



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**ESTOMATOLOGÍA**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS CEMENTOS DE  
OBTURACIÓN RETROAPICAL MTA ANGELUS<sup>®</sup>, ENDOSEQUENCE ROOT  
REPAIR MATERIAL<sup>®</sup> Y SUPER EBA<sup>®</sup> EN FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO  
PERIODONTAL HUMANO

IN VITRO CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF MTA ANGELUS<sup>®</sup>,  
ENDOSEQUENCE ROOT REPAIR MATERIAL<sup>®</sup>, AND SUPER EBA<sup>®</sup> ROOT-END  
FILLING MATERIALS IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

AUTOR

ERIC HERNAN COAGUILA LLERENA

ASESORA

ZULEMA DE LOS ANGELES VELASQUEZ HUAMAN

CO-ASESOR

ABRAHAM JAIME VAISBERG WOLACH

LIMA - PERÚ

2014



## **JURADO**

PRESIDENTE: MG ESP. JUAN FELIPE HERNANDEZ AÑAÑOS

VOCAL: MG. ESP. MARCO ALARCON PALACIOS

SECRETARIO: MG. ESP. MARTHA LILIANA LOPEZ PINEDO

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 21 DE JULIO DE 2014

CALIFICACIÓN: APROBADO

## **ASESORES DE TESIS**

### **ASESORA**

**MG. ESP. ZULEMA DE LOS ANGELES VELASQUEZ HUAMAN**

Departamento Académico de Clínica del Adulto

ORCID: 0000-0002-0660-058X

### **CO-ASESOR**

**DR. ABRAHAM JAIME VAISBERG WOLACH**

Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía

ORCID: 0000-0003-1487-7770

## **DEDICATORIA**

A Dios porque solo con su guía y designios es posible que el hombre se supere.

A mi familia: mis padres Andrés e Irma, mis hermanos Carlos y Daniel, así como el buen Orson, porque son mi inspiración, y porque a través de su ejemplo sigo la senda apasionada de lucha por mis objetivos.

A mis docentes del Postgrado en Endodoncia, pues no solo compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia para los retos de la vida de especialista, sino por la amistad incondicional desde el primer momento que los conocí.

## AGRADECIMIENTOS

- Al **Dr. Abraham Vaisberg**, por la sabiduría, confianza, y, sobre todo la pedagógica paciencia y dedicación brindada en todo momento a un neófito del asunto.
- A la **Dra. Zulema Velásquez**, por el apoyo incondicional y casi maternal, así como por promover en mí el ánimo de emprender lo que nació a partir de una idea.
- Al **Dr. Alexis Evangelista**, por su valioso aporte estadístico.
- Al **Sr. Juan Cueva**, por el grandísimo apoyo al ejecutar la investigación, incluso en los momentos más difíciles y menos oportunos.
- Al **Sr. Mathieu Régnier**, porque sin su apoyo no hubiera sido posible ejecutar esta investigación.
- A mis amigos y esas grandiosas personas, que, físicamente o desde mi recuerdo, me animan y acompañan en cada momento de mi vida.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

El autor declara no tener conflictos de interés.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VIII. TABLAS Y GRÁFICOS	54

ANEXOS

## RESUMEN

**Objetivo:** El propósito del presente estudio *in vitro* fue evaluar la citotoxicidad de los cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> (MTA), EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> (ERRM) y Super EBA<sup>®</sup> (SEBA) en fibroblastos de ligamento periodontal humano. **Materiales y métodos:** Mediante un previo cultivo de fibroblastos de ligamento periodontal humano (PDLF) se evaluó la citotoxicidad de los extractos de los tres cementos de obturación retroapical de 2 y 7 días de fraguado, a diluciones seriadas, en periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días mediante el ensayo colorimétrico MTT. El análisis estadístico con la prueba t de student, U de Mann-Whitney, ANOVA y Kruskal-Wallis se hizo con el programa SPSS 20.0. **Resultados:** Se determinó que el porcentaje de viabilidad celular fue superior con MTA a los 2 días de fraguado y ERRM a los 7 días de fraguado ( $P < 0.05$ ) el cual fue dependiente del periodo de evaluación y diluciones. SEBA mostró la viabilidad celular más baja en comparación con MTA y ERRM en las diluciones más concentradas ( $P < 0.05$ ). **Conclusiones:** Dentro de las limitaciones de este estudio *in vitro*, los cementos de obturación retroapical MTA y ERRM mostraron una alta viabilidad celular dependiente del tiempo de fraguado y periodo de evaluación en comparación con SEBA.

**Palabras clave:** endodoncia, citotoxicidad, cementos de obturación retro apical, fibroblastos de ligamento periodontal humano.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present *in vitro* study was to evaluate the cytotoxicity in human periodontal ligament fibroblasts of three root-end filling materials MTA Angelus<sup>®</sup> (MTA), EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> (ERRM) and Super EBA<sup>®</sup> (SEBA).

