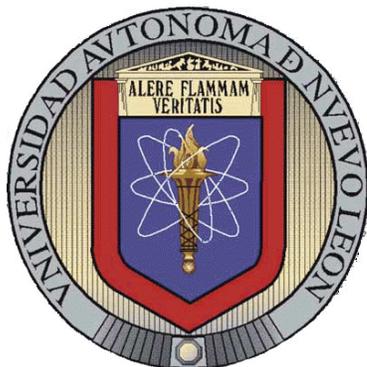


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE TRES CEMENTOS
DE SELLADO APICAL A BASE DE SILICATO
DE CALCIO**

Por

ANDREA LIZETH TREVIÑO CONTRERAS

Como Requisito Para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
CON ORIENTACIÓN EN ENDODONCIA

Octubre, 2014

PAYCIT 2011-2012, Clave: CS1045-11

**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE TRES CEMENTOS
DE SELLADO APICAL A BASE DE SILICATO
DE CALCIO**

Comité de Tesis

Dra. Idalia Rodríguez Delgado
Directora de tesis

Dr. Juan Manuel Solís Soto
Co-Director de Tesis

**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE TRES CEMENTOS
DE SELLADO APICAL A BASE DE SILICATO
DE CALCIO**

C. D. M. S JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
COORDINADOR DEL POSGRADO DE ENDODONCIA

C. D. M. E. O. SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA PHD
SUBDIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
NUEVO LÉON

**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE TRES CEMENTOS
DE SELLADO APICAL A BASE DE SILICATO
DE CALCIO**

APROBACIÓN DE TESIS

LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN ENDODONCIA

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE
Dr. Juan Manuel Solís Soto

SECRETARIO
Dr. (C.D.M.S) Jorge Jaime Flores Treviño

VOCAL
Dra. Idalia Rodríguez Delgado

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a la Dra. Idalia Rodríguez Delgado, mi Directora de Tesis, así como al Dr. Juan Manuel Solís Soto, Co-Director de Tesis, les agradezco por el apoyo, orientación y experiencia que me brindaron día con día, ya que tuve el privilegio de trabajar bajo su dirección durante este estudio de investigación, fuente de aportaciones que se incluyen en esta tesis.

Así mismo, considero pertinente y acertado expresar mi más profundo reconocimiento a la QBP. Karla Jiménez, por el excelente apoyo que me brindó en el área del Laboratorio para poder hacer realidad esta investigación, al ayudarme y orientarme en cada paso del experimento, por su paciencia y por el valioso tiempo que me dedico, ya que gracias a ella aprendí nuevas técnicas en el área de la investigación.

Y en particular un gran agradecimiento al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT 2011-2012, Clave: CS1045-11, UANL) el cual es un apoyo complementario a proyectos de investigación científica y tecnológica que se realizan en la UANL, siendo esta investigación aprobada y apoyada económicamente por dicho programa.

DEDICATORIA

Dedico con todo mi cariño y amor a mis padres Adrian Treviño Rodríguez y Rosa Ma. Contreras Flores, quienes hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

A mi hermana Pamela C. Treviño Contreras y a mi sobrina Jimena G. Treviño Contreras, gracias por compartir su vida, pero sobre todo gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida, las quiero mucho.

A mi abuelita Altagracia que aunque ya no esté físicamente, me bendice y protege desde el cielo.

A Coky, no puedo decirte con palabras lo que significas para mí. Gracias querida tía por todo lo bueno que me has dado desde que era pequeña. Te voy a querer toda mi vida.

También quiero agradecer a mis grandes amigas Liliana Carrizales Muñoz y Nancy Rojas Hernández que de una u otra manera pendientes de mi progreso universitario y personal día con día y brindándome su apoyo incondicional.

A mi novio Edgar Cabrera que a pesar del poco tiempo que hemos estado juntos, ha estado apoyándome en cada momento, siempre con las palabras adecuadas para hacerme sentir bien y feliz.

Y a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Agradecimientos.....	V
Dedicatoria.....	VI
Lista de Tablas.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstrac.....	X
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	2
2.1 Selladores endodónticos a base de Silicato de Calcio.....	4
2.1.1 MTA.....	5
2.1.2 Biodentine.....	6
2.1.3 ERRM Putty.....	7
2.2 Biocompatibilidad.....	7
2.2.1 Pruebas de Biocompatibilidad.....	8
2.3 Respuesta inflamatoria.....	10
2.4 Técnicas Histológicas.....	11
2.4.1 Tinción.....	11
2.4.1.1 Hematoxilina y Eosina.....	12
2.4.1.2 Tricrómico de Masson.....	12
3 Marco de referencia.....	14
4 Hipótesis.....	18
5 Objetivo.....	19
5.1 Objetivo General.....	19
5.2 Objetivos Específicos.....	19
6 Materiales y métodos.....	20
6.1 Descripción del procedimiento.....	20

6.1.1	Inoculación de los cementos.....	20
6.1.2	Toma de Muestras.....	22
6.1.3	Técnica Histológica de Parafina.....	23
6.1.4	Obtención de los cortes.....	26
6.1.5	Tinción del corte histológico.....	28
6.1.5.1	Hematoxilina y Eosina.....	28
6.1.5.2	Tricrómico de Masson.....	29
6.1.6	Montaje de los cortes.....	31
6.1.7	Técnica Inmunocitoquímica.....	32
7	Resultados.....	36
8.1	Hematoxilina y Eosina; Tricrómico de Masson.....	36
8.2	Inmunocitoquímica.....	42
8.3	Análisis Estadístico.....	49
8.3.1	Análisis de la presencia de IL-1 beta.....	49
8.3.2	Análisis de la presencia de TNF-alfa.....	51
8	Discusión.....	53
9	Conclusiones.....	56
10	Referencias Bibliograficas.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anestesia del ratón por medio del éter.....	20
2. Inoculación del cemento.....	21
3. Pigmentación del sitio de la punción.....	21
4. Eliminación del vello.....	22
5. Dislocación cervical.....	22
6. Recolección de muestra.....	23
7. Muestras colocadas en formalina al 10%.....	23
8. Horno.....	24
9. Corte de muestra.....	25
10. Colocación de las muestras en el horno.....	25
11. Acomodo de las muestras.....	25
12. Solidificación de la parafina.....	26
13. Micrótopo HM340E.....	26
14. Realización de cortes de 6 micras.....	27
15. Colocación de cortes en agua destilada a 40°.....	27
16. Colocación del corte en el portaobjeto.....	27
17. Recipientes para llevar a cabo las tinciones.....	28
18. Colocación de las muestras en Hematoxilina.....	29

19. Colocación de las muestras en Eosina.....	29
20. Colocación de la resina sintética.....	31
21. Colocación del cubreobjeto.....	31
22. Muestras teñidas listas.....	31
23. Colocación del pap-pen.....	33
24. Colocación del primer anticuerpo.....	34

Nombre: Andrea Lizeth Treviño Contreras

Fecha de Graduación: Diciembre de 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Endodoncia

Páginas: 63

Título del Estudio: Análisis de Biocompatibilidad de tres cementos de sellado apical a base de silicato de calcio.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Cuando una lesión en el área apical es persistente y la pieza dental no ha respondido a un tratamiento o retratamiento convencional del conducto radicular la cirugía apical está indicada. En dicho tratamiento es de suma importancia la correcta selección del material para la retrobturación, ya que éste estará en contacto con los tejidos periapicales por lo consiguiente deberá presentar una excelente biocompatibilidad.

OBJETIVO: Evaluar la biocompatibilidad de Biodentine y ERRM comparándolos con el MTA.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se utilizaron 16 ratones de la especie *Mus Musculus*, en los cuales se inoculo cada uno de los cementos en la piel de la parte dorsal, se recolectaron muestras a las 24 horas y a los 7 días, las cuales fueron teñidas con Hematoxilina & Eosina y Tricrómico de Masson para evaluar la respuesta inflamatoria, así como también se llevo a cabo la Técnica Inmunocitoquímica para evaluar las células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

RESULTADOS: En cuanto a la respuesta inflamatoria Biodentine y ERRM mostraron solamente una leve presencia de acúmulos de células a las 24 horas las cuales desaparecieron los 7 días después de haber realizado la inoculación de los cementos. Por el contrario el MTA presentó una leve presencia de células inflamatorias hasta los 7 días. Con respecto a la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y al TNF- alfa podemos mencionar que tanto MTA, Biodentine y ERRM si presentaron células positivas, pero estadísticamente estas no fueron significativas.

CONCLUSIONES: Se considera a Biodentine y al ERRM como materiales promesa para los procedimientos dentales clínicos por su buena biocompatibilidad presentada, convirtiéndose en interesantes alternativas al MTA, ya que este último fue el que menos biocompatibilidad presentó en esta investigación.

Director de Tesis: C. D. E. E. M. C. Idalia Rodríguez Delgado PhD

Co-Director de Tesis: Dr. Juan Manuel Solís Soto PhD

ABSTRACT

INTRODUCTION: When a lesion in the apical area is persistent and the tooth has not responded to conventional treatment or retreatment of the root canal apical surgery is indicated. In such treatment is paramount to select the correct material for retrobturación, as it will be in contact with the periapical tissues so therefore must exhibit excellent biocompatibility. **OBJECTIVE:** To evaluate the biocompatibility of ERRM Biodentine and comparing them with the MTA. **MATERIALS AND METHODS:** 16 mice of the species *Mus musculus*, in which inoculum each of the cements in the skin of the dorsal part were used, samples at 24 hours and 7 days were collected, which were stained with hematoxylin & eosin and Masson trichrome to evaluate the inflammatory response and immunocytochemistry out also led to evaluate immunoreactive cells to the proinflammatory cytokines IL-1 beta and TNF-alpha. **RESULTS:** Regarding the inflammatory response and ERRM Biodentine showed only a slight presence of clusters of cells at 24 hours which disappeared 7 days after inoculation made of cements. MTA contrast showed a slight presence of inflammatory cells until 7 days. With respect to the presence of cells immunoreactive to the proinflammatory cytokines IL-1 beta and TNF alpha may be mentioned that both MTA and ERRM Biodentine if presented positive cells, but these were not statistically significant. **CONCLUSIONS:** a ERRM Biodentine and is considered promising materials for clinical dental procedures presented by their good biocompatibility, becoming interesting alternatives to the MTA, since the latter was the least biocompatibility presented in this research.

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento del sistema de conductos radiculares mejor conocido como Endodoncia tiene como objetivos principales la limpieza y conformación adecuadas del conducto radicular, y así poder lograr el saneamiento de los tejidos perirradiculares cuando estos llegaran a estar afectados, cuando la enfermedad periapical es persistente y la pieza dental no ha respondido a un tratamiento o retratamiento convencional del conducto radicular la cirugía apical (apicectomía) está indicada.

La apicectomía es la resección de los últimos 3-5 mm de la porción apical de la raíz, esto para poder eliminar todas las posibles aberraciones anatómicas. Durante el acto quirúrgico es de suma importancia la correcta selección del material de retrobturación, ya que éste estará en contacto con los tejidos periapicales por lo consiguiente deberá presentar una excelente biocompatibilidad, ya que es uno de los principales requisitos que debe tener un material ideal para sellar la retropreparación, así como el extremo del conducto radicular.

Los materiales utilizados para la obturación retrógrada han ido mejorando con el paso de los años, desde la convencional amalgama, la utilización del IRM, el Súper EBA, hasta la incorporación del MTA, que gracias a su excelente biocompatibilidad, a su propiedad osteogénica y otras características presentes, se ha convertido en el material de primera elección para este tipo de casos. Aunque la utilización de este tipo de material tiene como únicas desventajas su difícil manipulación así como su largo tiempo de fraguado, por este motivo han salido al mercado nuevos materiales a base de silicato de calcio para la obturación retrógrada, los cuales presentan mejoras en estas dos propiedades.

Uno de ellos es el Biodentine (Septodont) el cual es un material bioactivo sustituto de dentina, en donde los dos principales beneficios son el tiempo de fraguado reducido y

mejores propiedades mecánicas. Otro nuevo cemento que apareció recientemente es el *EndoSequence Root Repair Materials Putty* (ERRM Putty; Brasseler), este cemento se caracteriza por su presentación en forma de masilla.

