

**INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA**  
**COLEGIO ODONTOLÓGICO**  
**ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA**  
**POSTGRADO DE ENDODONCIA**



**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL BIOCERÁMICO FRENTE AL  
MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO EN CULTIVOS CELULARES DE  
FIBROBLASTOS DE PULPA DENTAL HUMANA**

**ESTUDIO PILOTO**

**AUTORES:**

**Ángela María Almanza Gonzalez**

**Valentina Mosquera Cerquera**

**Hernando Alfonso Romero Romero**

**INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA**

**COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO – UNICOC**

**ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA**

**POSTGRADO DE ENDODONCIA**

**BOGOTÁ D.C 2015**

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL BIOCERÁMICO FRENTE AL  
MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO EN CULTIVOS CELULARES DE  
FIBROBLASTOS DE PULPA DENTAL HUMANA  
ESTUDIO PILOTO**

**ASESORAS CIENTIFICA**

Dra. Ana Maribel Bonilla Ramírez  
Odontóloga Especialista en Endodoncia

**ASESOR METODOLÓGICO**

Dra. Piedad Malaver Calderón  
Od. Ms en Biología Énfasis Genética Humana.

Dra. Ángela Suarez Castillo  
Od. Especialista en Epidemiología

**ASESOR ESTADISTICO**

Dr. Jaime Andrés Cubides Cárdenas  
Md. Veterinario Esp. En Bioestadística

**INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA  
COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO – UNICOC  
ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA  
POSTGRADO EN ENDODONCIA  
BOGOTÁ D.C 2015**

## CONTENIDO

### 1.- ASPECTOS TEÓRICO CIENTÍFICOS.

#### 1.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.2.- JUSTIFICACIÓN

#### 1.3.- PROPÓSITO

#### 1.4.- **MARCO TEÓRICO**

##### 1.4.1- Tejido Pulpar

##### 1.4.2- Fibroblastos

##### 1.4.3- Diagnostico

##### 1.4.3.1- Pulpitis Reversible

##### 1.4.4- Tratamientos

##### 1.4.4.1- Pulpotomia

##### 1.4.4.2- Recubrimiento pulpar directo

##### 1.4.5.- Materiales

##### 1.4.5.1-Sulfato Férrico

##### 1.4.5.2- Formocresol

##### 1.4.5.3- Óxido de Zinc Eugenol

##### 1.4.5.4- Hidróxido de Calcio

##### 1.4.5.6- Mineral Trióxido Agregado

##### 1.4.5.7- Biocerámico

##### 1.4.6- Marco Referencial

##### 1.4.7.- Objetivos

##### 1.4.7.1.- Objetivo General

##### 1.4.7.2.- Objetivos Específicos

##### 1.4.8.- Hipótesis

##### 1.4.8.1.- Hipótesis nula

##### 1.4.8.2.- Hipótesis alternativa



## **2.- ASPECTOS METODOLÓGICOS**

2.1.- Tipo de estudio

2.2.- Objeto de estudio

2.3.- Unidad de observación

2.4.- Muestra

2.5.- Variables

2.5.1.- Variables dependientes

2.5.2.- Variables independientes

2.6.- Operacionalización de las variables

2.7.- Procedimiento.

2.7.1.- Cultivos celulares

2.7.2.- Ensayo de Linealidad

2.7.3.- Preparación del Biocerámico y el Mineral Trióxido Agregado

2.7.4.- Tratamiento de las células

2.7.5.- Ensayo de citotoxicidad (Resazurina)

2.7.6.- Método estadístico

## **3.- RESULTADOS**

## **4.- DICUSIÓN**

## **5.- CONCLUSIÓN**

## **6.- RECOMENDACIONES**

## **7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS**

## **1. ASPECTOS TEÓRICO-CIENTIFICOS**

### **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La pulpa dental forma parte del complejo dentino pulpar, que tiene su origen embriológico en la papila dental (tejido ectomesenquimático). Está compuesto por matriz colágena, rica en proteínas, en la cual existe un intercambio de nutrientes. En la zona periférica de la pulpa se encuentra una zona rica en células, que tienen la característica de diferenciarse, siguiente a esta zona se encuentra una zona pobre de células y en lo más profundo se encuentra la pulpa propiamente dicha. <sup>1-4</sup>

La pulpa está compuesta por una variedad de células que la componen como lo son los odontoblastos, fibroblastos y células del sistema inmune. Los odontoblastos son las células encargadas de la formación de la pulpa dental y de la dentina, también tienen la función de realizar la formación de todos los tipos de dentina durante los procesos de reparación. Los fibroblastos son las células encargadas de la síntesis de las fibras colágenas, reticulares, y elásticas, y de los carbohidratos complejos de las sustancias fundamentales y capaces de producir todos los componentes de la matriz extracelular, por último encontramos las células del sistema inmune como lo son los macrófagos, linfocitos, leucocitos y polimorfonucleares, las cuales actuarán en los procesos inflamatorios. <sup>1-4</sup>

La pulpa dental al ser parte del complejo dentino pulpar se puede ver afectada por patologías externas tales como la caries, el trauma dental o procesos de restauración, cuando esta se ve involucrada, la primera patología pulpar que se observa es la pulpitis reversible. <sup>1-4</sup>

La pulpitis irreversible es un estado de la pulpa en el cual se observa una inflamación leve de esta, en el cual la pulpa dental puede recuperarse cuando la causa de la patología es eliminada con el tratamiento adecuado, la característica de esta patología es la presencia de un dolor leve o severo cuando se presenta un estímulo y se cesa cuando se retira el estímulo, el tratamiento a realizar es una

terapia pulpar vital con el fin de mantener las funciones normales de la pulpa y su vitalidad. En las terapias pulpares vitales encontramos el recubrimiento pulpar directo, pulpotomias y recubrimiento pulpar indirecto, se realizan las dos primeras terapias cuando existe una exposición real de la pulpa dental y la última cuando existe una caries con gran compromiso de la dentina.<sup>1-4</sup>

La pulpotomía y el recubrimiento pulpar directo, tienen como objetivo conservar la vitalidad del tejido pulpar, prevenir el dolor y la inflamación. Al realizar este tipo de procedimientos, se debe tener en cuenta que existe un contacto directo con las células vitales de la pulpa dental pre-existente, conocer los efectos que producen a nivel celular los materiales es de gran importancia para mantener el objetivo de dichas terapias.<sup>5</sup>

Para realizar dichas terapias vitales, es necesario tener materiales que tenga diversas características ideales para proporcionar salud: ser bactericida, promover reparación, baja toxicidad, no generar pigmentación, promoción de diferenciación celular, buena manipulación.<sup>6-9</sup>

Se han utilizado diversos materiales para estos tratamientos, tales como el hidróxido de calcio, formocresol, sulfato férrico y el óxido de zinc eugenol, a los cuales se les ha atribuido diversas ventajas y desventajas.<sup>6-9</sup>

Por mucho tiempo el Gold estándar de los materiales para la terapia vital pulpar fue el Hidróxido de calcio, el cual presenta capacidades antimicrobianas y ayuda para la formación de dentina secundaria, forma una capa de células mesenquimatosas indiferenciadas y proliferación de fibroblastos que luego van a dar lugar a diferenciación celular tales como odontoblastos donde estas dan formación de un proceso de calcificación y se puede observar un puente dentinario. Desventajas del hidróxido de calcio es su reabsorción.<sup>10-11</sup>

La evolución de la endodoncia ha desarrollado nuevos materiales como lo son Mineral Trióxido Agregado (MTA) y los Biocerámicos, diversos estudios han



demostrado la efectividad del MTA y los biocerámicos tienen diversas funciones en los tratamientos de la práctica endodóntica. Debido a esto, es de gran importancia conocer las propiedades, comportamiento, viabilidad y citotoxicidad de los materiales en los recubrimientos pulpaes directos, pulpotomias, debido a que se encuentran en contacto con células de la pulpa dental.<sup>12-13</sup>

Conoce que la citotoxicidad es la cualidad de algún material de ser toxico a las células, alterando las funciones básicas de las células y conllevan a un daño o la muerte.<sup>12-13</sup>

En un estudio realizado por De-Deus G, Canabarro A, Alves G.G, Marins J.R, Linhares A.B.R., Granjeiro J.M en el 2012<sup>11</sup> evaluaron a través de un ensayo in vitro, los efectos de un biocerámico y el Mineral Trióxido agregado en osteoblastos humanos primarios. Se demostró que el mineral trióxido agregado mantuvo estable la viabilidad celular entre las 24 y 48h a la exposición y el biocerámico mostró resultados similares, sin embargo, el biocerámico disminuyó la viabilidad celular significativamente más que los otros dos grupos después de 48h de exposición.<sup>11</sup>

Liu S. y colaboradores en el 2015<sup>13</sup> estudiaron in vivo e in vitro los efectos del MTA y biocerámicos en células de pulpa dental, encontrando que el MTA produce mayor proliferación celular de 5 a 7 días y los biocerámicos de 1 a 3 días presenta alto grado de proliferación, observando que los dos materiales tienen gran biocompatibilidad con las células de pulpa dental <sup>13</sup>

Es importante identificar el grado de citotoxicidad que pueden llegar a producir el Mineral Trióxido agregado y los biocerámicos sobre los fibroblastos de la pulpa dental, ya que estas son las células que se encuentran directamente afectadas en procedimientos de pulpotomia y recubrimientos pulpaes directos. <sup>14</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantean las siguientes hipótesis de estudio

Hipótesis nula: No existe diferencias entre el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad entre el Biocerámico y el MTA

Hipótesis alterna: Existe diferencias entre el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad entre el Biocerámico y el MTA

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

Las terapias pulpaes como la pulpotomía y el recubrimiento pulpar directo tienen como objetivo mantener la vitalidad y función del complejo dentino-pulpar, lo cual mantendrá la salud no solo del conducto radicular sino la de los tejidos periapicales y circundantes. Es relevante para el endodoncista conocer los efectos que producen a nivel celular los materiales como el MTA y los Biocerámicos, ya que estudios realizados sobre odontoblastos han demostrado que presenta citotoxicidad, por tal motivo es importante evaluarlos también sobre fibroblastos procedentes de pulpa dental.<sup>11-13</sup>

Es necesario identificar que material de recubrimiento pulpar directo (Biocerámicos o Mineral Trióxido Agregado), presenta mejor comportamiento, mediante la realización de estudios in vitro que permitan observar la actividad celular de los cultivos primarios obtenidos de tejidos de cavidad oral específicamente pulpa, al ser expuestos a los materiales anteriormente descritos.<sup>12-13</sup>

## **1.3. PROPÓSITO**

El propósito de esta investigación es conocer el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad entre el Biocerámico y el MTA, sobre los fibroblastos de pulpa dental humana, ya que al realizar los tratamientos de recubrimientos pulpaes directos y pulpotomías, son estas las células directamente afectadas.