**Materials and Methods:** A culture of human periodontal ligament fibroblasts (PDLF) was done previously in order to evaluate the cytotoxicity of the three extracts from the root-end filling materials of 2 and 7 setting days, at serial dilutions, and evaluation periods of 1, 3, and 7 days by using the MTT colorimetric assay. Statistical analysis with t test, Mann-Whitney U test, ANOVA and Kruskal-Wallis was done with the SPSS 20.0 program. **Results:** It was found that the percentage of cell viability of MTA was superior in 2 setting days and for ERRM was superior in 7 setting days ( $P < 0.05$ ), which was dependent of evaluation period and dilutions. SEBA showed the lower percentage of cell viability compared with MTA and ERRM in higher concentrated dilutions ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** Within the limitations of this *in vitro* study, MTA y ERRM root-end fillings showed higher cell viability, dependent of evaluation period and dilutions, compared with SEBA.

**Keywords:** endodontics, cytotoxicity, retroapical filling cements, human periodontal ligament fibroblasts.

## I. INTRODUCCIÓN

La Endodoncia, en todos sus ámbitos desde el siglo pasado hasta nuestros días ha experimentado una constante evolución, que ha generado cambios que la han modificado notablemente. Uno de ellos es el enfoque biológico que los profesionales perciben del tratamiento que realizan.<sup>1</sup>

Después de un tratamiento endodóntico primario generalmente se llegan a obtener resultados exitosos o funcionales, sin embargo, este fenómeno no siempre sucede; por lo tanto, el potencial regenerativo que pueden tener los tejidos periapicales es un tópico que se encuentra en constante investigación. Protocolarmente, si un tratamiento endodóntico primario no fuera exitoso, tanto el retratamiento no quirúrgico, y, finalmente, una cirugía apical complementaria, ofrecen una alternativa conservadora antes de la exodoncia de la pieza dentaria; y está demostrado que concede al endodoncista una alta seguridad terapéutica en la gran mayoría de los casos que requieran estos tratamientos alternativos.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Sin embargo, la complejidad del sistema de conductos radiculares, la presencia de un biofilm en la patología periapical, o en su defecto una terapia iatrogénica previa que no tenga solución por vía ortógrada; comprometen significativamente el éxito del tratamiento. Será en esos casos en que la cirugía apical complementaria esté indicada, cuando previamente fue agotado todo recurso clínico sin los resultados esperados.<sup>3</sup>

Finalizando una cirugía apical complementaria, después de los procedimientos quirúrgicos correctivos, se realizará la preparación y obturación retroapical, donde se colocará un cemento de obturación retroapical, que dependiendo de su composición y

propiedades será de vital importancia, dado que generará una barrera entre el conducto radicular y los tejidos periapicales; por lo tanto se mantendrá un contacto íntimo entre ambas entidades anatómicas, donde posteriormente se espera la regeneración de la zona subyacente, que consiste en la aposición de hueso alveolar y la inserción periodontal.<sup>1</sup>

Los cementos de obturación retroapical que se utilizan comúnmente en los procedimientos endodónticos quirúrgicos son de diversa manufactura y manipulación. Su campo de acción no solo estará en tejidos duros, sino también con las células periodontales propias de la regeneración posterior, como son los fibroblastos de ligamento periodontal, por lo que se espera que tengan un comportamiento altamente fisiológico.<sup>4</sup>

En el cuerpo humano, y, específicamente en la región periapical, para que exista regeneración es necesaria una respuesta biológica, y aquí los fibroblastos de ligamento periodontal desarrollarán un papel crucial pues sintetizarán fibras y mantendrán la matriz extracelular. Si se ha realizado un procedimiento endodóntico quirúrgico, es de esperar que los cementos de obturación retroapical promuevan una mínima respuesta celular y no causen irritación, en otras palabras, que no sean citotóxicos.<sup>5</sup>

El propósito del estudio fue evaluar *in vitro* la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano.

## **PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN:**

### **Planteamiento del problema:**

Existen situaciones en las que el tratamiento endodóntico primario no alcanza los resultados esperados, y el endodoncista recurre al retratamiento no quirúrgico para tratar de eliminar cualquier factor asociado al fracaso. Habiéndose desarrollado ambos procedimientos y aún así no se alcanza la resolución del caso, la cirugía apical complementaria será la alternativa final antes de la exodoncia de la pieza dentaria.<sup>3</sup>

Antes, durante y después de la etapa quirúrgica, se debe afrontar cada momento operatorio con el instrumental y material necesarios, y entre varias otras elecciones se debe decidir qué cemento de obturación retroapical utilizar, esto resulta importante debido a que éste representará la barrera entre el diente y los tejidos periapicales donde es esperada la regeneración.<sup>1</sup>

Para el cemento de obturación retroapical elegido, es necesario que entre otras propiedades no ofrezca algún efecto citotóxico a los tejidos periapicales. Idealmente, si se cumple este requisito se constituirá en conjunto con las células locales inherentes del huésped, como son los fibroblastos de ligamento periodontal, la base para la regeneración apical.<sup>5</sup>

A través del tiempo se desarrollaron cementos de obturación retroapical como una alternativa a la amalgama, entre ellos se encuentran el Super EBA<sup>®</sup> y el Mineral Trióxido Agregado, que es el más utilizado y es considerado el *gold standard*; siendo el

EndoSequence Root Repair Material® el de más reciente manufactura; cada uno presenta diferentes características, y son considerados opciones válidas para cirugía apical complementaria; sin embargo la incertidumbre resalta en la relación fisiológica que haya entre ellos y el huésped.<sup>1,6</sup>

¿El cemento de obturación retroapical MTA Angelus® tendrá menor citotoxicidad que los cementos EndoSequence Root Repair Material®, y Super EBA® en fibroblastos de ligamento periodontal humano?