Por lo tanto el presente estudio se llevo a cabo para evaluar la biocompatibilidad de Biodentine y ERRM Putty comparándolos con el MTA. Teniendo como hipótesis que los nuevos cementos selladores Biodentine y ERRM Putty, tienen igual biocompatibilidad que el cemento sellador a base de MTA.

La investigación es de carácter experimental, puesto que el investigador controla los eventos, abierto ya que todos los investigadores conocen las variables del experimento, comparativo porque se estudiaran más de dos muestras, longitudinal ya que se obtendrán datos del mismo sujeto en más de una ocasión y prospectivo debido a que todos los datos obtenidos serán de eventos que ocurran en el futuro.

2. ANTECEDENTES

El objetivo principal del tratamiento endodóntico es limpiar y desinfectar el sistema de conductos radiculares, reduciendo la carga bacteriana y la eliminación del tejido necrótico, creando así un entorno en el que el restablecimiento de la zona periapical pueda ocurrir. La mayoría de los fracasos en el tratamiento de conductos se deben a la pobre desinfección de éstos, la realización de un retratamiento es lo más factible para estos casos, pero si esto no se pudiera lograr, será necesario recurrir a la cirugía endodóntica. (Rhodes, 2006).

La apicectomía es la resección apical de los últimos 2-3 mm. de la porción apical de la raíz. Los objetivos de la apicectomía son: eliminar los conductos radiculares accesorios; así como la porción del conducto no tratado y los ápices frenestrados en la cortical externa, en estos casos se debe llevar a cabo la realización de una obturación retrógrada del conducto radicular (Cambra, 1996).

El objetivo de la realización de una obturación retrógrada es conseguir un cierre hermético y biocompatible en el ápice que impida la filtración de agentes irritantes del conducto radicular hacia los tejidos perirradiculares (Cohen et. al., 2004).

En 1970, Grossman publicó una serie de propiedades ideales de los materiales de retropreparación (Cohen et. al., 2004; Enkel et. al., 2008).

- 1.- Deben ser bien tolerados por los tejidos periféricos.
- 2.- Deben adherirse a la estructura dental.
- 3.- Deben ser dimensionalmente estables.
- 4.- Deben ser resistentes a la disolución.
- 5.- Deben favorecer la cementogénesis.
- 6.- Deben ser bactericidas o bacteriostáticos.
- 7.- No deben ser corrosivos.

- 8.- Deben ser electroquímicamente inactivos.
- 9.- No deben teñir los dientes ni las estructuras dentarias.
- 10.- Deben ser fácilmente manejables.
- 11.- Deben permitir un tiempo de trabajo adecuado y un ajuste rápido.
- 12.- Deben ser radiopacos.

Prácticamente todos los materiales de restauración concebibles han sido utilizados en algún tiempo como un material de relleno retrógrado (Rhodes, 2006).

La amalgama fue uno de los materiales más antiguos que se llegó a utilizar, sin embargo ésta presentó importantes desventajas, como un mayor tiempo de fraguado, dimensionalmente inestable, la corrosión provocaba filtraciones y teñía los tejidos blandos (Cohen et. al., 2004; Rhodes, 2006).

Por esta razón, la amalgama se fue sustituyendo por diferentes materiales como el IRM, el Súper EBA y el MTA, siendo este último el que ha demostrado ser más prometedor en la retrobturación (Cohen et. al., 2004).

2.1 Selladores Endodónticos a base de Silicato de Calcio.

Anteriormente, muchos de los materiales dentales utilizados para apicoformaciones, pulpotomías y como apósito radicular estaban compuestos de hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$, pero estudios realizados demostraron que el hidróxido de calcio por contacto prolongado con la dentina, afecta negativamente a la fuerza y la resistencia a la fractura, esto trajo muchas desventajas al utilizar estos materiales endodónticamente, por esta razón los materiales a base de silicato de calcio sustituyeron a los de hidróxido de calcio como materiales de reparación de endodoncia debido a su sellado superior, la biocompatibilidad, y capacidad regenerativa. Sus propiedades antibacterianas se atribuyen a su liberación de $Ca(OH)_2$ en la hidrólisis superficial de los componentes de silicato de calcio (Allen et. al., 2012).

Los selladores endodónticos a base de silicato de calcio están basados en el cemento Portland, esto quiere decir que todos estos cementos están compuestos de silicato de Calcio (C_3S+C_2S), aluminatos de Calcio (C_3A), alumino-ferritos de Calcio (C_4AF), sulfatos de Calcio ($CaSO_4$ -gypsum), juntos con bajas concentraciones de impurezas metálicas derivadas de minerales naturales usando materiales crudos (Enkel et. al., 2008).

El uso de los selladores a base de silicato de calcio en la odontología se popularizó con la llegada del Agregado de Trióxido Mineral (MTA) en 1993 como material de relleno del extremo radicular, para la reparación de perforaciones laterales y aquellas localizadas en la furca (Ribeiro et. al., 2005; Shahria et. al., 2006).

2.1.1 MTA

El Agregado de Trióxido Mineral (MTA) se introdujo por primera vez por Torabinejad en 1993 como un material de relleno del extremo radicular en la cirugía endodóntica (Zmener et. al., 2012).

Este ha sido reconocido como un material bioactivo que es conductor de tejido duro, tejido inductivo duro, y biocompatible. Su composición química es similar a la del cemento Portland, componiéndose de 53.1% de silicato tricálcico, 22.5% de silicato dicálcico, 21.6% de óxido de bismuto, y pequeñas proporciones de aluminato tricálcico y sulfato de calcio. El MTA se comercializa actualmente en dos formas, gris (GMTA) y blanco (WMTA) (Ryan et. al., 2010). En contacto con el tejido perirradicular, el MTA forma un tejido conjuntivo y cemento, causando la aparición de bajos valores de inflamación (Cohen et. al., 2004).

Aunque la utilización del MTA tiene como desventajas su difícil manipulación y su largo tiempo de fraguado, presenta un cierto número de ventajas, entre las cuales están:

- 1.- Es el menos tóxico de los materiales de obturación.

2.- Tiene una excelente biocompatibilidad.

3.- Es hidrófilo.

4.- Es radiopaco.

El MTA se desarrolló y recomendó inicialmente como un material de relleno en el ápice radicular y, posteriormente, se ha utilizado para recubrimiento pulpar, pulpotomía, apexogénesis, formación de la barrera apical en dientes con ápices abiertos, reparación de perforaciones radiculares, y como material de obturación del conducto radicular (Torabinejad et. al., 1999).

2.1.2 Biodentine

Actualmente, los materiales basados en silicato de calcio son reconocidos por su biocompatibilidad y por ser inductores de tejidos mineralizados, sin embargo, sus propiedades mecánicas no son la ideales y su manipulación es difícil. El principal objetivo de los fabricantes, fue 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 (Cedillo, 2013).

Biodentine es un nuevo material bioactivo sustituto de dentina que esta compuesto de silicato tricálcico, carbonato de calcio, óxido de zirconio en polvo y un líquido a base de agua que contiene cloruro de calcio como acelerador de fraguado y reductor de agua del agente (JingzhiI et. al., 2011). Este 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 (Cedillo, 2013).

Este nuevo material fue desarrollado inicialmente como un material de restauración. Los 2 principales beneficios para Biodentine sobre otros productos son el tiempo de fraguado reducido y mejores propiedades mecánicas (Pradelle, 2009).

La formación de dentina ha sido demostrada en ratas, exhibiendo una gran cantidad y calidad de dentina en los recubrimientos pulpaes directos. En los casos de las pulpotomías en cerdos, la biocompatibilidad con la pulpa permite un contacto directo con fibroblastos. La Biodentine es utilizada como: base cavitaria para composite, recubrimiento pulpar directo, material reparador endodóntico, perforación, pulpotomía, obturación retrógrada y apexificación (Septodont, 2010).

2.1.3 ERRM Putty

Recientemente se introdujo al mercado un nuevo material para la obturación retrógrada de la raíz: el *EndoSequence Root Repair Materials Putty* (Material de reparación radicular en masilla) (ERRM Putty; Brasseler, Savannah, GA). Este nuevo material está compuesto de silicatos de calcio, fosfato de calcio monobásico, óxido de zirconio, óxido de tántalo y agentes espesantes. Estudios realizados afirman que este material es biocompatible e hidrófilo. Según el fabricante el ERRM Putty tiene un pH alto (Amer et. al., 2010).

2.2 Biocompatibilidad

Biocompatibilidad de un material dental es un factor importante que debe ser tomado en consideración específicamente cuando se utiliza en recubrimiento de la pulpa, la reparación de perforación o como un relleno retrógrado. Durante los procedimientos antes mencionados, el material está en contacto directo con el tejido conectivo y tiene el potencial para afectar a la viabilidad de las células perirradiculares y pulpaes (Malkondu, 2014).

Durante los últimos años la biocompatibilidad de los materiales dentales se ha convertido en algo fundamental para la creación de nuevos materiales de uso dental (Schamalz et. al., 2009).

En el año de 1987, la Sociedad Europea de Biomateriales definió a la Biocompatibilidad como aquella habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica (Buenahora et. al., 2007). Este tipo de material se conoce como biomaterial el cual se refiere a cualquier material no vital destinado a interactuar con los sistemas biológicos, dentro o sobre el cuerpo humano (Schamalz et. al., 2009).

En los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) tenía la responsabilidad de determinar y evaluar los efectos biológicos de todos los medicamentos, materiales y dispositivos utilizados en seres humanos, incluidos los productos dentales y dispositivos. La FDA también preveía el reconocimiento de las normas establecidas por las organizaciones privadas, como la ANSI / ADA (Alaina et. al., 2012).

Pero para que un material dental obtenga el grado de biomaterial es necesaria la aplicación de pruebas específicas de biocompatibilidad.

2.2.1 Pruebas de Biocompatibilidad

Las pruebas de biocompatibilidad buscan orientar el desarrollo y producción de los materiales dentales, a través de la biotécnica, para que estos guarden equilibrio entre sus propiedades físicas para las cuales son desarrollados, las propiedades biológicas y la relación con la cavidad oral y los tejidos dentarios. Un material odontológico podría ejercer un efecto tóxico o un efecto inmunológico (Humberto et. al., 2006).

Entre 1982 y 1987 el *Council of Dental Materials, Instruments and Equipment of American Nation Standard Institute/ American Dental Association* (ANSI/ADA) aprobó el documento No. 41, donde se indican las prácticas estándar para la valoración biológica de los materiales dentales. Reconociendo la necesidad de disponer de métodos normalizados de prueba y de pruebas secuenciales de los materiales para reducir el número que habrían de probarse en la práctica clínica (Cássio et. al., 2006).

1.- Pruebas Iniciales (Ensayo *In Vitro* e *In Vivo*)

- Citotoxicidad

 - Hemólisis

 - Prueba de Ames (Potencial de mutación)

 - Prueba de Styles (Transformación celular)

 - Toxicidad sistémica vía oral

 - Toxicidad sistémica vía peritoneal

 - Inhalación aguda

2.- Pruebas secundarias

Basándose en los resultados de las pruebas iniciales, los materiales que resulten prometedores son sometidos a una o más pruebas en pequeños animales para estudiar su potencial inflamatorio e inmunógeno.

- Irritación mucosa

- Toxicidad dérmica

- Implantes subcutáneo

- Implantes en hueso

- Implante intramuscular

3.- Pruebas de uso

Los materiales que siguen siendo prometedores son sometidos a estas pruebas *In Vivo*. Estas pruebas permiten identificar todos los efectos de los materiales dentales sobre los tejidos en los que se vaya a utilizar.

- Irritación pulpar

- Recubrimiento pulpar

Uso endodóntico

Implante dental

2.3 Respuesta inflamatoria

Tenemos que la respuesta del organismo frente a una sustancia determinada se expresa por el grado de inflamación que ésta origina; la inflamación es el mecanismo de reacción del tejido vascularizado frente a una agresión local. Existen distintas vías inflamatorias, cada una de las cuales se lleva a cabo a través de una secuencia de eventos biológicos. Muchos de los eventos individuales son controlados por citocinas, quimiocinas u otras moléculas reguladoras pequeñas, éstas son esenciales para la migración leucocitaria desde la circulación hasta sitios de inflamación, que en este contexto se llaman mediadores inflamatorios (Snyderman et. al., 1981).

Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria. Por tanto, el término es aplicable a múltiples tipos diferentes de células. Algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales como las células cebadas y macrófagos; otras células circundantes que penetran a los tejidos sólo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria como son los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y plaquetas. Tres clases de células inflamatorias, neutrófilos, macrófagos y linfocitos son las principales células efectoras de la mayor parte de las reacciones inflamatorias o inmunitarias agudas. Por ello, es importante el uso de materiales obturadores poco tóxicos y por el contrario, estimuladores de la reparación ya combatida la infección, para evitar así irritaciones químicas persistentes (Snyderman et. al., 1981).

2.4. Técnicas Histológicas

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico, con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios fotónicos y electrónicos (Montalvo, 2010).

Existen dos formas de llevar a cabo la técnica histológica, ya sea por:

- Procedimientos inmediatos o vitales, en donde
- Procedimientos mediatos o post-vitales, el cual tiene por finalidad preparar células, y órganos precedentes de seres en donde los procesos vitales se han detenido y es necesario conservar la estructura que tenían en vida. Para lograr esto es necesario realizar los siguientes pasos:

- 1.- Toma de muestra
- 2.- Fijación
- 3.- Inclusión
- 4.- Microtomía
- 5.- Coloración o tinción
- 6.- Montaje

2.4.1 Tinción

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora (Montalvo, 2010).

Se denomina sustancia colorante a aquella que puede transferir su color a otro cuerpo. Existen diferentes técnicas y sustancias para llevar a cabo la tinción de los tejidos de muestra, entre las más conocidas están Hematoxilina y Eosina, Azul de

Metileno, la Tionina, la Fuscina entre otros, los cuales algunas se basan en la combinación de sustancias ácidas y básicas.

2.4.1.1 Hematoxilina y Eosina

La coloración de Hematoxilina y Eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos a través del microscopio fotónico. El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azules y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de la Eosina que tiñe componentes básicos (ácidofilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Como resultado se teñirán de azul el nucleó celular y de rosa el citoplasma, la musculatura, los glóbulos rojos y la fibrina (Montalvo, 2010).

2.4.1.2 Tricrómico de Masson

Al igual que otras tinciones tricrómicas, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplea tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

Primeramente, se tiñen las secciones con un tinte ácido tal como la Escarlata de Biebrich. Todos los tintes acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones entonces se tratan con ácido fosfotúngstico y/o fosfomolíbido.

Ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, los ácidos fofotpúngsticos y fosfomolíbdcicos permiten que la Escarlata de Biebrich difunda del colágeno pero no del citoplasma. Los ácidos fofotpúngsticos y fosfomolíbdcicos tienen numerosos grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de Alanina. Como resultado se obtendrá que las fibras de colágeno se teñirán de azul y de color rojo la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular (Montalvo, 2010).

3. MARCO DE REFERENCIA

Muchos investigadores han demostrado que la calidad y la cantidad de unión de las células a los materiales retrolenado podrían ser utilizado como un criterio para la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales.

Varios autores han informado de la propensión de MTA para liberar Ca y su capacidad para formar hidroxiapatita, llegando a la conclusión de que la actividad de la capacidad de sellado y la biocompatibilidad del MTA se atribuye a las reacciones fisicoquímicas que éste presenta (Shahriar et. al., 2006; Sarkar et. al., 2005).

Investigaciones han demostrado que el MTA además de ser biocompatible, no es mutagénico, genotóxico ni carcinogénico (Riberio, 2006). Además, como su biocompatibilidad así como los resultados clínicos favorables han resultado en que siendo el material de elección para las aplicaciones clínicas como recubrimiento pulpar y la obturación del extremo radicular (Torabinejad y Parirokh 2010).

Nair et. al. en el 2008, estudiaron los beneficios del MTA como material de recubrimiento pulpar y confirmó que se han presentado resultados interesantes preliminares en seres humanos, destacando que esto se logró en base con los resultados de su estudio clínico aleatorio en varios modelos animales tales como monos, perros, ratas y ratones.

En un estudio realizado por Hong et al. demostraron que la amalgama conlleva a una inflamación severa y resorción ósea en comparación con el MTA cuando se utilizan para la reparación de la perforación (Amer et. al., 2010).

En otros estudios realizados, Christopher et. al. en 1996, compararon la reacción de los tejidos periapicales en el extremo de la raíz en perros, en donde se utilizó amalgama y MTA, este estudio reveló que la respuesta inflamatoria alrededor de la amalgama es más grave que alrededor del MTA. Otro estudio llevado a cabo por Torabinejad et. al. en 1997, demostró que en comparación a la amalgama, el MTA como material de relleno en los incisivos de monos produce menos inflamación.

En un estudio realizado por Parirokh y cols. compararon las reacciones inflamatorias del uso del MTA gris, MTA blanco y del CEM, esto en tejidos subcutáneos, en donde encontraron que el MTA gris produjo después de 30 días una inflamación significativamente menor en comparación con el CEM y el MTA blanco (Parirokh et. al., 2011).

La citotoxicidad del ERRM y del MTA fueron evaluados en un estudio realizado por Jingzhi et. al. en el 2011, en donde se llegó a la conclusión de que ERRM se muestra similar en la biocompatibilidad in vitro que el MTA, sin embargo los investigadores dan la recomendación de que pruebas como implantación subcutánea y genotoxicidad son necesarias para establecer un punto de vista más general sobre la aplicación clínica de estos materiales (Ryan et. al., 2010; Safavi et. al., 1988).

En la investigación realizada por Amer et. al. en el 2001, se midió la citotoxicidad del ERRM y del MTA cuando los materiales estuvieran totalmente mezclados y fraguados, y se pudo observar que el ERRM tiene una citotoxicidad similar a MTA en ambas situaciones.

Según los resultados del estudio realizado por Hausen en el 2011, demuestra que todos los materiales que se basa en MTA mostraron una citotoxicidad baja e indujeron un bajo nivel de liberación de citocinas. Por lo tanto, EndoSequence Root Repair Material y todos los materiales a base de MTA pueden ser clasificados como materiales dentales biocompatibles y su utilización clínica recomendada (Hausen, 2011).

Por el contrario, en el estudio realizado por Ciasca y cols., en donde compararon las citotoxicidad del MTA y del ERRM, esto en osteoblastos humanos. En donde demostraron que el ERRM y el MTA mostraban niveles mínimos de citotoxicidad, siendo el ERRM ligeramente más citotóxico aunque esto no estadísticamente significativo. Por lo tanto se concluyó que el ERRM y el MTA demuestran similar citotoxicidad (Ciasca, 2011). Así como en el estudio realizado por Galsterer en el 2011, en donde también se demostró que el ERRM y el MTA presentan similar citotoxicidad (Galsterer, 2011).

En cuanto a Biodentine son pocos los estudios realizados en donde se evalúe la biocompatibilidad de este nuevo material, de acuerdo a la casa comercial Septodont de Biodentine, éste presenta menor irritación cutánea, esto comprobado en conejos; así como menos toxicidad, esto comprobado en fibroblastos de humanos (Septodont, 2010).

El estudio clínico realizado por Laurent et al. muestra que el uso del Biodentine como recubrimiento pulpar directo, puede inducir el desarrollo de dentina reparadora (primer signo de formación de barrera mineralizada), y de esta manera conservar la vitalidad de la pulpa dental (Laurent, 2008). En otro estudio los autores concluyeron que este cemento es capaz de estimular la mineralización, de esta manera sus efectos son equiparables con los del cemento, además de presentar una gran biocompatibilidad con los tejidos circundantes (Zanini, 2012).

Biodentine ha demostrado ser biocompatible, pues no induce daño a las células pulpares, y además es capaz de estimular la formación de dentina reparadora. La formación de tejido duro ha sido relatada como consecuencia posterior a tratamientos pulpares, realizados con este cemento (Boukpepsi, 2009). Este material usado como recubrimiento, ofrece más beneficios cuando es comparado con el cemento a base de Ca(OH)_2 . Cuenta con propiedades de dureza, baja solubilidad y produce un fuerte sellado. Supera las principales desventajas del Ca(OH)_2 como: falta de unión a la dentina y resina, solubilidad del cemento, y la microfiltración (Pradelle, 2009).

Aunque la información acumulada hasta ahora con respecto a la biocompatibilidad de Biodentine es bastante limitado, los datos disponibles en general está a favor del material en términos de su falta de citotoxicidad y la aceptabilidad del tejido (Malkondu, 2014).

En la investigación realizada por Garrido et. al. en el 2014, se estudió la biocompatibilidad de diferentes cementos utilizados para la obturación retrógrada esto en tejido conectivo de ratas, como resultados de este estudio se pudo observar que el tejido conectivo se inflamó moderadamente a los 7 días de estar en contacto con Biodentine; sin embargo, a los 14 y 30 días, el proceso inflamatorio era leve o no significativo (Garrido, 2014).

5. HIPÓTESIS

Los nuevos cementos selladores Biodentine y ERRM Putty, tienen igual biocompatibilidad que el cemento sellador a base de MTA.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad de los nuevos cementos de sellado apical.

6.2 Objetivos específicos

- Analizar la presencia de citocinas proinflamatorias en respuesta a Biodentine, ERRM Putty y MTA.
- Determinar la reacción inflamatoria presente en Biodentine, ERRM Putty y MTA.
- Contrastar los resultados obtenidos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se tomaron muestras de la piel dorsal de 16 ratones de la especie *Mus Musculus* los cuales de contaban con 8 semanas de nacidos, los cuales fueron divididos en dos grupos para evaluar la biocompatibilidad presentada a las 24 horas y a los 7 días.

Para poder ser incluidos en este estudio los ratones debieron cumplir con los requisitos que rige la NOM-062-ZOO-1999, la cual señala técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se excluyeron aquellos ratones que ya fueron utilizados en otras pruebas experimentales, así como fueron eliminados aquellos ratones que por un mal manejo de los cementos o la realización de una mala punción tuvieron que ser sacrificados.

7.1 Descripción del Procedimiento.

7.1.1 Inoculación de los cementos

Cada ratón por separado fue colocado en un frasco de vidrio junto con una gasa impregnada de éter para lograr la anestesia parcial de dicho ratón (figura 1).

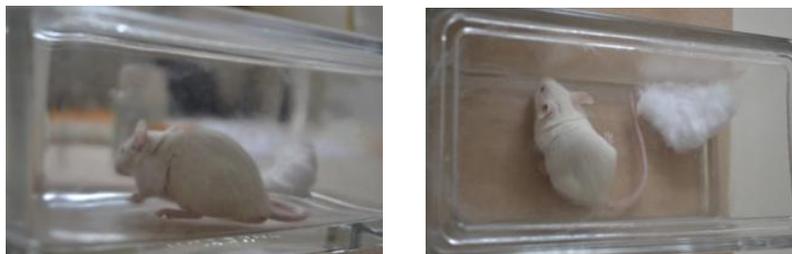


Figura 1. Anestesia del ratón por medio de Éter.

Una vez que el ratón estuviera anestesiado se procedió a la inoculación de los cementos en cada ratón, siendo conformado cada uno de los cuatro grupos por 4 ratones, 1 grupo control de agua destilada y 3 grupos experimentales de MTA, Biodentine, ERRM Putty los cuales fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cementos fueron diluidos en agua destilada para facilitar su colocación dentro del tejido de la parte dorsal de cada ratón (figura 2).



Figura 2. Inoculación del cemento.

Habiendo realizado la inoculación de cada cemento se colocó un punto de color sobre la piel donde fue realizada la punción, para poder ser localizada el área con más facilidad cuando se llevó a cabo la toma de muestra (figuras 3).