## **1.4. MARCO TEÓRICO**

### **DEFINICIÓN Y CONCEPTOS**

#### **1.4.1 TEJIDO PULPAR**

La pulpa dental forma parte del complejo dentino pulpar, que tiene su origen embriológico en la papila dental (tejido ectomesenquimático). La pulpa que se aloja en la cámara pulpar es la forma madura de la papila y tiene la particularidad de ser el único tejido blando del diente. Desde el punto de vista estructural la pulpa dental es un tejido conectivo de la variedad laxa, ricamente vascularizado e innervado. La pulpa está formada en un 75% de agua y un 25% de materia orgánica, esta última está constituida por células y matriz extracelular (MEC), representadas por fibras y matriz extracelular.<sup>4-3-15</sup>

Entre la población celular normal de la pulpa encontramos los odontoblastos, fibroblastos, células ectomesenquimáticas o células madres de la pulpa, macrófagos, células dendríticas, otras células (linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y mastocitos).<sup>3-15</sup>

En pulpas jóvenes se ha descrito que, estas células, poseen largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas poco notables al Microscopio Óptico (MO), conectadas mediante complejos de unión a otros fibroblastos, adquiriendo un aspecto de "sincicio" morfológico pero no funcional. En la pulpa adulta se transforman en fibrocitos tomando una forma ovalada, con un núcleo de cromatina más densa y un citoplasma escaso de débil basofilia, con orgánoides reducidos.<sup>3</sup>

En los procesos de reparación o de naturaleza inflamatoria del tejido conectivo suele variar su morfología, así como el número de sus células y el desarrollo de las organelas en el seno de las mismas. Es decir que los fibrocitos pueden diferenciarse y volver a ser fibroblastos ante distintos estímulos. En estas circunstancias se han identificado fenómenos de división celular y, por ello, se considera que los fibrocitos aún conservan cierta capacidad de regeneración. Sin embargo, algunos autores sostienen que los fibroblastos adultos en estas situaciones derivan de otras células con menor grado de diferenciación.<sup>15</sup>



Por otra parte, se ha comprobado en cultivos celulares que los fibroblastos pulpaes sintetizan fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína extracelular, que actúa como mediador de adhesión extracelular, uniendo las células entre si y a estas a los componentes de la matriz.<sup>3-4</sup>

Además, se ha sugerido que la unión de la fibronectina con el colágeno tipo III constituiría el sustrato químico de las fibras reticulares de la pulpa. En síntesis, el aspecto alargado, fusiforme o estrellado que presentan los fibroblastos, dependen del tipo de matriz extracelular en la que se encuentren inmersos. Por lo general, se ubican entre las fibras colágenas, las cuales se orientan en las distintas direcciones del espacio.<sup>3-4</sup>

#### **1.4.2. FIBROBLASTOS**

Los fibroblastos se derivan del mesénquima primitivo, a partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas, son las células principales y fijas más abundantes del tejido conjuntivo. Son los encargados de sintetizar y segregar los precursores de los componentes fibrosos y amorfos de la matriz extracelular. Los fibroblastos se hallan distribuidos a lo largo de los haces de fibras colágenas y en los cortes histológicos se visualizan como elementos fusiformes. Tienen a su cargo la síntesis de las fibras colágenas, reticulares, y elásticas, y de los carbohidratos complejos de la sustancia fundamental. La investigación indica que un solo fibroblasto es capaz de producir todos los componentes de la matriz extracelular.<sup>2-6-15</sup>

Los fibroblastos presentan un citoplasma basófilo, mientras que el de los fibrocitos (fibroblastos en reposo) es eosinófilo, al igual que las fibras colágenas que los rodean, lo cual dificulta la diferenciación de los cuerpos celulares con respecto a las fibras; debido a esto, la mayoría de las veces sólo se puede observar los núcleos. Sin embargo, se identifican fácilmente con el empleo de técnicas especiales. En las microfotografías electrónicas los fibrocitos muestran un aparato

de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso poco desarrollado, en cambio los fibroblastos jóvenes, ya sean los provenientes del tejido conjuntivo en desarrollo o de procesos de cicatrización, presentan las características estructurales del modelo de célula secretora de proteínas, es decir, un núcleo de cromatina laxa con nucléolo prominente, un retículo endoplásmico rugoso desarrollado y un aparato de Golgi grande y dilatado. Además de estos organitos, los fibroblastos contienen en su citoplasma mitocondrias filamentosas, localizadas tanto en el cuerpo celular como en sus prolongaciones. Los centriolos se encuentran próximos al núcleo, y en ocasiones aparecen gránulos que se tiñen con la reacción del ácido peryódico de Schiff, por lo cual se piensa que sean precursores intracelulares de los polisacáridos de la sustancia intercelular amorfa. Normalmente contienen pocas inclusiones, a excepción de algunas pequeñas gotas de grasa.<sup>2-6-15</sup>

En algunas muestras preparadas de forma especial es posible distinguir el citoplasma celular de los componentes fibrosos. Cuando se produce material de matriz extracelular en el crecimiento activo o en la reparación de las heridas (en los **fibroblastos activados**), el citoplasma de los fibroblastos es máextenso y puede presentar basofilia como consecuencia del aumento de la cantidad del retículo endoplasmático rugoso (RER) que se asocia con la síntesis proteica. Al examinarlo con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) se comprueba que el citoplasma de los fibroblastos que contienen cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) y un aparato de Golgi prominente.<sup>2-6-15</sup>

### **1.4.3- DIAGNOSTICO**

#### **1.4.3.1- PULPITIS REVERSIBLE**

La pulpitis reversible es el estado patológico de la pulpa, que se caracteriza por presencia de inflamación pulpar leve, existiendo la capacidad de reparación de este tejido al realizar el tratamiento apropiado, es decir al eliminar la causa de la



lesión, también podemos decir que esta se basa en resultados subjetivos y objetivos que nos indican que la inflamación que se presenta a nivel pulpar puede resolverse y esta retornaría a un estado de normalidad.<sup>16-17</sup>

Etiológicamente la pulpitis reversible se presenta por restauraciones defectuosas, trauma dentoalveolar y caries. Los signos y síntomas que esta presenta son dolor leve y severo como respuesta a un estímulo irritante tales como fuerzas oclusales o estímulos térmicos (frio o calor), a la prueba de palpación y percusión no existe respuesta y radiográficamente presenta apariencia normal, como diagnóstico diferencial tenemos la hipersensibilidad dentinal, la cual es un fenómeno de movimiento del fluido en los túbulos dentinales y no necesariamente se relaciona con inflamación pulpar.<sup>16-17</sup>

#### **1.4.4. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS**

##### **1.4.4.1- PULPOTOMIA**

Es el tratamiento oportuno cuando se expone la pulpa de los dientes y cuando la inflamación o infección parezcan limitarse a la pulpa coronal. La presencia de cualquier afección de la pulpa radicular del diente contraindica la pulpotomía.<sup>4</sup> Su principio se fundamenta en que el tejido pulpar sano, tiene la capacidad de curarse después de realizar la remoción de una parte del tejido que se encontraba a nivel coronal infectado o afectado. El propósito de la pulpotomía es lograr que la pulpa radicular que se preserva se encuentre vital y el diente tratado se encuentre presente en cavidad oral el mayor tiempo posible.<sup>4-18</sup>

Se retira la pulpa coronal, y el tejido de la pulpa radicular vital restante se cubre con un medicamento.<sup>4-18</sup>

#### **1.4.4.2. RECUBRIMIENTO PULPAR DIRECTO**

Procedimiento que se realiza cuando la pulpa sana ha sido expuesto inesperadamente durante un procedimiento operatorio. El estado del diente debe ser asintomático, la exposición entre 1-2 mm y presentarse libre de exposición al medio oral. Es un procedimiento indicado para pequeñas exposiciones mecánicas o traumáticas.<sup>3-4-18</sup>

#### **1.4.5.- MATERIALES**

##### **1.4.5.1-SULFATO FÉRRICO**

Es un hemostático que forma un complejo de proteína iónica de hierro y una aglutinación de proteínas sanguíneas, formándose un microcoágulo y una membrana que sellan mecánicamente las venas dañadas, limitando así el sangrado.<sup>3-8</sup> Esta sustancia se ha demostrado que es buena porque inhibe el paso de sustancias irritativas y permitirá de esta manera evitar un coágulo, procesos inflamatorios disminuyendo la inflamación crónica y posibles reabsorciones.<sup>3-4-8</sup>

##### **1.4.5.2- FORMOCRESOL**

Buckley, en 1904, introdujo el uso de formocresol, posteriormente modificada por Sweet en 1930.<sup>2-3-15</sup> Se le han atribuido efectos terapéuticos, tales como llegar a realizar fijación de los tejidos causado por el efecto de unión de proteínas que produce este material, presenta propiedades momificante, provoca desnaturalización de las proteínas., y tiene una gran capacidad bactericida.<sup>18-20</sup>

Presenta como desventajas alteración de las funciones celulares y su degeneración a nivel pulpar estimula inflamación y necrosis.<sup>21-23</sup>

#### **1.4.5.3. ÓXIDO DE ZINC EUGENOL**

El óxido de zinc eugenol ha sido utilizado como cemento después de ser realizado el uso de formocresol en pulpotomias, es considerado que ayuda en el proceso de cicatrización en dicho procedimiento, propiedades analgésicas, ya que presenta acción sedante y estimula al complejo dentino-pulpar, para dar lugar a nueva formación de dentina (dentina reparativa).<sup>24-25</sup>

