomía y su influencia en la reparación. Estudio histológico en dientes de monos**. Endodoncia 1999; 17:35-45.
- 25.- Gartner et al, **Advances in endodontic surgery**. Dent Clin North Am (1992). 36:357-79.
- 26.- Hui-min Zhou, **In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material**, JOE — Volume 39, Number 4, April 2013
- 27.- Emmanuel J.N.L. Silva et al, **Evaluation of Cytotoxicity and Physicochemical Properties of Calcium Silicate-based Endodontic Sealer MTA Fillapex**, JOE — Volume 39, Number 2, February 2013

28.- Khalid Merdad et al, **Short-Term Cytotoxicity Assessment of Components of the Epiphany Resin-Percha Obturating System by Indirect and Direct Contact Millipore Filter Assays**, JOE — Volume 33, Number 1, January 2007

29.- Beth Ann et al, **Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials**, JOE — Volume 37, Number 3, March 2011

30.- Hession RW et al. **Long-term evaluation of endodontic treatment: anatomy, instrumentation, obturation--the endodontic practice triad**. IEJ 1981; 14(3): 179-184.

31.- Milleding P, Wennberg A, Hasselgren G. **Cytotoxicity of corroded and non-corroded dental silver amalgams**. SJDR 1985; 93(1): 76-83.

32.- Wennberg A, Hasselgren G. **Cytotoxicity evaluation of temporary filling materials**. IEJ 1981; 14(2): 121-124.