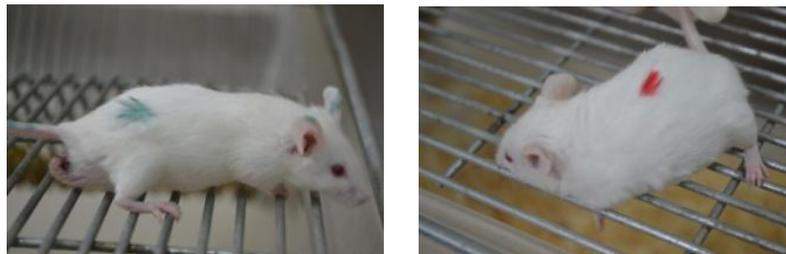


Figura 3. Pigmentación del sitio de la punción.

7.1.2 Toma de muestras

Antes de llevar a cabo la toma de muestra se procedió a rasurar la parte dorsal, la cual había sido previamente marcada con un plumón (figura 4).

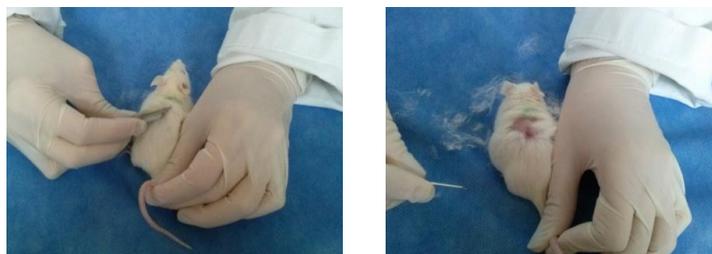


Figura 4. Eliminación del vello

A las 24 horas y 7 días de haber realizado la inoculación de los cementos se sacrificaron a dos ratones de cada grupo, esto se realizó mediante la dislocación cervical de cada uno de ellos (figura 5).



Figura 5. Dislocación cervical

Para llevar a cabo la toma de la muestra se cortó la zona en donde se realizó la inoculación del cemento (figura 6).



Figura 6. Recolección de muestra.

Después de haber sido recolectada cada muestra fue colocada en un frasco de vidrio el cual contenía en formalina al 10% para ser fijadas (figura 7).



Figura 7. Muestras colocadas en formalina al 10%.

7.1.3 Técnica Histológica de Parafina

Después de que las muestras fueron fijadas con formalina al 10% y desmineralizadas, se comenzó el proceso de inclusión este paso tiene como finalidad rodear las muestras en un material suficientemente rígido para poder ser cortadas, como medio de inclusión se uso la parafina. Pero debido a que la parafina no es miscible en agua, se llevó a cabo el proceso llamado deshidratación, en donde se emplean alcoholes de menor a mayor concentración esto es; se colocaron las muestras en alcohol al 50% hasta llegar al 100%, las muestras se deben dejar durante una hora en cada concentración de alcohol y al llegar al 100% se coloca dos veces en el mismo.

Sin embargo, el alcohol tampoco es miscible en parafina y para ello se realizó el proceso de aclaración, en donde se colocaron las muestras en alcohol + xilol (250 ml. de alcohol con 250 ml. de xilol) durante una hora, después se coloca en xilol tres veces. Todo esto se llevo a cabo en frascos de vidrio.

Ya que estén aclaradas se realizó la infiltración del medio de inclusión por toda la muestra; para ello se utilizó el horno del Laboratorio de Morfología de la Facultad de Odontología, UANL (figura 8), el horno se mantuvo a 60° para que la parafina llegara a su punto de fusión, esto sucede aproximadamente después de 6 horas.



Figura 8. Horno.

Se colocaron las muestras en los frascos de vidrio con parafina líquida durante tres horas.

Después de esto se sacaron los frascos y cada una de las muestras fue cortada por la mitad con la ayuda de una navaja de doble filo, esto basándose en la ubicación del cemento inoculado (figura 9).



Figura 9. Corte de muestra.

Una vez que todas las muestras fueron cortadas por la mitad, cada una se colocó dentro de un vasito de plástico previamente identificado los cuales contenían parafina, y fueron introducidas al horno durante 1 hora (figura 10).

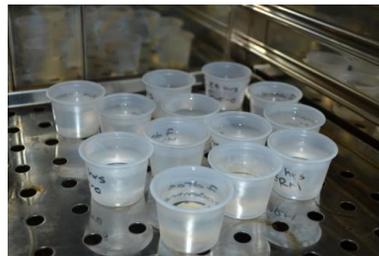


Figura 10. Colocación de las muestras en el horno.

Ya transcurrido el tiempo de espera, se sacaron del horno las muestras una por una, para llevar a cabo la orientación de las mismas (figura 11), esto con la ayuda de pinzas de curación ya que las muestras deberían quedar paralelas una al lado de la otra hasta que la parafina se solidificara a temperatura ambiente (figura 12).



Figura 11. Acomodo de las muestras.



Figura 12. Solidificación de la Parafina.

7.1.4 Obtención de los cortes

Una vez que la parafina solidificara se cortaron los excesos hasta que solo quedara un cubo el cual contenía la muestra.

Después se procedió a realizar los cortes de cada muestra utilizando el micrótopo rotatorio de la marca Microm modelo HM340E, el cual fue facilitado por el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL (figura 13).



Figura 13. Micrótopo HM340E.

En donde mediante una navaja se fueron realizando cortes de 6 micras (figura 14), las cuales una vez que fueron obtenidas se colocaron en un baño de agua destilada a 40° para estirar los cortes (figura 15), esto con la ayuda de un pincel y pinzas delgadas.



Figura 14. Realización de cortes de 6 micras.



Figura 15. Colocación de cortes en agua destilada a 40°.

El corte obtenido se recoge del agua con el portaobjeto previamente identificado con el número de muestra (figura 16), en donde se deja secar para después llevar a cabo las tinciones histológicas necesarias.



Figura 16. Colocación del corte en el portaobjeto.

7.1.5 Tinción del corte histológico

7.1.5.1 Hematoxilina y Eosina

Para llevar a cabo este procedimiento, cada sustancia a utilizar fue colocada en un recipiente de vidrio previamente identificado (figura 17).



Figura 17. Recipientes para llevar a cabo las tinciones.

Los portaobjetos se colocaron en una gradilla de vidrio la cual se fue introduciendo en cada uno de las diferentes sustancias, de acuerdo al siguiente orden:

- Xilol durante 5 minutos.
- Xilol durante 5 minutos.
- Alcohol al 100% durante 3 minutos.
- Alcohol al 70% durante 3 minutos.
- Alcohol al 50 % durante 3 minutos.
- Hematoxilina durante 5 minutos (figura 18).
- Enjuague con agua hasta que salga limpia.
- Eosina durante 3 minutos (figura 19).
- Enjuague con alcohol al 70% hasta que este salga limpio.
- Alcohol al 90% por un minuto.
- Alcohol al 100% durante un minuto.
- Alcohol al 100% durante un minuto.

- Alcohol-Xilol durante 5 minutos.
- Xilol durante 5 minutos.
- Xilol hasta que las muestras se monten.



Figura 18. Colocación de las muestras en Hematoxilina.



Figura 19. Colocación de las muestras en Eosina.

7.1.5.2 Tricrómico de Masson

Como ya se mencionó anteriormente para llevar a cabo este procedimiento, cada sustancia a utilizar fue colocada en un recipiente de vidrio previamente identificado y los portaobjetos se colocaron en una gradilla de vidrio la cual se fue introduciendo en cada uno de las diferentes sustancias, de acuerdo al siguiente orden:

- Xilol durante 5 minutos (2 veces).
- Alcohol al 100% durante 5 minutos.

- Alcohol al 80% durante 5 minutos.
- Alcohol al 60% durante 5 minutos.
- Alcohol al 50% durante 5 minutos.
- Agua destilada 5 minutos.
- Bouin 1 hora a temperatura ambiente.
- Agua corriente, hasta quitar el exceso de tinción amarilla.
- Agua destilada, realizar tres cambios.
- Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Agua destilada, realizar tres cambios.
- Escarlata de Biebrich durante 5 minutos.
- Agua destilada, realizar dos cambios.
- Ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 15 minutos.
- Agua destilada, realizar tres cambios.
- Azul de Alanina durante 6 minutos.
- Agua destilada, realizar tres cambios.
- Ácido acético glacial 1% durante 3 minutos.
- Agua destilada durante 5 minutos.
- Alcohol a 70% durante 3 minutos.
- Alcohol al 96% durante 3 minutos.
- Alcohol al 96% durante 3 minutos.
- Alcohol al 100% durante 3 minutos.
- Alcohol al 100% durante 3 minutos.
- Alcohol-Xilol durante 3 minutos.
- Xilol durante 3 minutos.
- Xilol hasta que las muestras se monten.

7.1.6 Montaje de los cortes

Los portaobjetos se retiraron del xilol y se colocaron dos gotas de resina sintética en cada uno (figura 20) para después situar el cubreobjetos sobre el corte (figura 21), una vez que el cubreobjetos estuviera bien situado se retiraron los excesos de resina y se dejaron secar durante 24 horas (figura 22), para poder ser observados en el microscopio electrónico y llevar a cabo la evaluación de las reacciones inflamatorias (Cuadro 1).



Figura 20. Colocación de la resina sintética.



Figura 21. Colocación del cubreobjeto.



Figura 22. Muestras teñidas listas.

Cuadro 1. “Categorías de las Reacciones Inflamatorias”	
Grado I	Sin filtrado inflamatorio
Grado II	Leve filtración de células inflamatorias y ondulados depósitos de fibra de colágeno y fibrosis.
Grado III	Densa filtración de células inflamatorias, áreas limitadas de edema tisular y congestión vascular.
Grado IV	Filtración muy densa de células inflamatorias agudas y crónicas, áreas edematosas generalizadas y congestión vascular junto con depósitos de fibrina.

Cuadro 1. Evaluación de las reacciones inflamatorias de acuerdo a los criterios de Robbins y Cox (Cox et. al., 1996; Robbins et. al., 1991).

7.1.7 Técnica Inmunocitoquímica

La Técnica de Inmunocitoquímica se realizó de la siguiente manera:

1. Los portaobjetos se colocaron en el horno a 70° aproximadamente durante 5 minutos, hasta que se disolviera la parafina.
2. Se desparafiniza con xilol durante 15 minutos 2 veces.
3. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml. de alcohol más 250 ml. de xilol) durante 5 minutos.
4. Hidratar con alcoholes de grado decreciente.
 - Alcohol al 100% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 90% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 70% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 50% durante 5 minutos.
5. Para eliminar la peroxidasa endógena, los cortes se colocan en una solución de 500 ml de Metanol + 4.95 ml. de Peróxido de Hidrógeno al 30% durante 20 minutos.
6. Colocar en alcohol al 50% durante 5 minutos.
7. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.

- Para 2 litros de H₂O₂
 - Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄): 43.6 gr.
 - Fosfato de Sodio Monobásico (NaH₂PO₄H₂O): 12.8 gr.
8. Lavar con solución Buffer PBS con tritón pH 7.2 - 7.4 durante 10 minutos.
- Para 2 litros de H₂O₂
 - Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄): 43.6 gr.
 - Fosfato de Sodio Monobásico (NaH₂PO₄H₂O): 12.8 gr.
 - Tritón X-100: 2 ml.
9. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
10. Colocar pap-pen sobre la laminilla alrededor del corte histológico. (figura 23)

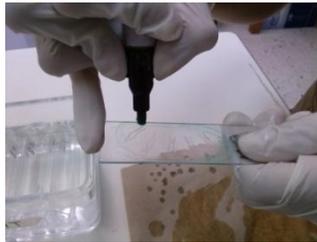


Figura 23. Colocación del pap-pen

11. Incubación de los primeros anticuerpos

- Anti-IL 1 beta antibody ab9722, .500 mg/ml. polvo rabbit polyclonal to IL 1 beta
- Anti-TNF alpha antibody ab6671, 1.000 mg/ml. liquid rabbit polyclonal to TNF alpha.

11.1 Disolución 1:600, se colocaron 1600 µl. de Buffer PBS con tritón en cada de los tres tubos Eppendorf y después se colocó cada anticuerpo por separado.