El óxido de Zinc-Eugenol se le ha atribuido como desventajas que tiene toxicidad, provoca reacciones inflamatorias crónicas, causa a nivel perirradicular daño y en algunos casos alteraciones en la erupción de dientes permanentes <sup>24-25</sup>

#### **1.4.5.4. HIDRÓXIDO DE CALCIO**

Es un material utilizado en pulpotomias el cual presenta capacidades antimicrobianas y ayuda para la formación de dentina secundaria. El hidróxido de calcio tiene un pH alcalino de 12.4 lo que beneficia la reparación de tejido y buen bactericida. Al usar hidróxido de calcio se ha visto que se forma una capa de células mesenquimatosas indiferenciadas y proliferación de fibroblastos que luego van a dar lugar a diferenciación celular tales como odontoblastos donde estas van a dar formación de un proceso de calcificación y se puede observar un puente dentinario. Desventajas del hidróxido de calcio es su reabsorción <sup>25-26</sup>

#### **1.4.5.6. MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO**

El Mineral Trióxido Agregado fue creado por Torabinejad, el cual ha sido utilizado en diversos tratamientos odontológicos tanto quirúrgicos como no quirúrgicos.<sup>25-28</sup>

**Composición:** El MTA está compuesto en su gran parte de cemento de Portland, entre otros componentes se le atribuye un gran comportamiento biológico que es



presentar y proporcionar gran capacidad de barrera física impermeable después de lograr su completo fraguado.<sup>25-28</sup>

### **Manipulación:**

La preparación del MTA se debe realizar de acuerdo a las indicaciones de cada fabricante, el polvo se debe preparar mezclándolo con agua estéril en una relación 3:1, logrando una mezcla que quede pastosa que se pueda transportar con facilidad, es importante tener en cuenta que el MTA necesita de humedad para lograr su fraguado y se debe colocar de manera directa y con una pequeña presión. El MTA presenta un tiempo de trabajo entre 4 minutos aproximadamente y ese de gran importancia ya que se puede deshidratar. <sup>25-28</sup>Anteriormente se consideraba útil colocar sobre el MTA una torunda de algodón húmeda entre 1 o 3 días para ayudar a que el material lograra su fraguado, se ha demostrado que a las 72 horas el MTA tiene un desalojo mayor que a las 24 horas, por tal motivo se sugiere usar el MTA con otro material que lo proteja. Debido a sus grandes características de lograr el fraguado con humedad, es muy útil en tratamiento donde hay presencia de sangre, por esta ventaja no es necesario colocar ningún tipo de barrera en procedimientos donde hay humedad. <sup>25-28</sup>

Se sugiere que sea muy cautelosa su manipulación en zonas de estética ya que por su composición logra provocar decoloración de la estructura dentaria, por tal motivo se recomienda utilizarlo por debajo de la unión amelo-cementaria y en el conducto radicular. <sup>25-28</sup>

### **Propiedades**

Se le han considerado diversas propiedades físicas y químicas como:

- Tiempo de endurecimiento, que está entre 2 y 4 horas, es de gran ventaja tener esta propiedad debido a que a mayor tiempo de fraguado, menor contracción, lo que le da una buena capacidad de sellado y tener una



menor filtración lo que proporciona que las bacterias no logren penetrar y recontaminar el conducto tratado con este material. <sup>25-29</sup>

- En relación con sus propiedades químicas es el hidróxido de calcio es el principal compuesto liberado por el MTA en agua. El hidróxido de calcio es biocompatible con el tejido. El pH inicial de MTA es de 10.2, con un aumento hasta 12.5, tres horas después de la mezcla. El MTA ofrece un sustrato biológicamente activo para las células óseas y estimula la producción de interleuquina debido a su pH alcalino y la liberación de iones de calcio. Además, la formación de hidróxido de calcio durante la fijación del MTA explica el alto pH del material fijado así como la necrosis de coagulación y la calcificación distrófica que le siguen a su implante cutáneo. La respuesta inflamatoria inicialmente severa al MTA muy probablemente es multifactorial con un alto pH, calor generado durante la fijación y la generación de citoquinas inflamatorias tales como la interleuquina 1 y la interleuquina 6 que contribuyen al proceso. <sup>25-29</sup>
- **Radiopacidad:** Una de las características de que debe presentar un material de uso endodóntico es presentar una buena radiopacidad, el MTA presenta en su composición Oxido de Bismuto lo que favorece a esta propiedad, la radiopacidad del MTA es de 7.17, con este nivel de radiopacidad se ha demostrado que logra ser más radiopaco que otros materiales tales como la gutapercha e incluso ser más radiopaco que la dentina, lo que tendrá como ventaja distinguirlo mejor cuando se toman radiografías. <sup>25-29</sup>
- **Resistencia a la compresión: A pesar que** presenta una resistencia a la compresión de 70Mpa, relativamente baja, pero en razón a las técnicas en donde se usa, las cuales no soportarán grandes cargas oclusales puede ser utilizado sin inconveniente alguno. <sup>25-29</sup>
- **Capacidad de sellado:** Se ha demostrado que el MTA no permite que ingresen moléculas aún más pequeñas que las mismas bacterias por lo tanto presenta buen sellado y excelente adaptación a la dentina. Estudios

comparativos entre otros materiales (amalgama, Super-Eba, IRM) Vs. el MTA demostraron que El MTA responde mejor a la microfiltración, concluyendo así que es un material ideal cuando se realizan obturaciones apicales, selle de perforaciones.<sup>28</sup> Torabinejad y cols demostraron que el MTA proporciona un mejor sellado apical seguido por la amalgama, Super-EBA, o IRM, y que esta se debe a su naturaleza hidrofílica y ligera expansión cuando se polimeriza en un ambiente húmedo.<sup>25-29</sup>

- **Resistencia al desplazamiento:** El MTA, cuando se utiliza como material de reparación, muestra una alta resistencia al desplazamiento siendo mayor a las 72 horas de haber sido utilizado en perforaciones o retropreparaciones, que a las 24 horas posterior a su colocación. Ello indica, según los investigadores, que la reacción química continúa después de la reacción inicial a las 24 horas de sellado, mejorando así la resistencia al desplazamiento.<sup>25-28</sup>
- **Biocompatibilidad:** Estudios in vitro de citotoxicidad han demostrado que el MTA es un material biocompatible al contacto con células (osteoclasto, fibroblastos) pues son las células que van a estar en contacto con el material y demuestra no presentar ninguna alteración en ellas.<sup>24</sup> También ha mostrado ser menos tóxico en comparación con los diversos materiales que se han utilizado en los tratamientos de recubrimientos pulpaes, pulpotomias y tratamiento endodóntico quirúrgico, al ser estudiado esto se demuestra que los materiales contacto inicial provocan una respuesta inflamatoria pero se vuelven biocompatibles con el pasar de las horas, este proceso inicial se debe al trauma inicial y las diversas sustancias liberadas por los materiales de inmediato. Por otra parte el MTA al estar en contacto con tejido óseo, logra provocar la formación del mismo sin producir degeneración celular.<sup>24-29</sup>
- **Citotoxicidad:** estudio de Koulauzidou, Margelos y colaboradores señalaron que "MTA ÁNGELUS Y PRO ROOT MTA® eran biocompatibles cuando eran probados en células pulpaes de ratas y en fibroblastos de



pulmones humanos, donde evaluaron los efectos de los materiales fijados sobre la sobrevivencia celular evitando la interacción física entre los materiales de investigación y las células objetivo, comparando la supervivencia celular en presencia de MTA fueron significativamente menos citotóxicas que súper EBA y Vitrebond.<sup>26</sup> Estos resultados concuerdan con otros estudios como los de FERRAZ *et al.*, 2001; KALIL, 2000; KIMOTO *et al.*, 2001, apoyan la biocompatibilidad de MTA, en que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grado del efecto de la citotoxicidad mostrado por MTA ángelus y pro Root MTA. La biocompatibilidad de MTA ha sido evaluada tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Los resultados de un estudio *in vitro* mostraron que MTA era menos tóxico que la amalgama, Super EBA Y IRM Pelliccioni y colaboradores<sup>27</sup> encontraron que las células Saos- 2 (linaje celular osteoblástico) sobre el MTA eran viables y podían proliferar, incluso a las 72 horas, mientras que el metabolismo celular y el crecimiento era reducido dramáticamente en el super EBA y las superficies de amalgama. Como resultado, el MTA no destruye la población celular de alrededor y los osteoblastos están en capacidad de comenzar la deposición ósea cerca al material de obturado.<sup>27</sup> Adicionalmente, Osorio<sup>4</sup> y colaboradores encontraron que el MTA no era citotóxico pero que el GIC, super EBA y amalgama mostraban niveles más altos de citotoxicidad. Zhu y colaboradores reportaron que los osteoblastos tenían una respuesta favorable al MTA en comparación al IRM y la amalgama.<sup>4</sup> La principal reacción característica del tejido al MTA era la presencia de tejido conectivo después de la primera semana post operatorio. Con una mayor duración, el MTA permitía el sobrecrecimiento de cemento y la formación de hueso, y podía facilitar la regeneración del ligamento periodontal. Los materiales MTA, cemento de eugenol de óxido de zinc y GIC fueron evaluados en relación a su actividad anti proliferativa. Los resultados de este estudio mostraron que IRM exhiben más citotoxicidad que MTA y GIC en un periodo de 24 horas. Esto puede ser



atribuido a la desintegración del IRM y a la liberación de su contenido de eugenol. Basados en estos estudios, parece favorable el uso de MTA como material de obturado radicular. También se ha evaluado la compatibilidad biológica de MTA a los tejidos periapicales en comparación a otros materiales de obturado retrogrado. En estos estudios, se verifico que MTA presentaba una menor toxicidad que superEBA, la amalgama y IRM, los cuales son materiales tradicionalmente usados para el obturado retrogrado; asimismo MTA proporcionaba un tratamiento favorable para los tejidos periapicales con nueva formación de cemento alrededor de. El mineral trióxido de agregado (MTA), según se ha demostrado, es mejor que los otros materiales de obturado retrogrado en relación a la citotoxicidad, sellado, adaptación marginal, e inducción de la reparación del ligamento periodontal. Puede ser el material produciendo el mejor éxito del tratamiento.<sup>24</sup>

- **Aplicaciones:** En diversas investigaciones el MTA ha sido usado en los siguientes tratamientos:

En dientes temporales en pulpotomias y recubrimientos pulpaes directos En dientes permanentes recubrimiento pulpar directo, pulpotomía, apexogénesis, en obturaciones, perforaciones radiculares, reabsorciones radiculares, tratamiento endodóntico quirúrgico (retroobtusión) y como barrera en aclaramientos internos.<sup>25-29</sup>

#### **1.4.5.7- BIOCERÁMICO**

A fines de la década de los 60, algunos investigadores como Hench et al, observaron que varios vidrios y cerámicas tenían la capacidad de adherirse al tejido óseo vivo, creándose un nuevo material llamado "Bioglass". Las investigaciones siguieron avanzando y a fines de la década pasada se descubrieron los materiales bioactivos, con aplicación tanto en medicina como en

odontología. Poseen propiedades osteoconductoras, ausencia de toxicidad, químicamente estables y son biocompatibles.<sup>28 - 30</sup>

BioAggregate (Innovative Bioceramics, Vancouver, BC, Canadá) es un material insoluble, radiopaco, y el material libre de aluminio, compuesta principalmente de silicato de calcio, hidróxido de calcio, y fosfato de calcio. Ha demostrado gran capacidad de sellado cuando se utiliza para la retro-obturación. Muchos estudios in vitro han demostrado que BioAggregate exhibe potente acción antimicrobiana, excelente biocompatibilidad y significativa inducción de hueso y regeneración periodontal.<sup>31</sup>

Existen tres categorías de biocerámicos:

- Bioinertes: capaces de rellenar tejidos y ser tolerados por el organismo.
- Bioactivos: tolerados por el organismo con capacidades de osteoconducción. Dentro de este grupo se encuentran los siguientes cementos selladores endodónticos: I-Root SP (IBC, Canadá), el Endosequence BC Sealer (Brasseler, USA) y el TotalFill BC Sealer (FKG, Suiza), entre otros.
- Biodegradables: con capacidad de ser degradados en ambiente biológico y reemplazado por hueso.<sup>30-31</sup>

Presenta favorables características como, pH alcalino, actividad antibacteriana, radiopacidad, biocompatibilidad. Destacamos que su radiopacidad es dada por el óxido de bismuto, óxido de circonio, fosfato de calcio, sulfato de bario, y óxido de zinc.<sup>30-31-32</sup> Al presentar un pH alcalino de 12 favorece a la eliminación de las bacterias tales como el *E. Faecalis*. Sin embargo, esta ventaja es una de las más importantes de los biocerámicos pero también se le han destacado ser biocompatibles, no tóxicos, estables químicamente en su entorno biológico, buena unión entre dentina y material de relleno, formador de hidroxiapatita, no se retrae, Hidrofílico siendo estas características excelentes para el uso en el tratamiento endodóntico. Otra



función destacada es que logra realizar liberación del ion  $\text{Ca}^{+}$  e hidroxilo, a partir uno de sus componentes el silicato de calcio, haciendo la formación de una capa de apatita, al tener contacto con fluidos, llegando a desarrollar un enlace químico (silicato Ca – pared dentinales), llevando a una íntima unión del material de relleno con las paredes dentinales evitando así la microfiltración.<sup>29—33-34</sup> Los biocerámicos se benefician de la humedad que queda en los túbulos para iniciar y completar la reacción de fraguado. Tiene un tiempo de trabajo 4h en temperatura ambiente, fraguado 4/10 h en canales secos. Los biocerámicos tienen para resaltar la desventaja de presentar mayor dureza, lo que dificulta la remoción del material en retratamientos.

Desde el punto de vista clínico, la ventaja de la presentación premezclada es evidente, ya que se ahorra tiempo y se obtiene un cemento homogéneo y bien proporcionado en sus componentes, a diferencia de los demás cementos de obturación, cuya preparación está supeditada al manejo del operador (5,6). Además son hidrofílicos, fraguan sólo ante la exposición a un ambiente húmedo, humedad que es proporcionada por los túbulos dentinarios<sup>30</sup>. De acuerdo a lo relatado por Koch (2010), al contener la dentina un 20% de agua en relación a su volumen, esta agua sería la que inicia el proceso de fraguado del cemento y la consecuente formación de hidroxiapatita. De esta manera, si el canal después del secado final quedara húmedo, no se vería afectada de manera negativa su capacidad de sellado. El ser hidrofílico, tener un tamaño de partícula pequeño, y adherirse de manera química a la dentina le otorga buenas propiedades hidráulicas.<sup>30</sup>

- **Biocompatibilidad:** La viabilidad de células de pulpa dental humana en un ensayo de CCK-8, expuestas a diferentes concentraciones de BioAggregate y MTA (no diluido 1:2, 1:4) mostraron que estadísticamente el BioAggregate tiene mayor viabilidad celular que el del control a las 24 horas ( $P < 0,01$ ) y 48 horas ( $P < 0,05$ ). El BioAggregate mostro la viabilidad celular similar a la del grupo de control a las 72 horas. Por el contrario la viabilidad celular de



las tres concentraciones de MTA fue ligeramente menor que la del grupo de control a las 72 horas. La viabilidad celular del BioAggregate no diluidas fueron significativamente más altos que los de MTA sin diluir durante todos los periodos experimental ( $P < 0,01$ ). La dilución de BioAggregate 1/2 y 1/4 representada viabilidades celulares superiores a la correspondiente de MTA a las 72 horas (media de dilución,  $P < 0,01$ ; 1/4 de dilución,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en viabilidades celulares entre la dilución 1/2 y 1/4 de extractos BioAggregate y la correspondiente concentración diluida de MTA a las 24 y 48 horas.<sup>31</sup>

La capacidad de adhesión de células de pulpa dental humana tratados con MTA y BioAggragate en diferentes concentraciones (no diluido, 1:2 y 1:4) examinados mediante el uso de placas recubiertas con colágeno de tipo I. dieron como resultado que los no diluidos de BioAggregate, mejoraron significativamente la capacidad de adhesión de las células de pulpa dental humana en comparación con el control ( $P < 0,01$ ) y los grupos de MTA ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, cuando se utilizan las concentraciones 1:2 y 1:4 con BioAggregate, y de MTA mostraron capacidad de adhesión comparable con la del control.<sup>31</sup>

Los efectos de los BioAggregate y el MTA en la migración celular se determinaron realizando una herida in vitro. El tratamiento con BioAggregate y MTA promovió la migración celular de una manera dependiente de la concentración. BioAggregate en sus concentraciones 1:2 y 1:4 mostraron significativamente mayor capacidad de migración que la de la de control. Migración celular del BioAggregate no diluidas fueron significativamente más altos que los de los extractos de MTA no diluidos ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en la migración celular entre los extractos diluidos (1/2 y 1/4) de BioAggregate y la correspondiente concentración diluida de MTA.<sup>31</sup>

- **Uso clínico: :**

Cirugía endodóntica: Estudio in vivo en 94 pacientes con 113 dientes, sometidos a cirugía endodóntica con Biocerámico EndoSequence BC, tratados desde junio 2009 a enero 2013, con un tiempo de seguimiento entre 12 y 33 meses, con una media de 14,5 meses. De los 113 casos, 104 fueron consideradas un éxito, con una tasa de éxito global del 92,0%. 9 dientes que se consideraron fracasos, 5 fueron fracasos radiográficos, y 4 fueron los dientes clínicamente sintomáticos que tenían dolor a la percusión o la palpación o todavía tenía una fístula presente. La enfermedad periapical persistente después del tratamiento endodóntico no quirúrgico es de gran frustración para odontólogo y el paciente. La decisión de elegir entre el retratamiento no quirúrgico y el tratamiento quirúrgico para mantener la salud del diente. Con los nuevos materiales que se introducen constantemente, es necesario recoger la evidencia clínica sobre el rendimiento de estos materiales para ayudar a los odontólogos tomar una decisión informada. EndoSequence BC ha mostrado prometedoras propiedades biológicas y físicas como un nuevo material de retro-obturación. Con el presente estudio retrospectivo se evaluó el resultado de la cirugía después de un mínimo de 1 año mediante el uso de EndoSequence BC como material retro-obturación. Todas las cirugías se llevaron a cabo por un solo operador, reduciendo así las variables relacionadas con el tratamiento que pueden afectar el resultado. Encontramos una tasa de éxito global del 92,0%, lo que es coherente con el rango de tasas de éxito reportado por estudios anteriores que utilizan similares técnicas modernas quirúrgicas. Esta evidencia sugiere que EndoSequence BC es un material adecuado para la retro-obturación para ser utilizado en cirugía endodóntica.<sup>32</sup>

Uso en reabsorciones externas: Hansen S.H. y colaboradores evaluaron el Biocerámico EndoSequence como material obturador en reabsorciones



externas ya que el fabricante describe que el EndoSequence tiene propiedades antibacterianas durante su ajuste reacción debido a un alto pH alcalino. Estas propiedades apoyarían su uso como alternativa del Ca(OH) o MTA en el tratamiento de la reabsorción radicular inflamatoria externa. Debido a que la extensión y la duración del pH elevado en la superficie externa de la raíz no se conocen, el objetivo del estudio fue comparar EndoSequence intracanal y ProRoot MTA blanco (WMTA) (Dentsply Tulsa Especialidades Dentales, Tulsa, OK) en la difusión de iones hidroxilo a través de la dentina. La hipótesis nula probada era que no hay diferencia.<sup>33</sup>