- 10 µl. de IL-1beta (se llevo se preparación de los 100 µgr. Con 200 µl. de Buffer PBS sin tritón)
- 3.5 µl. de IL-1beta 2
- 3.5 µl. de TNF-alpha

11.2 Se utilizaron un total de 24 laminillas, por lo cual fueron 8 laminillas por cada anticuerpo, en cada laminilla se colocó 160 μ l. del anticuerpo utilizado. (figura 24) y se dejó incubando por 24 horas a temperatura ambiente.



Figura 24. Colocación del primer anticuerpo

12. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS con tritón pH 7.2-7.4 durante 15 minutos.

13. Incubación del segundo anticuerpo.

- Goat F(ab)² Polyclonal secondary antibody to rabbit IgG (Fab)² (HRP) pre-adsorbed ab6112, 1.000 mg/ml, liquido marca Abcam, se preparó con 5 ml. de Buffer PBS sin tritón en combinación con 15 μ l. del anticuerpo.

13.1 Se colocó 160 μ l. del segundo anticuerpo en cada laminilla (total 24) y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

14. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2-7.4 durante 15 minutos.

15. Aplicación del DAB al 0.05% + H₂O₂ al 0.04%

- 5 mg. DAB
- 13 μ l. H₂O₂
- 10 ml. Buffer sin tritón

15.1 Aplicar 166 μ l. en cada laminilla.

15.2 Dejarlo durante 40 a 50 segundos.

16. Lavar con Buffer PBS sin tritón pH 7.2-7.4 durante 5 minutos.

17. Deshidratar con alcoholes de menor a mayor concentración.
 - a. OH 50% durante 5 minutos.
 - b. OH 60% durante 5 minutos.
 - c. OH 70% durante 5 minutos.
 - d. OH 100% durante 5 minutos.
18. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml. de alcohol + 250 ml. de xilol) durante 5 minutos.
19. Aclarar con xilol durante 15 minutos 2 veces.
20. Montaje con resina sintética y cubreobjetos.

Una vez que estuvieron listas las muestras se observaron bajo el microscopio fotónico para analizar la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

8. RESULTADOS

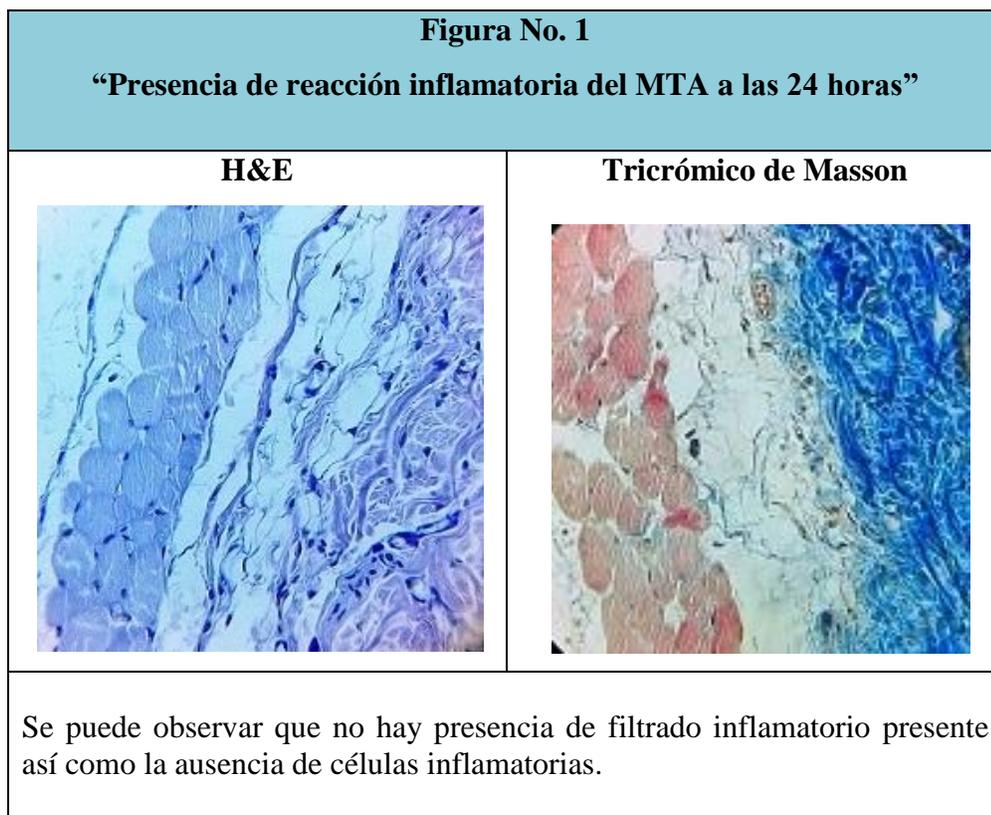
8.1 Hematoxilina y Eosina; Tricrómico de Masson.

Tabla No. 1			
“Grado de reacción inflamatoria presentada por los diferentes cementos de sellado apical”			
Cemento	Tiempo	Hematoxilina y Eosina	Tricrómico de Masson
MTA	24 horas	Grado I	Grado I
	7 días	Grado II	Grado II
Biodentine	24 horas	Grado II	Grado II
	7 días	Grado I	Grado I
ERRM	24 horas	Grado II	Grado II
	7 días	Grado I	Grado I

Cuadro 1.	
“Categorías de las Reacciones Inflamatorias”	
Grado I	Sin filtrado inflamatorio
Grado II	Leve filtración de células inflamatorias y ondulados depósitos de fibra de colágeno y fibrosis.
Grado III	Densa filtración de células inflamatorias, áreas limitadas de edema tisular y congestión vascular.
Grado IV	Filtración muy densa de células inflamatorias agudas y crónicas, áreas edematosas generalizadas y congestión vascular junto con depósitos de fibrina.

Cuadro 1. Evaluación de las reacciones inflamatorias de acuerdo a los criterios de Robbins y Cox (Cox et. al., 1996; Robbins et. al., 1991).

Tabla No. 2	
“Reacción inflamatoria presentada por el MTA”	
Tiempo de toma de muestra	Reacción inflamatoria presente
24 Horas	Grado I: Sin filtrado inflamatorio
7 Días	Grado II: Leve filtrado inflamatorio



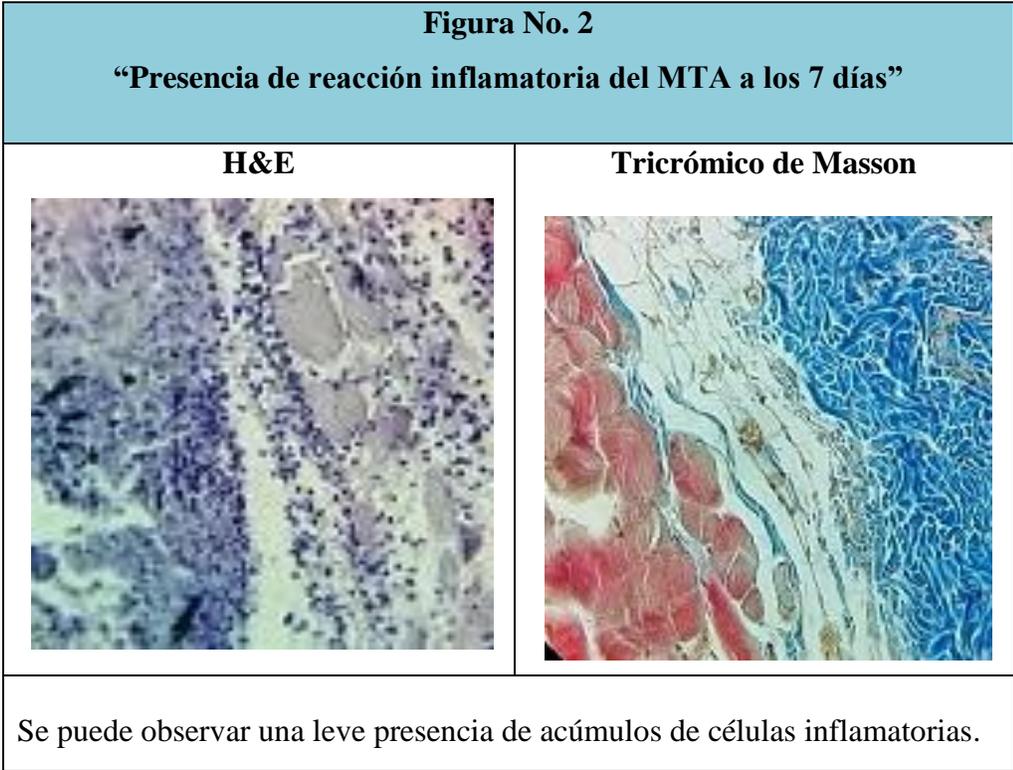


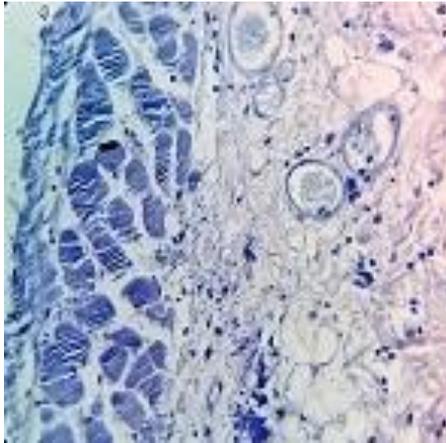
Tabla No. 3
“Presencia de reacción inflamatoria del Biodentine”

Tiempo de toma de muestra	Reacción inflamatoria presente
24 Horas	Grado II: Leve filtrado inflamatorio
7 Días	Grado I: Sin filtrado inflamatorio

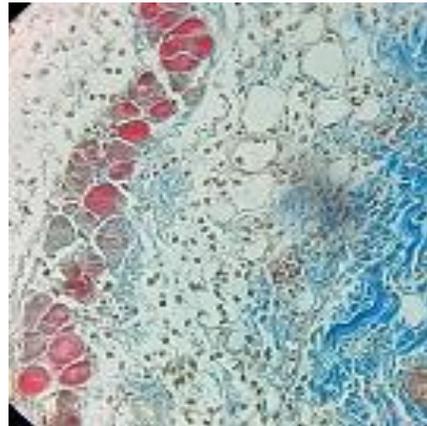
Figura No. 3

**“Presencia de reacción inflamatoria de Biodentine
a las 24 horas”**

H&E



Tricrómico de Masson

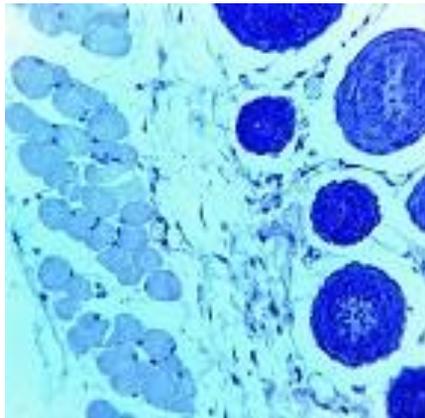


Se puede observar una leve presencia de acúmulos de células inflamatorias.

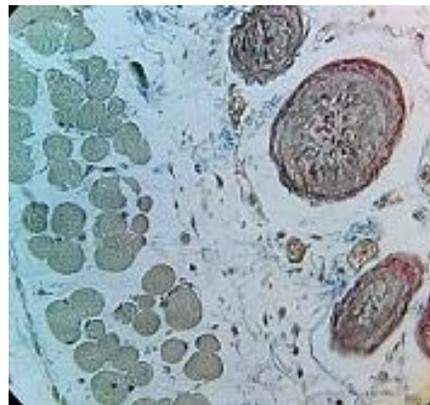
Figura No. 4

**“Presencia de reacción inflamatoria de Biodentine
a los 7 días”**

H&E



Tricrómico de Masson



Se puede observar que no hay presencia de filtrado inflamatorio presente así como la ausencia de células inflamatorias.