Realizaron mediciones de pH de los materiales inmediatamente antes de su colocación en el canal eran 12,40 (ES), 12,57 (WMTA), 12,36 (Ca [OH]), y 6,52 (solución salina). Después se simuló las reabsorciones externas en cavidades en la superficie de la raíz, el espesor de dentina restante fueron 2 mm y 5 mm osciló de 0,2 a 0,5 mm (media 0,4 mm) y 0,7 a 1,2 mm (media 0,9 mm), respectivamente. Se reportó que el WMTA, EndoSequence, y control positivo, el pH fue significativamente mayor en el nivel de 5 mm en comparación con el nivel de 2 mm ( $p < 0,0001$ , pruebas t pareadas), y por lo tanto los datos de cada nivel se analizaron por separado. En cada uno de los niveles de 2 mm y 5 mm, los cambios de pH significativas se produjeron con el tiempo en el WMTA y EndoSequence (ambos  $p < 0,0001$ , de medidas repetidas análisis de la varianza) y control positivo ( $P < 0,0001$ , prueba de Friedman) y no en el grupo de control negativo ( $P > 0,05$ , prueba de Friedman); valores de pH disminuyeron durante las 24 horas y 1 semana evaluaciones en el grupo EndoSequence y entre los de 1 semana y 2 semanas de evaluaciones en el grupo WMTA. Por 4 semanas, los niveles de pH tanto para el WMTA y grupos EndoSequence fueron similares al control negativo. No hubo diferencias entre los grupos WMTA y EndoSequence en 20 minutos y 3 horas a cualquiera de los niveles de 2 mm y 5 mm y entre WMTA y EndoSequence a las 24 horas en el nivel de 5-mm. En todos los demás puntos de tiempo,



el pH fue significativamente mayor en el grupo WMTA en comparación con el grupo de EndoSequence ( $P < 0.05$  a las 24 horas en el nivel de 2 mm, todos los demás  $P < 0,0001$ , pruebas t pareadas). Los dientes al ser observados bajo 5X a las 4 semanas mostró la obturación completa del espacio del canal, tanto en el Niveles de 2 mm y 5 mm, el WMTA y EndoSequence mostrando una consistencia dura al sondaje con la punta de un explorador. Las muestras de control positivo contenían sobrepuesta pasta blanca de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en los niveles examinados.<sup>33</sup>

Este estudio in vitro demostró que había diferencias tiempo- y raíz de nivel-dependiente entre ES intracanal y WMTA en materia de difusión de iones hidroxilo a través de la dentina radicular. Aunque ambos materiales mostraron difusión de iones a través de la dentina, este efecto fue menos pronunciado más cerca del vértice y se mantuvo durante una duración más larga en el grupo WMTA. La hipótesis nula fue rechazada.<sup>33</sup>

En el período de observación de 24 horas, se observó que algunas de las muestras de raíces WMTA había decolorado. Por 1 semana, todas las muestras de raíces WMTA habían decolorarse, mientras que todas las muestras ES mantuvieron su color original durante todo el período de estudio. Estos hallazgos son consistentes con los informes anteriores<sup>(37, 38)</sup> y podría tener importancia clínica en cuanto a la estética, sobre todo en los dientes anteriores. En ausencia de estudios clínicos a largo plazo, el apoyo a los diferentes protocolos y materiales para la reabsorción radicular inflamatoria se basa en información de los estudios in vitro, tales como la evaluación de la difusión de los iones hidroxilo a través de defectos de raíz dentina (17, 18, 21, 25, 33). En este estudio, la colocación intracanal tanto WMTA y ES dio lugar a la difusión de los iones hidroxilo a través de la dentina que se mantuvo durante un período más largo en el grupo WMTA. En el grupo ES, valores de pH disminuyeron durante las 24 horas y 1 semana evaluaciones en comparación con 1 semana y 2 semanas en el

grupo WMTA. Por 4 semanas, los niveles de pH tanto para WMTA y ES fueron similares al control negativo. <sup>33</sup>

#### **1.4.6. MARCO REFERENCIAL**

La preservación de la vitalidad pulpar se da al realizar procedimientos en los cuales se conserva la pulpa, como lo son el recubrimiento pulpar directo y la pulpotomía, los cuales generaran la formación de dentina reparativa, siendo este el mecanismo de defensa inicial. <sup>34-36</sup>

La pulpotomía es la amputación de la pulpa coronal, dejando con vitalidad el tejido pulpar de los conductos radiculares, es importante que la pulpa esté en condiciones de salud ya que esta ayudara sanar y preservar el diente. <sup>34-36</sup>

El recubrimiento pulpar directo, es la manera de proteger la injuria hecha a la pulpa con materiales especiales, con el objetivo de ayudar a conservar la pulpa preexistente y ayudar en su proceso de cicatrización. <sup>34-36</sup>

Se indica esta terapia cuando la exposición es dado por causas mecánicas, la exposición es pequeña y la pulpa se encuentra con salud, cuando existe un aislamiento absoluto del diente, el diente es asintomático, y cuando existe una exposición dada por un trauma dento alveolar (fractura complicada de la corona. <sup>34-36</sup>

Al realizar estos procedimientos se necesita un material ideal que debe ser inocuo al tejido pulpar, promover la curación, bactericida. <sup>34-36</sup>

En un inicio Buckley, en 1904, introdujo el uso de formocresol en terapia pulpar vital, que consistían en una mezcla de formaldehído (19%) y cresol (3,5%) en una base de glicerina y agua (15%). Sin embargo, en otras publicaciones, la fórmula se describe como la mezcla de formaldehído (19%), tricresol (35%), glicerol (15%) y agua o simplemente como la mezcla a partes iguales de formalina y tricresol,



posteriormente Sweet en 1930 modifico <sup>8-10</sup> modifico la técnica propuesta por Buckley. Se incluyó en la técnica el uso de eugenol, ya que tiene propiedades analgésicas, realizar el tratamiento de pulpotomia en una cita, y recomendó usar en la cámara pulpar durante 3 a 5 minutos formocresol en un vehículo de glicerina, finalmente ubicar a nivel del piso de cámara pulpar óxido de zinc eugenol. <sup>8-20-21</sup>

La técnica presenta los siguientes pasos para su éxito:

Realización de Anestesia local, ubicar el aislamiento absoluto, retiro de caries, retiro del techo de la cámara pulpar mediante fresa de alta velocidad e irrigación con agua estéril y tallado del diente para posterior restauración, extracción de la pulpa coronal con fresa redonda o cucharilla afilada, con agua estéril limpiar la cámara pulpar, cuando se presenta hemorragia con torundas de algodón estéril, y agua destilada, y cuando la hemorragia no se controla se debe detener el procedimiento, ubicar en cámara pulpar con una torunda de algodón con formocresol por 3 o 5 minutos, se realiza una comprobación de la fijación tisular, cuando se ve un cambio de color en los orificios de la pulpa radicular y no se presenta hemorragia, se ubica a nivel de la cámara pulpar el óxido de zinc eugenol, finalmente realizar una obturación definitiva, se recomienda en dientes que se les han realizados pulpotomias poner una corona completa de metal en dientes posteriores y en dientes anteriores forma plásticas <sup>22-23</sup>

En 1930 Hermann introduce en uso del hidróxido de calcio como material de recubrimiento pulpar directo, donde Hermann comprobó que el uso de este material lograba la formación de dentina terciaria, sobre las zonas donde se aplicaba el hidróxido de calcio y se demostró la presencia de un puente de dentina. Se consideró el hidróxido de calcio como el material estándar, pero la formación de puente dentinal puede presentarse bajo varios materiales de recubrimiento pulpar y con el hidróxido de calcio este puente de dentina es muy débil, lo cual puede perjudicar el éxito de la terapia. <sup>34-36</sup>



Sin embargo, recientemente ha sido usado el mineral trióxido agregado (MTA). El MTA es un cemento de silicato bioactivo que ha demostrado ser un efectivo material de recubrimiento pulpar, el material es exitoso debido a su pequeño tamaño de la partícula, capacidad de sello, pH alcalino cuando se instala y lenta liberación de iones de calcio. Los estudios recientes que examinaron las pulpotomías parciales o el recubrimiento pulpar directo que utilizaba MTA en humanos han demostrado resultados favorables a corto plazo. De acuerdo a un estudio realizado, afirmamos que el agregado de trióxido mineral (MTA) es el material opcional para el recubrimiento pulpar.<sup>34-36</sup>

Es interesante finalmente señalar que las tasas de éxito con el recubrimiento pulpar directo en el campo de la caries han variado dependiendo de la técnica y de los materiales. En los humanos, las tasas de éxito tienen un rango entre 30 y el 85% en estudios retrospectivos de 2 a 10 años.<sup>34-36</sup>

### **1.4.7. OBJETIVOS**

#### **1.4.7.1. OBJETIVO GENERAL**

Comparar la citotoxicidad del biocerámico con la de MTA, en cultivos celulares de fibroblastos a diferentes periodos de tiempo (4, 24, 48, 72 horas y 1 semana).

#### **1.4.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad del biocerámico en cultivos celulares de fibroblastos pulpaes a diferentes periodos de tiempo (4, 24, 48, 71 horas y 1 semana).
- Conocer el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad del MTA en cultivos celulares de fibroblastos pulpaes a diferentes periodos de tiempo (4, 24, 48, 71 horas y 1 semana).

### **1.4.8. HIPÓTESIS**

#### **1.4.8.1. HIPÓTESIS NULA**

No existe diferencia entre el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad entre el Biocerámico y el MTA

#### **1.4.8.2. HIPÓTESIS ALTERNA**

Existe diferencia entre el comportamiento, viabilidad y citotoxicidad entre el Biocerámico y el MTA.

## **2. ASPECTOS METODOLÓGICOS**

### **2.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio experimental *in vitro*

### **2.2. OBJETO DE ESTUDIO**

Viabilidad celular del Mineral Trióxido Agregado Vrs Biocerámicos

### **2.3. UNIDAD DE OBSERVACIÓN**

Tejido pulpar, células fibroblastos

### **2.4. MUESTRA**

Se obtuvieron 3 cultivos celulares de una línea celular de fibroblastos de pulpa dental humana, suministrada a través del centro de investigación UIBO de la Universidad El Bosque y se dividieron en los siguientes grupos

- Cultivo de fibroblastos sin material, Grupo Control
- Cultivo de fibroblastos expuestos al MTA
- Cultivo de fibroblastos expuestos al Biocerámico

### **2.5. VARIABLES**

#### **2.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE**

- Citotoxicidad
- Muerte celular

#### **2.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE**

- Tiempo
- Mineral Trióxido Agregado
- Biocerámico



### 2.5.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| Variable       | Definición Conceptual                                                                                   | Definición Operacional                                                  | Tipo de variable          | Indicador                                               | Escala de Medición |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|
| Citotoxicidad  | Capacidad de un agente para destruir ciertas células.                                                   | Citotoxicidad medida por el ensayo de Rezasurina                        | Dependiente Cualitativa   | Inducida<br>No Inducida                                 | Nominal            |
| Muerte Celular | Momento en el que las funciones vitales y las reacciones químicas de su metabolismo celular se detienen | Pérdida de estructura o Energía en la célula por causa de un compuesto. | Dependiente Cualitativa   | Necrosis                                                | Nominal            |
| Tiempo         | Período determinado durante el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento.             | Tiempo definido para la realización de las pruebas de citotoxicidad     | Independiente Ordinal     | 4 Horas<br>24 Horas<br>48 horas<br>72 Horas<br>1 semana | Ordinal            |
| MTA            | Mineral Trióxido De Agregado                                                                            | Compuesto de uso en tratamientos de endodoncia                          | Independiente Cualitativo | Viabilidad                                              | Nominal            |

## **2.7. PROCEDIMIENTO**

### **2.7.1. CULTIVOS CELULARES**

Se realizaron las pruebas con línea celular de fibroblastos de pulpa dental humana, del centro de investigación UIBO

### **2.7.2. ENSAYO DE LINEALIDAD**

Se realizó un ensayo de linealidad celular, por medio del cual se conoció la densidad celular ideal para realizar las pruebas de citotoxicidad. Para ello se evaluaron diferentes densidades desde 2.000 hasta 20.000 células por pozo, se evaluaron tres tiempos (24, 48 y 72 horas). Después de este tiempo de incubación las células fueron sometidas a tinción con resazurina 4.4  $\mu$ M, y se procedió a realizar la lectura en el equipo TECAN GENIOS a una longitud de onda de excitación de 535 nm y 595 nm de emisión.

### **2.7.3. PREPARACIÓN DEL BIOCERÁMICO Y MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO**

Los materiales Biocerámico y el Mineral Trióxido Agregado se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante bajo condiciones de esterilidad. El Biocerámico su presentación comercial es en jeringas que permite la dosificación del mismo, el Mineral Trióxido De Agregado (MTA) se prepara inmediatamente antes de su utilización. La mezcla del polvo se realizó con agua estéril en una proporción de 3:1, en loseta estéril, con espátula de metal, luego del espatulado por un minuto, fue suficiente para hidratar todas las partículas del polvo y darle al material una consistencia cremosa. Este material tiene un tiempo de trabajo de cuatro a cinco minutos. La mezcla se lleva con un transportador de metal hasta los cultivos experimentales.

### **2.7.4. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células por pozo en 100 ml de medio de crecimiento. Después de 24 horas de

incubación, las células fueron sometidas a dos tratamientos diferentes. Se establecieron tres grupos experimentales: grupo control (células sin estímulo), grupo Mineral Trióxido Agregado, y grupo Biocerámico. Se llevaron las células para el ensayo de rezasurina, para realizar la prueba de citotoxicidad del Biocerámico y Mineral Trióxido Agregado, en los fibroblastos pulpares.

#### **2.7.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD (RESAZURINA)**

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en placas de 96 pozos, en el cual se encontraban las células 10.000 células/pozo en un volumen de 100 µL/pozo, Se evaluaron tres grupos (cinco repeticiones por tratamiento), grupo 1: control cultivo sin ningún material experimental, grupo 2: cultivo expuestos al MTA, grupo 3: cultivo expuestos al Biocerámico. Se clasificaron las cinco placas de acuerdo con los tiempos de lectura: 4, 24, 48, 72 horas y una semana, en los cuales se evaluó el grado de citotoxicidad por medio del test de Resazurina (ensayo fluorométrico para la viabilidad celular y la proliferación). La lectura se realizó con el lector TECAN GENIOS a una longitud de onda de excitación de 535 nm y 595 nm de emisión.

#### **2.7.6. MÉTODO ESTADÍSTICO:**

Posterior a las observaciones en el microscopio los resultados fueron sometidos a una Prueba de t student y análisis de varianza factorial (A x B), para lo cual se utilizó el Software **SPSS 20**, en el estudio se consideró que no existían diferencias estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ , igualmente se manejó un nivel de confianza de 95%.



### 3. RESULTADOS

Para este estudio y según la metodología se efectuó ensayo de citotoxicidad, con el test de Resazurina, para lo cual se realizaron tres cultivos, correspondiente ha: Control, MTA y Biocerámico, los cuales se analizaron en cinco tiempos post exposición:

Tiempo 1 a las 4 Horas

Tiempo 2 a las 24 horas

Tiempo 3 a las 48 horas

Tiempo 4 a las 72 horas

Tiempo 5 a la semana.

Para el tiempo 1 (4h), se obtuvieron resultados de viabilidad celular del 55,8% para el MTA y del 64,9% para el Biocerámico, en comparación con el control que representa el 100%. Se comprueba la igualdad estadística en las varianzas con el test de Levene trabajado con  $p > 0.05$ , siendo los valores  $p$ : ,299 y ,304, con nivel de confianza del 95% se puede concluir que no hay diferencias estadísticamente representativas entre los dos materiales. (Figura.6). Mediciones realizadas bajo observación en microscopio invertido Zeiss (Axiovert 40CFL) y el software Zen 2012; analizando cambios morfológicos en las células, así como espacios sin células (Figura.7)

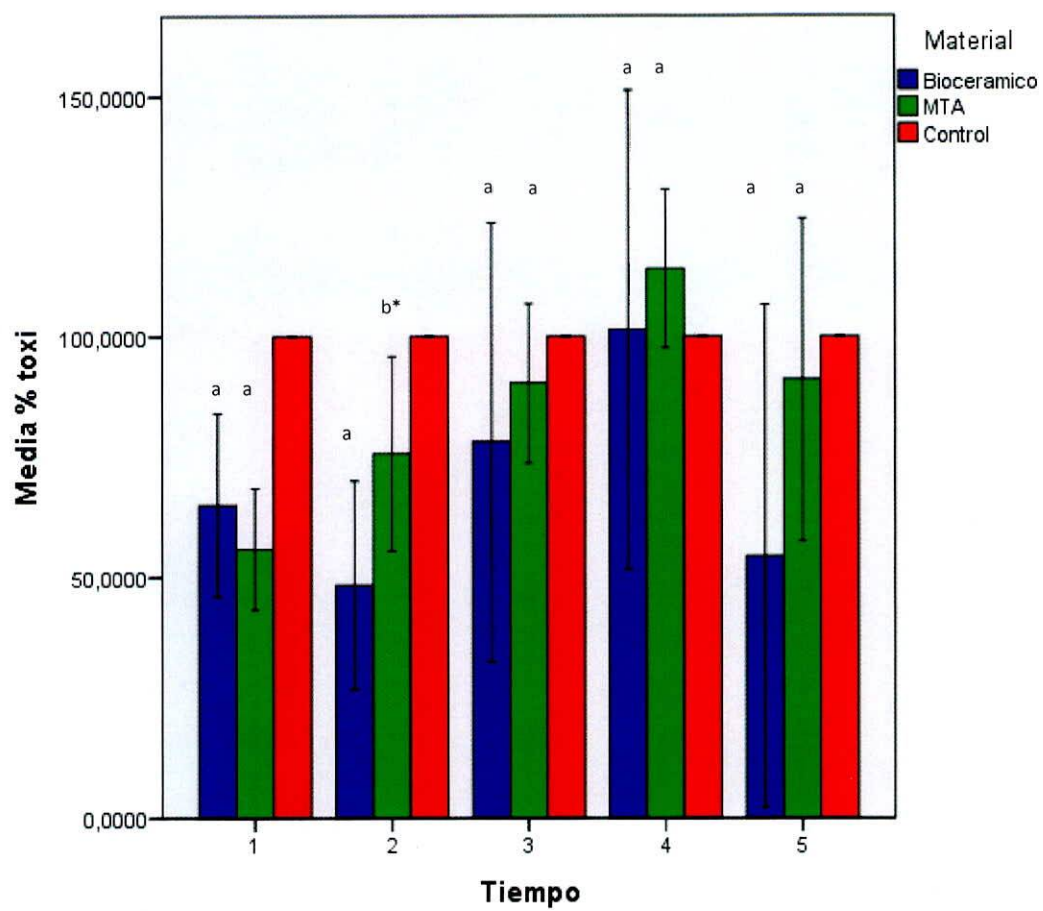
Para el tiempo 2 (24h), la viabilidad celular fue 75,6% para el MTA y 48,3% para el Biocerámico, comparado con el grupo control de 100%. Se evidencia igualdad de varianzas con el test de Levene con  $p > 0.05$ , siendo los valores  $p$ : ,034 y ,034 , y nivel de confianza del 95%, concluyendo que muestran diferencias en promedio entre los dos materiales siendo mayor el tratado con MTA. (Figura.6). Observación de células bajo el microscopio invertido (Figura.7)

Para el tiempo 3 (48h), la viabilidad celular fue 90,2% para el MTA y 78,1% para el Biocerámico, comparado con el grupo control 100%. Se comprueba la igualdad

de varianzas con el test de Levene con  $p > 0.05$ , siendo los valores  $p$ : 507 y 518, con nivel de confianza del 95% se concluye que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos materiales a las 48 horas post aplicación al cultivo. (Figura.6). se toma fotografía bajo microscopio invertido, después de realizar la prueba de viabilidad celular (Figura.8)

Para el tiempo 4 (72h) la viabilidad celular fue 114,1% para el MTA y 101,4% para el Biocerámico, comparado con el control. Se comprueba la igualdad de varianzas con el test de Levene con  $p > 0.05$ , siendo los valores  $p$ : ,519 y 531, con nivel de confianza del 95%, se concluye que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos materiales a este periodo de tiempo. (Figura.6). Fotografía bajo microscopio invertido de los cultivos celulares. (Figura.8)

Para el tiempo 5, cultivos expuestos y, leídos a la semana, la viabilidad celular fue 91,0% para el MTA y 64,4% para el Biocerámico, comparado con el control (100%). Se demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en las varianzas con el test de Levene con  $p > 0.05$ , siendo los valores  $p$ : ,140 y 141, un nivel de confianza del 95%, (Figura.6). Con un nivel de confianza del 95%, se concluye que no existen diferencias entre los materiales  $p > 0.05$ , debido a que se observan que los dos mantienen viabilidad celular similar, sin diferencias estadísticamente significativas, en cambio hay diferencias entre los tiempos, dado que el tiempo cuatro (72h) es diferente a los demás tiempos evaluados dado que la viabilidad de ambos materiales incrementó.



\* Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con ANOVA de una vía.



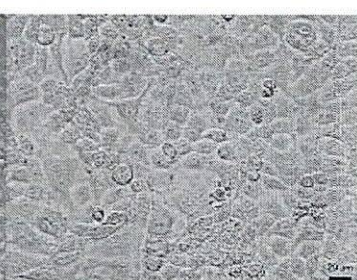
CELULAS



10X



20X



40X

INMEDIATO

CONTROL



10X

MTA



10X

BIOCERAMICO



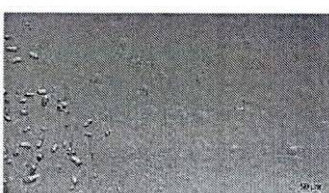
10X



20X



20X



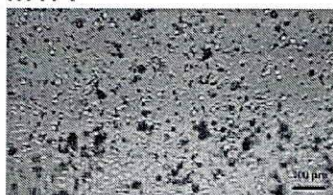
20X

CONTROL



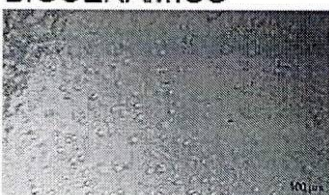
10X

MTA



10X

BIOCERAMICO

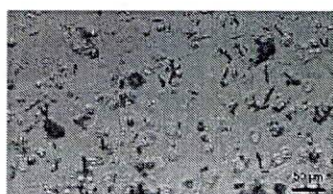


10X

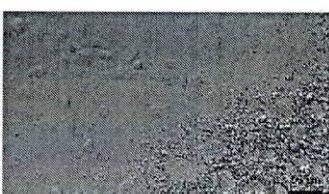
24 HORAS



20X

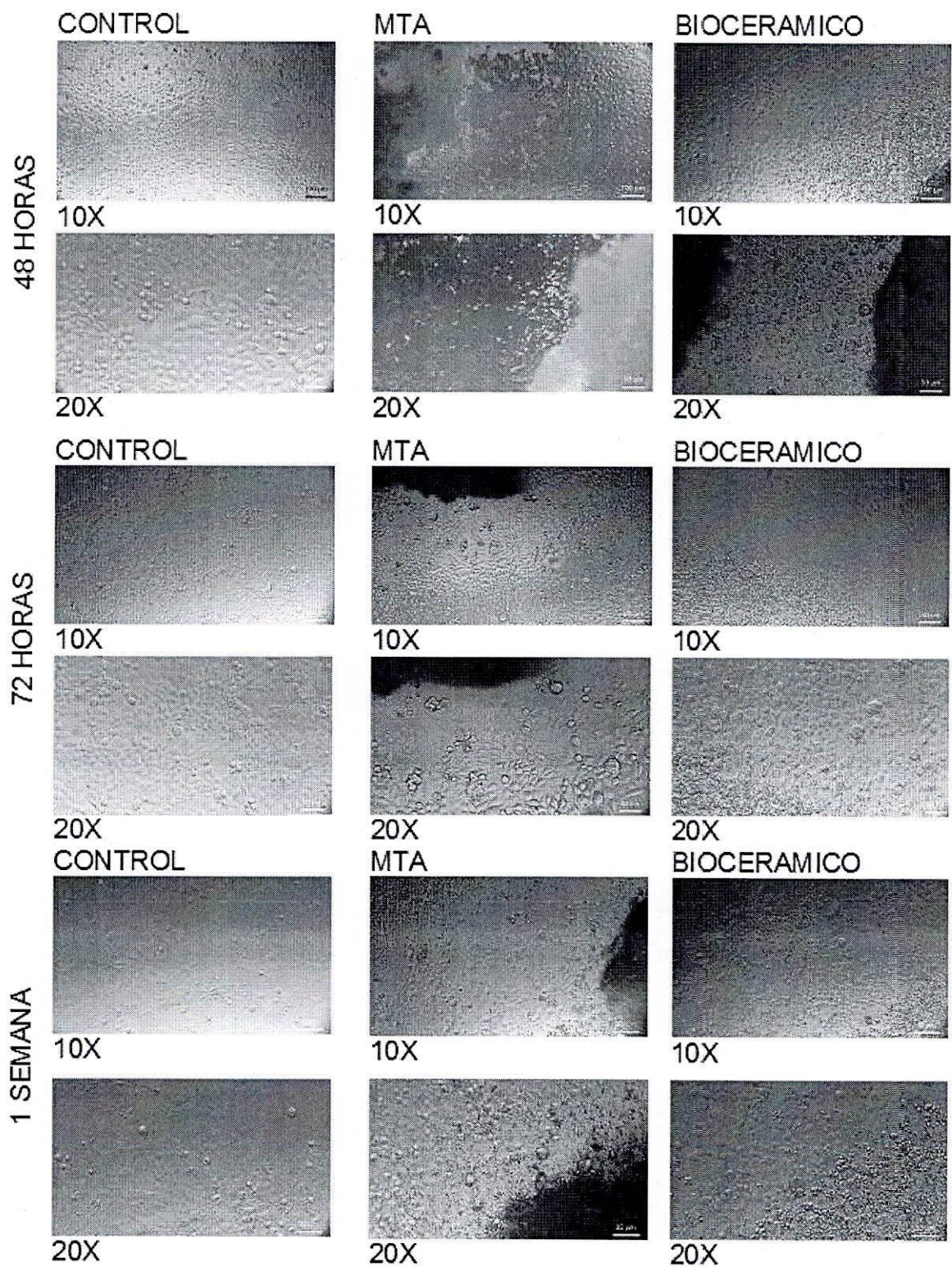


20X



20X







#### 4. DISCUSIÓN

El presente ensayo de citotoxicidad no mostró ninguna diferencia significativa en relación al patrón de citotoxicidad entre MTA y el Biocerámico para todos los tiempos experimentales, ( $p > 0.05$ ) definido como diferencia estadísticamente significativa, por tal razón la hipótesis nula es aceptada, así como las hipótesis alternas se rechazan.

En esta temática se pueden citar investigaciones como la de Hirschman y colaboradores<sup>23</sup> quienes evaluaron la viabilidad celular in vitro, de fibroblastos de dermis humana con 4 materiales dentales AMTA, ERRM, UBP, y Dycal, demostrando que el ERRM era más tóxico que el AMTA a las 48 horas, pero fue igual a los 5 días y menos tóxico en 8 días. En el presente estudio el MTA y el Biocerámico, se comportaron de maneras similares y a las 72 horas mostrando un aumento de la viabilidad celular, respecto a los otros 4 tiempos, sin embargo no se consideró estadísticamente significativa.<sup>23</sup>

Ma y col<sup>34</sup> observaron que la viabilidad celular de fibroblastos se correlacionó significativamente con el tipo de material, el tiempo de fraguado, y tiempo de incubación. Se evidenció la viabilidad de fibroblastos expuestos con ERRM masilla, ERRM pasta, MTA e IRM y Cavit G, demostrando que las células expuestas a ERRM masilla y MTA presentaron altos niveles de viabilidad celular en todas las concentraciones, mientras que las células expuestas a IRM y Cavit G, mostraron las viabilidades más bajas. De esta manera, la viabilidad celular con ERRM pasta, fue ligeramente inferior a las altas concentraciones del ERRM masilla y MTA, pero similar, en concentraciones de extracto inferiores.<sup>37</sup>

Liu y colaboradores<sup>14</sup> evaluaron el efecto de Biocerámico en la proliferación de las células de la pulpa dental humana (hDPCs). Evidenciando un óptimo crecimiento celular, incluso en el lugar en contacto con Mineral Trióxido Agregado o Biocerámico. El ensayo MTT se empleó para investigar la proliferación de hDPCs. La proliferación de hDPCs en el grupo de MTA mejoró en los días 5 y 7, mientras que Biocerámico aumentó el número de células en los días 1 a 7. Biocerámico



mejorando la proliferación significativamente de hDPCs los días 1 y 3 en comparación con MTA. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio donde se evidencia que la viabilidad celular se incrementó con el tiempo de exposición, no obstante a la semana comenzó a disminuir.<sup>14</sup>

De-Deus y colaboradores<sup>35</sup> en el 2009 analizaron la citocompatibilidad de un biocerámico con las células mesénquimales primarias humanas, en un modelo in vitro con raíces de premolares, teniendo en cuenta tres grupos MTA, Biocerámico y control encontrando que la viabilidad celular medida por los estándares XTT, NR, y CVDE después de 24 horas en cultivo con MTA o con Biocerámico no hubo ninguna diferencia estadística en cualquiera de los tiempos experimentales 24, 48 y 72 horas. El presente estudio arrojo resultados similares donde a los diferentes tiempos post exposición, 4, 24, 48, 72 y una semana entre los dos materiales estudiados no se encuentra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la viabilidad celular, cabe resaltar que a las 24 horas donde se observó que existe diferencia mayor que los demás tiempo sin embargo, frente al  $p > 0.05$  definido no se puede considerar estadísticamente significativa, siendo el Mineral Trióxido Agregado presenta mayor viabilidad celular con respecto al Biocerámico.<sup>38</sup>

De-Deus y colaboradores<sup>11</sup> en el 2012 evaluaron la citocompatibilidad del, Mineral trióxido agregado y el Biocerámico en osteoblastos donde se demostró que el Mineral trióxido agregado mostró un patrón de citocompatibilidad muy similar al grupo control negativo. Por otra parte, Mineral trióxido agregado no tuvo ningún efecto en función del tiempo, ya que la viabilidad celular se mantuvo estable después de 48 h post-exposición. El Biocerámico mostró resultados similares a Mineral trióxido agregado y el grupo de control negativo a las 24 h de la exposición. Sin embargo, Biocerámico disminuyó la viabilidad celular significativamente más que los otros dos grupos después de 48 h de exposición. Respecto al presente estudio se observó que la viabilidad celular si tuvo cambios

de acuerdo al tiempo y siempre varió a medida que aumentaban las horas después de la exposición y que su punto más alto fue a las 72 horas.<sup>11</sup>

Al evaluar el grado de citotoxicidad de los dos materiales biocerámicos y MTA, se comprueba que no hay diferencias ( $p>0.05$ ) en promedio entre los dos materiales en los tiempos de evaluación 4, 48, 72 horas y una semana post aplicación al cultivo, pero a las 24 horas sí se presentaron diferencias significativas entre los materiales. Con el análisis de varianza y con un nivel de confianza del 95%, se encontró que no hay efecto de los materiales ( $p>0.05$ ), en cambio hay efecto del tiempo dado que a las 72h la viabilidad de ambos materiales aumento.