Tabla No. 4	
“Presencia de reacción inflamatoria del ERRM Putty”	
Tiempo de toma de muestra	Reacción inflamatoria presente
24 Horas	Grado II: Leve filtrado inflamatorio
7 Días	Grado I: Sin filtrado inflamatorio

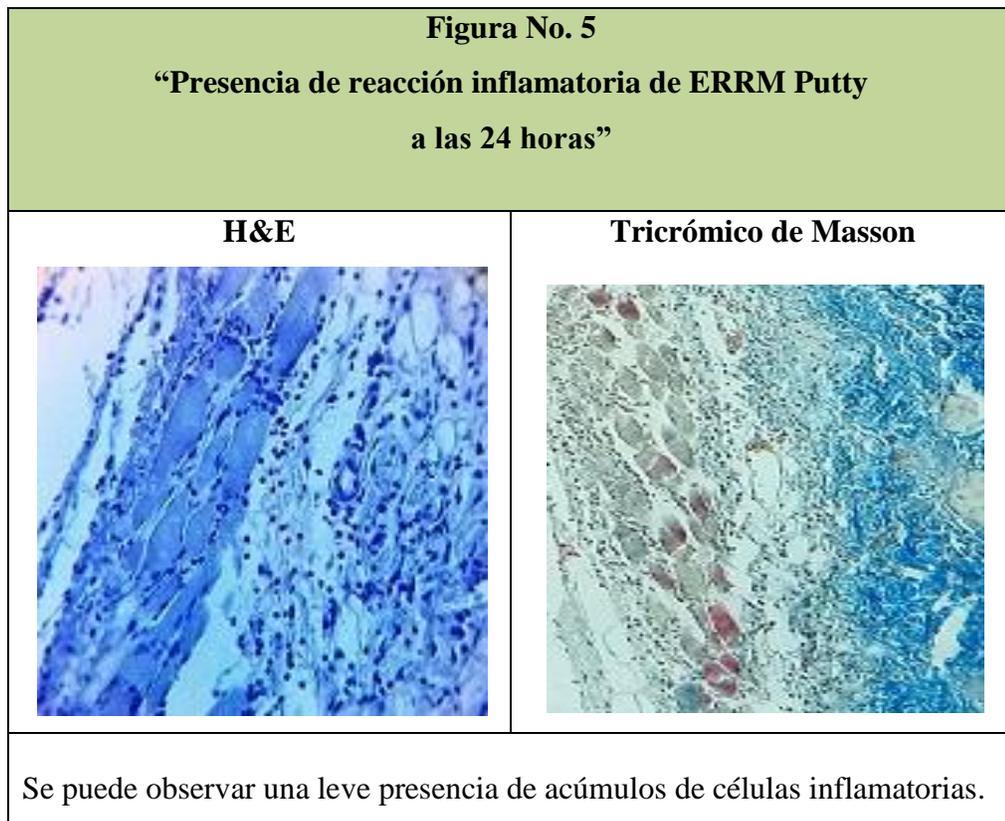
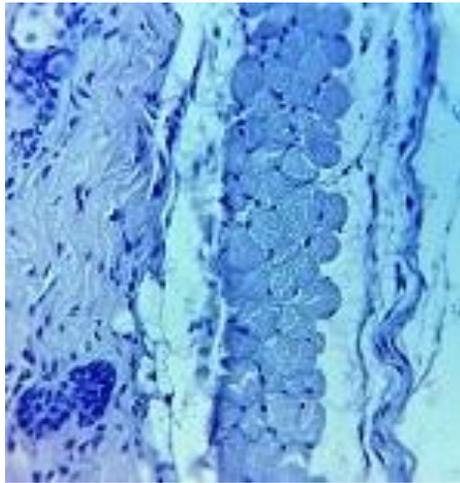


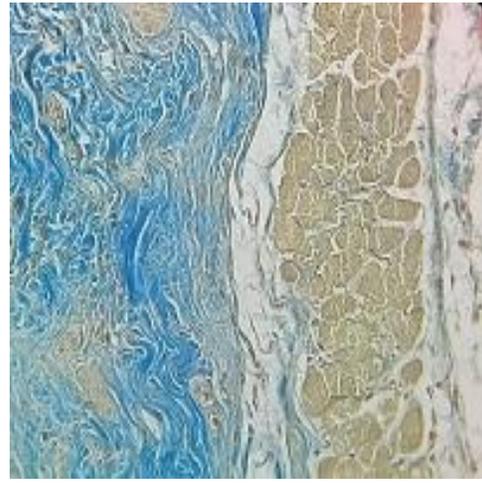
Figura No. 6

**“Presencia de reacción inflamatoria de ERRM Putty
a los 7 días”**

H&E



Tricrómico de Masson



Se puede observar que no hay presencia de filtrado inflamatorio presente así como la ausencia de células inflamatorias.

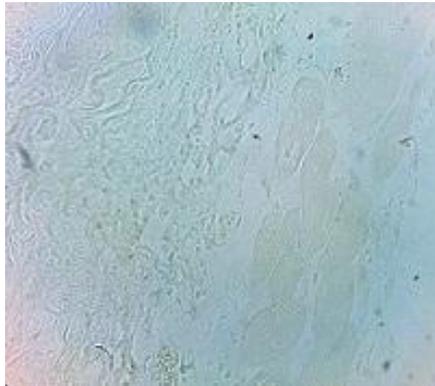
8.2 Inmunocitoquímica

Tabla No. 5 “Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa”			
Cemento	Tiempo	IL – 1 beta	TNF – alfa
MTA	24 horas	Positivo	Positivo
	7 días	Positivo	Positivo
Biodentine	24 horas	Positivo	Positivo
	7 días	Positivo	Positivo
ERRM	24 horas	Positivo	Positivo
	7 días	Positivo	Positivo

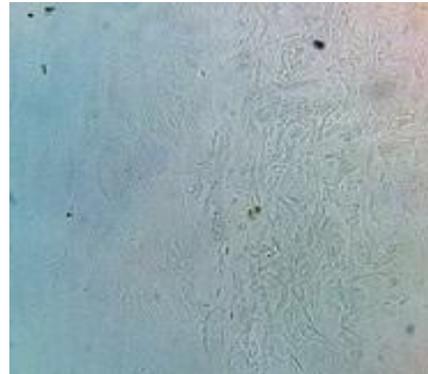
Figura No. 7

“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa de MTA a las 24 horas”

IL – 1 beta



TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina

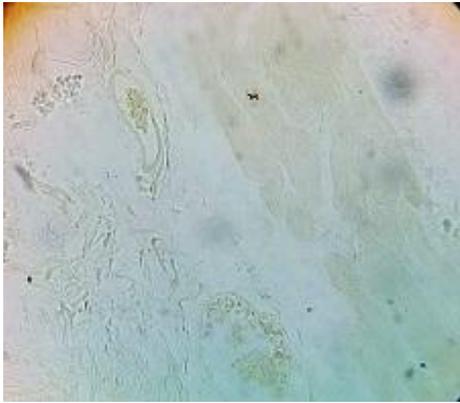


Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

Figura No. 7

**“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-
alfa de MTA a los 7 días”**

IL – 1 beta



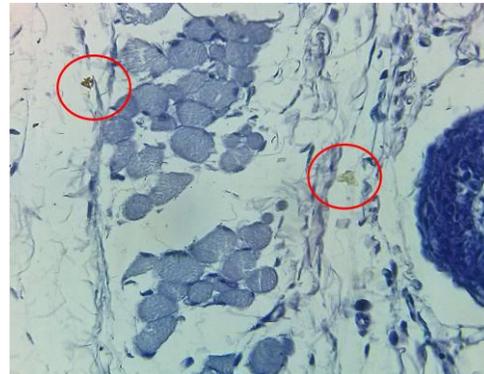
TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina



Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

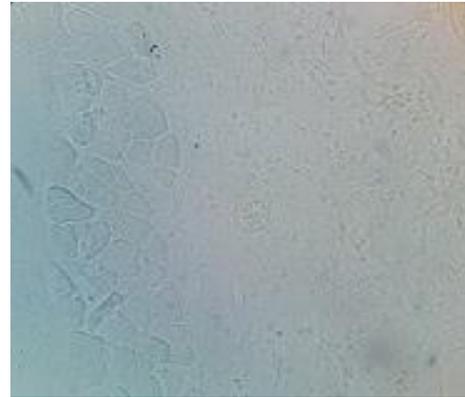
Figura No. 7

“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa de Biodentine a las 24 horas”

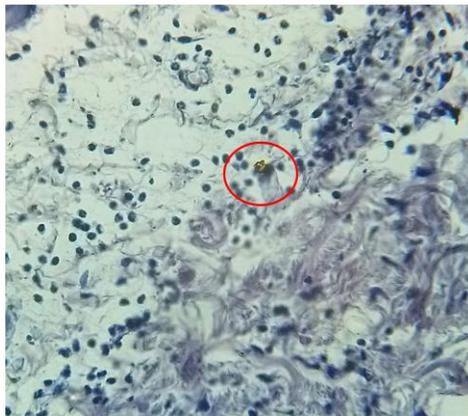
IL – 1 beta



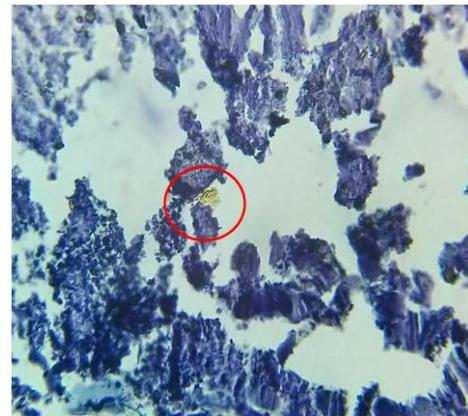
TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina

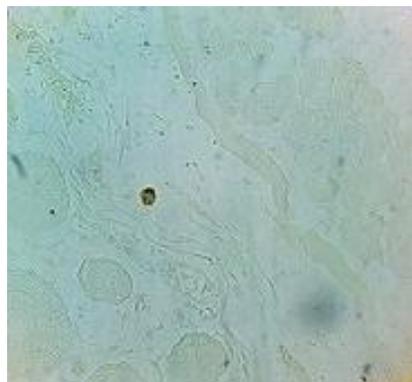


Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

Figura No. 7

**“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-
alfa de Biodentine a los 7 días”**

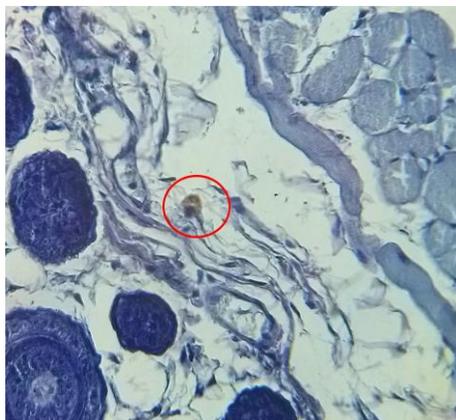
IL – 1 beta



TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina

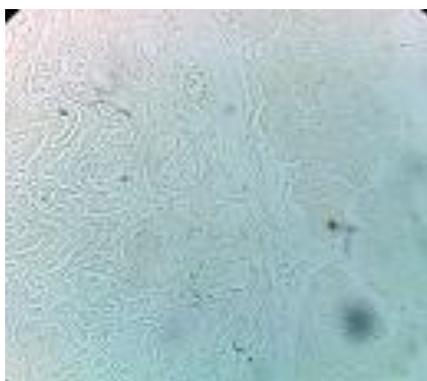


Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

Figura No. 7

**“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-
alfa de ERRM a las 24 horas”**

IL – 1 beta



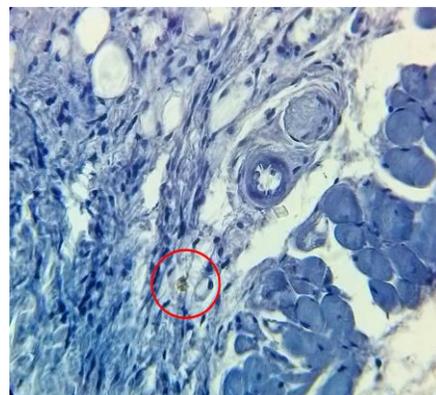
TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina

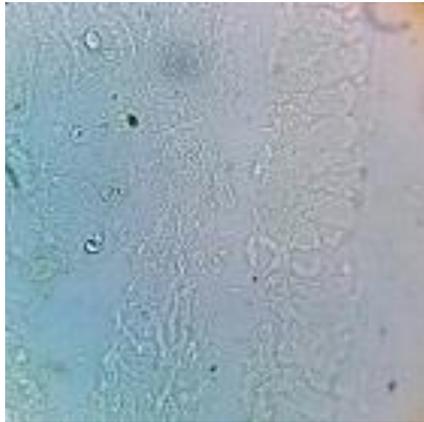


Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

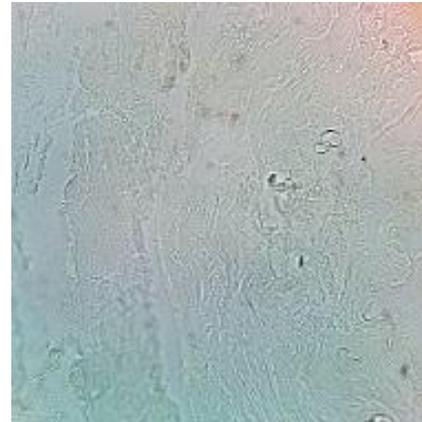
Figura No. 7

**“Presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-
alfa de ERRM a los 7 días”**

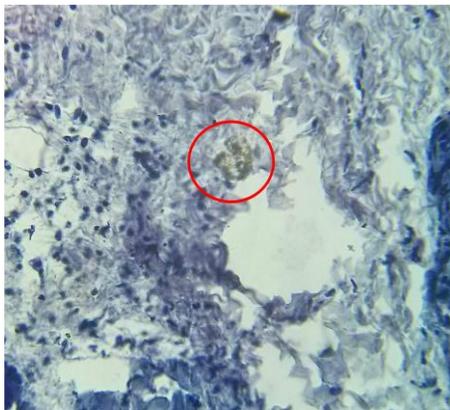
IL – 1 beta



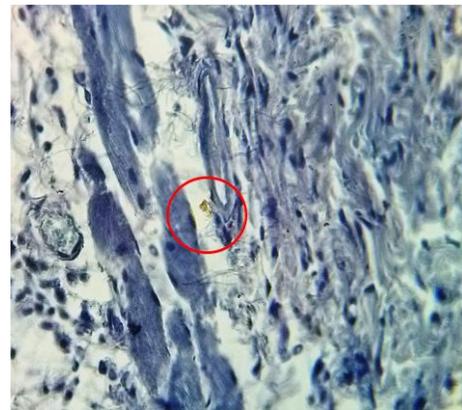
TNF – alfa



Contraste Hematoxilina



Contraste Hematoxilina



Se puede observar en la imagen de contraste con Hematoxilina la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

8.3 Análisis Estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico se realizó un conteo morfométrico, en donde se seleccionaron 5 laminillas de inmunocitoquímica de cada uno de los cementos utilizados y se les realizó un contraste con la tinción de Hematoxilina y así poder distinguir las células positivas a las citocinas proinflamatorias utilizadas. Se observó al microscopio 2 cortes por cada laminilla y en cada uno de los cortes se observaron 5 campos, dando como total 10 campos por laminilla y 50 campos por cada cemento, sacando el promedio de células inmunoreactivas positivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

Se utilizó la prueba estadística T de Student para obtener los valores de P. ($P=0.5$)

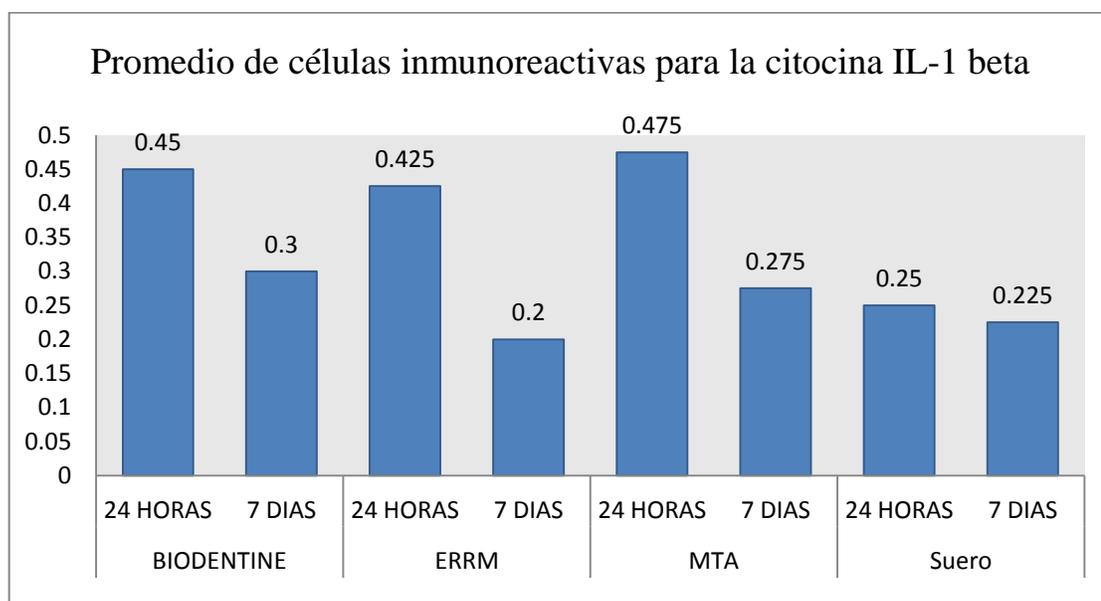
8.3.1 Análisis de la presencia de IL-1 beta

VALORES DE "P"		
BIO vs SUERO	24	0.13531
BIO vs SUERO	7	0.52358
ERRM vs SUERO	24	0.18954
ERRM vs SUERO	7	0.80184
MTA vs SUERO	24	0.09399
MTA vs SUERO	7	0.66732

Valores de P obtenidos al comparar cada cemento con el grupo control a las 24 horas y 7 días, en donde se puede observar que no hay diferencia estadística entre cada uno de ellos. ($P=0.5$)

VALORES DE "P"		
BIO	24 vs 7	0.26884
ERRM	24 vs 7	0.06286
MTA	24 vs 7	0.13916
SUERO	24 vs 7	0.82783

Valores de P obtenidos al comparar cada cemento a las 24 horas y 7 días, en donde se puede observar que no hay diferencia estadística entre cada uno de los grupos. ($P=0.5$)



Se puede observar el promedio de células inmunoreactivas positivas a la citocina IL-1 beta, presente en cada uno de los cementos a las 24 horas y 7 días de haber realizado la inoculación de los mismos.

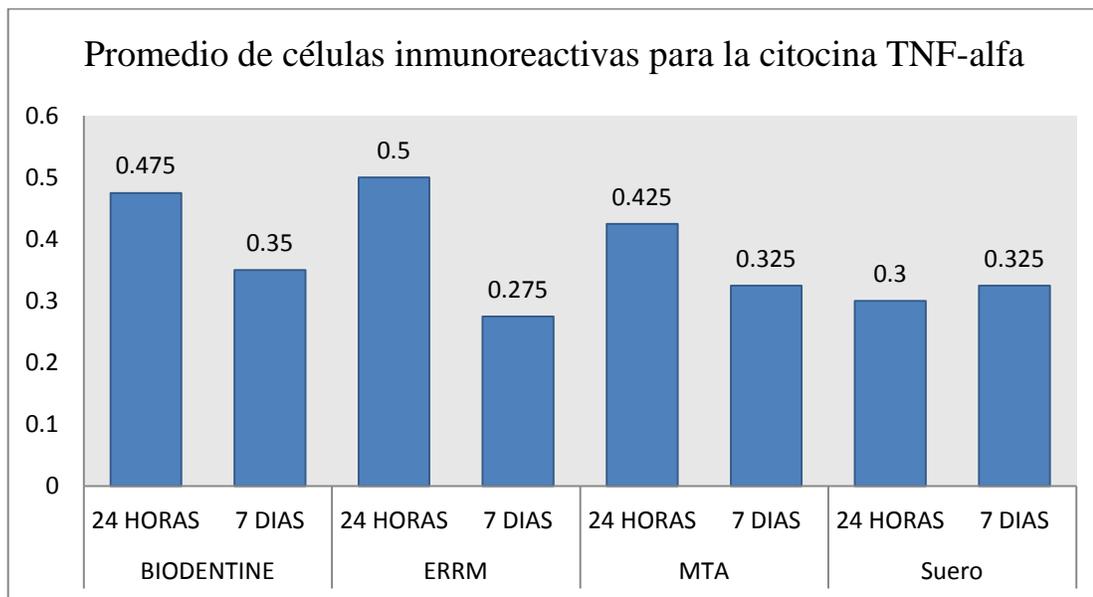
8.3.2 Análisis de la presencia de TNF-alfa

VALORES DE "P"		
BIO vs SUERO	24	0.21354
BIO vs SUERO	7	0.84038
ERRM vs SUERO	24	0.15594
ERRM vs SUERO	7	0.67998
MTA vs SUERO	24	0.33753
MTA vs SUERO	7	0.32632

Valores de P obtenidos al comparar cada cemento con el grupo control a las 24 horas y 7 días, en donde se puede observar que no hay diferencia estadística entre cada uno de ellos. ($P=0.5$)

VALORES DE "P"		
BIO	24 vs 7	0.36269
ERRM	24 vs 7	0.09692
MTA	24 vs 7	0.138
SUERO	24 vs 7	0.8445

Valores de P obtenidos al comparar cada cemento a las 24 horas y 7 días, en donde se puede observar que no hay diferencia estadística entre cada uno de los grupos. ($P=0.5$)



Se puede observar el promedio de células inmunoreactivas positivas a la citocina IL-1 beta, presente en cada uno de los cementos a las 24 horas y 7 días de haber realizado la inoculación de los mismos.

9. DISCUSIÓN

En la presente investigación se tomaron muestras de la piel dorsal de 16 ratones de la especie *Mus Musculus*, para evaluar la biocompatibilidad presentada a las 24 horas y a los 7 días de tres diferentes cementos utilizados en la obturación retrógrada cuando se realiza una cirugía apical.

En los resultados obtenidos en este estudio, se pudo observar que el MTA no presentó algún tipo de filtrado inflamatorio en las muestras obtenidas a las 24 horas, pero si hubo presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa, esto no concordando con lo mencionado por Christopher et. al. en 1996, Ribeiro en el 2006, Torabinejad y Pariokh en el 2010, en donde concluyen que el MTA presenta una gran biocompatibilidad al ser comparado con otros materiales dentales como lo son la amalgama y el IRM, ya que el MTA en dicha investigación no presentó filtrado inflamatorio al ser estudiado histológicamente en dientes extraídos de perros.

Por lo contrario al observar las muestras obtenidas a los 7 días de la inoculación de los cementos se observó una leve presencia de células inflamatorias y ondulados depósitos de fibra de colágeno, así como de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa. Concordando con lo encontrado en el estudio de Moretton et. al. en el 2005, donde mencionaron que el MTA gris produce significativamente más inflamación a los 7 días en comparación con el EBA, esto al realizar pruebas de biocompatibilidad insertando tubos de polietileno dentro del tejido subcutáneo de ratas.

Otro estudio realizado por Laliz et. al., en el 2009 informó la presencia de necrosis tisular y la formación de células gigantes alrededor del MTA esto al ser evaluados a los 7 y 14 días después de la implantación del cemento. Según Gomes-Filho et. al. en el

2009, el MTA produce una respuesta inflamatoria de moderada a severa cuando es colocado subcutáneamente, la cual disminuye a intervalos de tiempo más largos.

Dentro de los resultados obtenidos de Biodentine, en las muestras obtenidas a las 24 horas se observó una leve presencia de células inflamatorias y ondulados depósitos de fibra de colágeno, así de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa, por lo contrario en las muestras a los 7 días no se observó presencia de células inflamatorias, pero la presencia de células inmunoreactivas a los citocinas proinflamatorias investigadas fue positiva, esto no concordando con lo publicado por Garrido y cols. en el 2014 ya que en su estudio el tejido subcutáneo de las ratas en donde se realizó dicha investigación, reportó la presencia de una inflamación moderada a los 7 días después de haber estado en contacto con Biodentine, esto puede deberse a que en dicho estudio se utilizó como metodología la implantación de tubos de polietileno los cuales contenían el material, siendo diferente a la investigación presentada ya que en este caso los cementos fueron inoculados directamente a la piel de los ratones.

Biodentine no ha sido ampliamente estudiado en cuanto a la biocompatibilidad que este pudiera presentar, ya que en la literatura se pudo encontrar más artículos que hablan acerca de su citotoxicidad, en donde autores como Laurent et. al., Zanini et. al. ambos en el 2012, Malkondu en el 2014, Boukpepsi en el 2009, entre otros han mencionado que Biodentine presenta baja citotoxicidad, esto al ser investigado utilizando fibroblastos gingivales.

Al estudiar la biocompatibilidad presentada por ERRM este presentó un leve filtrado de células inflamatorias en las muestras adquiridas a las 24 horas, así como la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa, por lo contrario en las muestras obtenidas a los 7 días no se observó presencia de células inflamatorias.

En cuanto a la revisión de artículos del Endosequence Root Repair Material (ERRM) se pudo encontrar el mismo caso presentado por Biodentine, ya que solo existen

investigaciones basadas en la citotoxicidad que presenta en donde investigadores como Jingzhi et. al., Ciasca et. al. ambos en el 2011, Amer en el 2010 y Galsterer en el 2011, mencionan que la citotoxicidad que muestra es baja y similar a la presentada por el MTA. Por tal motivo autores como Ryan y Safavi en el 2010, recomiendan realizar pruebas de biocompatibilidad como la implantación subcutánea de dicho material, por tal motivo esta investigación presenta una gran aportación a la Endodoncia en cuanto a la biocompatibilidad presentada por el ERRM.

10. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio y de acuerdo a la metodología utilizada, podemos concluir que:

- Tanto Biodentine como el ERRM presentan una buena biocompatibilidad, ya que presentaron un leve filtrado inflamatorio mostrado a las 24 horas el cual desapareció al ser comparado con las muestras obtenidas a los 7 días, con esto podemos corroborar que al paso del tiempo ambos cementos no ocasionan alguna reacción inflamatoria persistente.
- Al contrario el MTA a pesar de no haber presentado un filtrado inflamatorio a las 24 horas de haberse obtenido las muestras, si lo hizo a los 7 días, esto nos indica que el MTA pudiera seguir ocasionando algún tipo de reacción inflamatoria con el paso del tiempo, por lo cual se recomienda realizar otras investigaciones de biocompatibilidad a los 14 y 30 días.
- Aunque Biodentine, ERRM Putty y MTA presentaron células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa, estas no fueron estadísticamente significativas, por lo tanto, se puede concluir que los tres cementos son biocompatibles.

Por tal motivo podemos considerar a Biodentine y al ERRM como materiales promesa para los procedimientos dentales clínicos por su buena biocompatibilidad presentada, convirtiéndose en interesantes alternativas al MTA, ya que este último fue el que menos biocompatibilidad presentó en esta investigación.

No debemos olvidar que es muy importante que todos los materiales utilizados en la endodoncia que se colocan con frecuencia en contacto íntimo con el periodonto y deben tener las características de ser no tóxicos y biocompatibles con los tejidos del huésped, y así obtener éxito en el tratamiento.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alaina P. Leidecker, Yi-Pin Qi, Allen N. Sawyer, Li-Na Niu, Kelli A. Agee, Robert J. Loushine, Roger N. Well, David H. Pashley and Franklin R. Tay, Effects of Calcium Silicate-based Materials on Collagen Matrix Integrity of Mineralized Dentin, *J Endod* 2012;38:829–833.
2. Allen N. Sawyer, Sergey Y. Nikonov, Alaina K. Pancio, Li-na Niu, Kelli A. Agee, Robert J. Loushine, Roger N. Weller, David H. Pashley and Franklin R. Tay, Effects of Calcium Silicate-based Materials on the Flexural Properties of Dentin, *J Endod* 2012;38:680–683.
3. Amer Z. AlAnezi, Jin Jiang, Kamran E. Safavi, Larz S. W. Spangberg and Qiang Zhu, Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material, 2001:5–11.
4. Amer Z. AlAnezi, Jin Jiang, Kamran E. Safavi, Larz S. W. Spangberg and Qiang Zhu, Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e122-e125.
5. Boukpepsi T, Septier D, Goldberg M. VI-2-2-2 Animal studies. In: Goldberg M (ed.) *Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites*. Coxmoor, Oxford 2009. p 200-203.
6. Buenahora Tobar Rosa Ma., Gúzman Báez Humberto José, *Biocompatibilidad y Citotoxicidad*, Nota Científica Sociedad Colombiana de Operatoria y Biomateriales: Fundamentos de Biocompatibilidad, *Odontos*, 2007, 13-20.
7. Cambra J. J., *Manual de Cirugía periodontal, periapical y colocación de implantes*, Harcourt Brace, 1996 Madrid, España, pp. 86, 88, 90.
8. Caronna V., Himel V., Qingzhao Yu, Jian-Feng Zhang, Kent Sabey, Comparison of the Surface Hardness among 3 Materials Used in an Experimental Apexification Model under Moist and Dry Environments, *J Endod.*, Volume 40, Issue 7, Pages 986–989, July 2014.

9. Cássio J. A. Sousa, Cristiana R. M. Montes, Elizeu A. Pascon, Adriano M. Loyola and Marco A. Versiani, Comparison of the Intraosseous Biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany Root Canal Sealers, *J Endod* 2006;32:656–662.
10. Cedillo J., Espinosa R., Curiel R., Huerta A., A new bioactive dentine substitute. Purified Tricalcium Silicate, *ROBDY*, vol. II, no. 2, Mayo-Agosto 2013.
11. Christopher F, Carnes L, Carlos E, Rio E. Longitudinal sealing ability of MTA as a root end filling material. *J Endod* 1996;22:575– 8.
12. Ciasca M., Mickel A., G. Jin, A. Aminoshariae, T. Montagnese, A Comparison of the Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Production of EndoSequence™ Root Repair Material and ProRoot® MTA in Human Osteoblast Cell Culture Using Reverse Transcriptase-PCR, *JOE* — Volume 37, Number 3, March 2011.
13. Cohen S, Burns RC, *Endodoncia las vías de la pulpa*, 8º edición, 2004; pp. 257-279.
14. Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials, pulp healing with a surface seal. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:241–51.
15. Enkel B, Dupas C, Armengol V, Bioactive materials in endodontics, *Expert Rev Med Devices* 2008;5:475–94.
16. Galsterer M., Sykes C., Mickel A., G. Jin, A. Aminoshariae, T. Montagnese, An In Vitro Biocompatibility Comparison of Commonly Used Retrofill Materials and two New Materials: A MTA/IRM® Mixture and EndoSequence™ Root Repair Material, *JOE* — Volume 37, Number 3, March 2011.
17. Garrido Mori Graziela, Ligia Moraes Teixeira, Danilo Louzada de Oliveira, Larissa Menegucci Jacomini, Sindinéia Rodrigues da Silva, Biocompatibility Evaluation of Biodentine in Subcutaneous Tissue of Rats, *JOE* - Publication stage: In Press Corrected Proof, Published Online: April 24, 2014.
18. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod* 2009;35:256–60.
19. Hausen Willer, B. Briseño Marroquin, I. Willershausen, Biocompatibility of EndoSequence™ and MTA-Based Materials: An In Vitro Analysis, *JOE* — Volume 37, Number 3, March 2011.
20. Jingzhi Ma, Ya Shen, Sonja Stojicic and Markus Haapasalo, Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials, *J Endod* 2011;37:793–798.

21. Laliz EM, Esain ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat Subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2009;20:112–7.
22. Laurent, J. Camps, and I. About, “Biodentine™ induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization,” *International Endodontic Journal*, vol. 45, no. 5, pp. 439–448, 2012.
23. Marjorie Zanini, Jean Michel Sautier, Ariane Berdal, Stéphane Simon. Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization. *Journal of Endodontics*; Sep2012, Vol. 38 Issue 9, p1220-1226, 7p.
24. Martínez Carlos H., Morenos Freddy, *Biocompatibilidad, Fundamentos en Biomateriales de uso Odontológico: Aplicaciones en Estética y Cosmética Dental*, Colombia Aprende, 2006,1-5.
25. Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* 2000;52:528–33.
26. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU, Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial, *Int Endod J* 2008;41:128–50.
27. Özlem Malkondu,¹ Meriç Karapinar Kazanda,² and Ender KazazoLlu, *A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material*, Hindawi Publishing Corporation, *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 160951, 10 pages.
28. Parirokh M., Mirsoltani B., M. Raoof, H. Tabrizchi & A.A. Haghdoost, Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate, *International Endodontic Journal*, 44, 283–289, 2011.
29. Patrick Laurent, Jean Camps, Michel De Méo, Jacques Déjou, Imad About, Induction of specific cell response to a Ca₃SiO₅- based posterior restorative material; *Dental Materials* 2008 Nov; 24 (11): 1486-1494.

30. Pradelle-Plasse N, Tran Xuan-Vin C, Physico-chemical properties of Biodentine, In: Goldberg M, ed. Biocompatibility or Cytotoxic Effects of Dental Composites, 1st ed. Oxford: Coxmoor Publishing Co; 2009:222.
31. Pradelle-Plasse N, Tran X-V, Colon P. VI-2-1 Physico-chemical properties. In: Goldberg M (ed.) Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites. Coxmoor, Oxford 2009. p 184-194.
32. Rhodes John S., Advanced Endodontics, Clinical Retreatment and Surgery, 2006, Taylor and Francis, New York, pp. 147, 184, 185.
33. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, et al. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. J Endod 2005;31:605–7.
34. Riberio DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvidori DMF, Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) Cells in vitro, Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2006;101:258–61.
35. Robbins SL, Cortan RS, Kumar V. Pocket compaction to Robbins pathologic basis of diseases, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991:46 –56.
36. Ryan P. McNamara, Michael A. Henry, William G. Schindler and Kenneth M. Hargreaves, Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate in a Rat Model, J Endod 2010;36:1851–1855.
37. Safavi KE, Spangberg L, Sapounas G, MacAlister TJ. In vitro evaluation of biocompatibility and marginal adaptation of root retrofilling materials. J Endod 2010;14: 538–42.
38. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kavashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. J Endod 2005;31:97–100.
39. Schmalz Gottfried, Dorte Arenholt Bindselev, Biocompatibility of dental materials, editorial Espringer, 2009, Alemania.
40. Septodont R&D department Biodentine Active Biosilicate Technology, Scientific File, (pag. 4-33).

41. Septodont, Scientific File, Biodentine Active Biosilicate Technology, Paris 2010, www.septodontusa.com/sites/default/files/Biodentine-Pulp_Capping.pdf, revisado el 17 de Septiembre del 2012.
42. Shahriar Shahi, Saeed Rahimi, Mehrdad Lotfi, Hamid Reza Yavari and Ali Reza Gaderian, A Comparative Study of the Biocompatibility of Three Root-end Filling Materials in Rat Connective Tissue, *J Endod*2006;32:776 –780.
43. Snyderman R, Goetzl EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science*. 1981; 213: 830-837.
44. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*1999;25:197–205.
45. Torabinejad M, Parirokh M, Mineral Trioxide aggregate: a comprehensive literature review – part II: sealing ability and biocompatibility properties. *J Endod* 2010, 36, 190–202.
46. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root end filling material in monkeys. *J Endod* 1997;23:225– 8.
47. Zanini, J. M. Sautier, A. Berdal, and S. Simon, “Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization,” *J Endod* 2012, vol. 38, no. 9, pp. 1220–1226.
48. Zmener Osvaldo, Dr Odont, Ricardo Martinez Lalis, Cornelis H. Pameijer, Carolina Chaves, Gabriel Kokubu and Daniel Grana, Reaction of Rat Subcutaneous Connective Tissue to a Mineral Trioxide Aggregate–based and a Zinc Oxide and Eugenol Sealer, *J Endod* 2012;38:1233–1238.