El presente estudio sugiere, que los fibroblastos mantienen un grado de viabilidad mayor, al ser expuestos con Biocerámico y Mineral Trióxido Agregado, que aumento a medida que pasaron las horas de exposición, siendo el tiempo una

## 5. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio la viabilidad celular con los dos materiales evaluados tienen un comportamiento diferente al tiempo 24 horas post aplicación, además el tiempo tiene un efecto directo sobre la proliferación de los cultivos dado que a las 72 horas aumenta sin importar el material evaluado.

De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio el Mineral Trióxido Agregado y Biocerámico expuestos a cultivos de fibroblastos pulpaes son estadísticamente similares en la no afectación celular, ya que ninguno mostro nivel de citotoxicidad

Los resultados revelaron que el biocerámico presenta una óptima biocompatibilidad con los fibroblastos de pulpa dental, después ser expuestos. Asimismo, el ensayo in vitro de Resazurina demostró que el Mineral Trióxido Agregado y el Biocerámico presentan viabilidad celular similar. Y el biocerámico como el Mineral Trióxido Agregado logra aumentar la viabilidad celular a las 72 horas después de su exposición.



## **6. RECOMENDACIONES**

Con los resultados del presente estudio se sugiere profundizar mucho más en el estudio del biocerámico, realizando estudios tanto in vivo como in vitro para conocer mejor su comportamiento con los tejidos vitales en los cuales se va a trabajar, esto permitirá conocer todas sus características y de tal manera validar su pertinencia como material ideal en recubrimientos pulpar directos, ya que como se pudo demostrar con el presente estudio tiene bajos niveles de citotoxicidad al ser expuestos en cultivos de fibroblastos pulpaes.

Igualmente se recomienda que el Mineral Trióxido Agregado (MTA) se aplique con precaución en recubrimientos pulpaes directos y pulpotomias ya que el estudio evidenció que al contacto inicial este material tiene un gran nivel de citotoxicidad, que aunque no es excesiva si puede llegar afectar el éxito del tratamiento.

## 7. REFERENCIAS

1. Yu C., Abbott P.V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal Supplement*. 2007;52:S4-S16.
2. Smaïl-Faugeron V, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Glenny AM, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth (Review). Copyright © 2014 The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd. 1-196.
3. Caicedo R, Abbott PV, Alongi DJ, Alarcon MY. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Australian Dental Journal* 2006;51:(4):297-305
4. Fuks A. B, Vital Pulp Therapy with New Materials for Primary Teeth: New Directions and Treatment Perspectives. *Fuks Pediatric Dentistry*. 2008; 30: 211-219
5. Smaïl-Faugeron V, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Glenny AM, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth (Review). Copyright © 2014 The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd. 1-196.
6. Dean J.A, Mack R.B, Fulkerson B.T, Sanders B.J. Comparison of electrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2002; 12:177–182
7. Agamy H.A, Bakry N.S, Mounir M. M.F, Avery D.R. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate and Formocresol as Pulp-capping Agents in Pulpotomized Primary Teeth. *Pediatr Dent*. 2004; 26:302-309
8. Jayam C, Mitra M, Mishra J, Bhattacharya B, Jana B. Evaluation and comparison of white mineral trioxide aggregate and formocresol medicaments in primary tooth pulpotomy: Clinical and radiographic study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2014; 32: 13-18

9. Arzu Pinar Erdem A, Guven Y, Balli B, Ilhan B, Sepet E, Ulukapi I, Aktoren O. Success Rates of Mineral Trioxide Aggregate, Ferrico Sulfate, and Formocresol Pulpotomies: A 24-month Study. *Pediatr Dent* 2011;33:165-170
10. Ciasca M, Aminoshariae A, Jin G, Montagnese T, Mickel A. 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. *Journal of Endodontics*. 2012;38:486–489
11. De-Deus G, Canabarro A, Alves G.G, Marins J.R, Linhares A. B. R, Granjeiro J. M. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal*. 2012;45: 508– 513
12. Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z, Yan P. Effect of Bioaggregate on Mineral-associated Gene Expression in Osteoblast Cells. *Journal of Endodontics*. 2010; 36:1145–1148
13. Ross-Pawlina, *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*, editorial medica panamericana. 5 edición. P 182
14. Liu S., Wang S., Dong Y. Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent In Vitro and In Vivo. *Journal Of Endodontics*. 2015;41:652–657
15. M.<sup>a</sup> E. Gómez de ferraris . A. Campos Muñoz. *Histología y embriología bucodental*. 2<sup>a</sup> edición. Panamericana; p. 211-218.
16. Levin L., Law A.S., Holland G.R., Abbott P.V., Roda R.S. Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *Journal of endodontics* .2009;35. 12.1645-1657
17. .AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. *Journal Of Endodontics*. 2009;35.12.1634
18. Casas M.J, Kenny D.J, Johnston D.H, Judd P.L. Long-term Outcomes of Primary Molar Ferric Sulfate Pulpotomy and Root Canal Therapy. *Pediatric Dentistry* . 2014; 26; 44- 48



19. Arzu Pinar Erdem A, Guven Y, Balli B, Ilhan B, Sepet E, Ulukapi I, Aktoren O. Success Rates of Mineral Trioxide Aggregate, Ferrico Sulfate, and Formocresol Pulpotomies: A 24-month Study. *Pediatr Dent* 2011;33:165-170
20. Dean J.A, Mack R.B, Fulkerson B.T, Sanders B.J. Comparison of electrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2002; 12:177–182
21. Bahrololoomi Z, Moeintaghavi A, Emtiazi M, Hosseini G. Clinical and radiographic comparison of primary molars after formocresol and electrosurgical pulpotomy: A randomized Clinical trial. *Indian J Dent Res*.2008; 19: 219-223
22. Hugar S.M, Deshpande S.D. Comparative investigation of clinical/radiographical signs of mineral trioxide aggregate and formocresol on pulpotomized primary molars. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2010;1: 146-151
23. Hirschman W.R., Wheeler M. A., Bringas J.S., Hoen M.M. Cytotoxicity Comparison of Three Current Direct Pulp-capping Agents with a New Bioceramic Root Repair Putty. *Journal Of Endodontics*. 2012;38:385–388
24. Ansari G, Ranjpour M. Mineral trioxide aggregate and Formocresol pulpotomy of primary teeth: a 2-year follow-up. *International Endodontic Journal*. 2010; 43: 413–418
25. Aeinehchi M, Dadvand S, Fayazi S, Bayat-Movahed S. Randomized controlled trial of mineral trioxide aggregate and formocresol for pulpotomy in primary molar teeth. *International Endodontic Journal*, 2007; 40: 261–267
26. Jayam C, Mitra M, Mishra J, Bhattacharya B, Jana B. Evaluation and comparison of white mineral trioxide aggregate and formocresol medicaments in primary tooth pulpotomy: Clinical and radiographic study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2014; 32: 13-18
27. Moretti A.B.S, Sakai V.T, Oliveira T.M, Fornetti A.P.C, Santos C.F, Machado M.A.A.M, Abdo R.C.C. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium

- hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. *International Endodontic Journal*, 2008; 41: 547–555
28. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2004; 14: 417–424
  29. Shumayrikh N.M, Adenubi J.O. Clinical evaluation of glutaraldehyde with calcium hydroxide and glutaraldehyde with zinc oxide eugenol in pulpotomy of primary molars. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15:259-264
  30. Sarkar N.K, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*. 2005; 31:97-100
  31. Zhu L., Yang J., Zhang J., Peng B. A Comparative Study of BioAggregate and ProRoot MTA on Adhesion, Migration, and Attachment of Human Dental Pulp Cells. *Journal Of Endodontics*. 2014;40:1118–1123
  32. Shinbori N., Grama A.M., Patel Y., Woodmansey K., He J. Clinical Outcome of Endodontic Microsurgery That Uses EndoSequence BC Root Repair Material as the Root-end Filling Material. *Journal Of Endodontics*. 2015; 41:607– 612
  33. Hansen S.W., Marshall G., Sedgley C.M. Comparison of Intracanal EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA to Induce pH Changes in Simulated Root Resorption Defects over 4 Weeks in Matched Pairs of Human Teeth. *Journal Of Endodontics*. 2011; 37:502–506.
  34. Bal C., Alacam A., Tuzuner T., Ebru R., Baris E. Effects of Antiseptics on Pulpal Healing under Calcium Hydroxide Pulp Capping: A Pilot Study. *Eur J Dent*. 2011; 5(3): 265–272.
  35. Bogen G, Kim J.S., Bakland L.K. Direct Pulp Capping With Mineral Trioxide Aggregate : An Observational Study. *Journal of the American Dental Association*. 2008; 139: 305–315.
  36. Lovato K.F., Sedgley C.M. Antibacterial Activity of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2011; 37: 1542-1546

37. Ma J., Shen Y., Stojicic S., Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *Journal Of Endodontics* 2011;37:793–798
38. De-Deus G., Canabarro A., Linhares A., Senne M.I., Alves G., Granjeiro J.M. Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells. *Journal Of Endodontics*. 2009;35:1387–1390.