### **Justificación**

El fenómeno de reparación apical implica una serie de factores asociados que representan la restitución de los tejidos circundantes alrededor del ápice, y constituye el ideal de cualquier terapia endodóntica, pues será así, en conjunto con la rehabilitación posterior como se devuelva a la pieza dentaria regresar en función.<sup>1</sup>

La cirugía apical complementaria es un procedimiento que algunas veces debe enfrentar el fracaso a pesar de que el profesional siguió los protocolos adecuados. La manera en que los tejidos periapicales se comportan con los cementos de obturación retroapical está siendo constantemente investigada con la finalidad de resolver los enigmas de la reparación apical, la cual está directamente relacionada con la capacidad biológica del cemento utilizado.<sup>2</sup>

Teniendo en cuenta que la respuesta biológica se encuentra directamente relacionada con el pronóstico, la presente investigación es relevante dado que contribuirá con el conocimiento científico acerca de qué efecto tendrá cada uno de los tres cementos de

obturación retroapical estudiados en cultivos primarios de células pertenecientes al huésped, como son los fibroblastos de ligamento periodontal humano. Asimismo, Los resultados pueden ser utilizados como referencia al momento de elegir cada cemento estudiado desde un punto de vista clínico y biológico.

## **MARCO REFERENCIAL**

En el ámbito endodóntico, las patologías periapicales son frecuentemente diagnosticadas, y aunque el factor etiológico principal es la presencia y colonización de microorganismos en el sistema de conductos radiculares, se presentan también como una secuencia de injurias iatrogénicas a la pulpa dental y tejidos periapicales durante el tratamiento endodóntico, como son el trauma físico y químico.<sup>7, 8</sup>

En respuesta, el huésped activará su sistema de defensa, que consiste en varias clases de células, mensajeros intercelulares, anticuerpos y moléculas efectoras. Los factores microbianos y las defensas del huésped se encuentran, y consecuentemente se destruye la mayor parte de los tejidos periapicales, resultando en una formación de diversos tipos de patologías periapicales, incluyendo granulomas o quistes, con la concomitante reabsorción de hueso circundante a los ápices de los dientes afectados.<sup>8</sup>

La terapia indicada es el tratamiento de conductos por vía ortógrada, si ésta no fuera exitosa se indicará el retratamiento del mismo, en una fase final. Si el diente no responde a ninguna de estas terapias se indicará la cirugía apical complementaria.<sup>9, 10</sup>

La cirugía apical complementaria representa el último recurso para mantener un diente tratado endodónticamente con una patología periapical persistente.<sup>11, 12</sup>

El objetivo principal es el de crear condiciones óptimas para permitir la curación a través de la regeneración de tejidos, incluyendo la formación de un nuevo aparato de fijación.<sup>13,</sup>

14

La ventaja significativa de este procedimiento es el de ofrecer un acceso directo e inmediato al ápice radicular, permitiendo el curetaje de los tejidos periapicales, así como la resección de los 3 mm apicales, que con frecuencia contiene ramificaciones o conductos accesorios responsables de la persistencia de la lesión.<sup>15, 16</sup> El índice de éxito reportado oscila entre el 37-97% de los casos, dependiendo si se utilizan técnicas tradicionales o contemporáneas.<sup>17, 18</sup>

Zuolo y col. (2000) reportaron un índice de éxito del 91.2% en 112 piezas correspondientes a su estudio en un periodo de seguimiento de 1 a 4 años; mientras que Barone y col. (2010) reportaron un 74% de dientes sanados y un 94% de dientes funcionales en un periodo de seguimiento de 4 a 10 años.<sup>17, 18</sup>

Las indicaciones para una cirugía apical complementaria incluyen:

- Si hay una fuerte posibilidad de fracaso del tratamiento o retratamiento endodóntico no quirúrgico.
- Si el fracaso fue resultado de un tratamiento endodóntico no quirúrgico, y el retratamiento es imposible o podría no tener un mejor resultado.
- Si es necesaria una biopsia en o cerca del ápice.<sup>19</sup>

A partir de la introducción del microscopio operatorio, se combina la magnificación e iluminación del mismo asociado al uso adecuado de nuevos micro-instrumentos, y surge el concepto de microcirugía apical.

Este procedimiento se puede realizar con precisión y predictibilidad, eliminando las desventajas inherentes con los métodos quirúrgicos tradicionales.<sup>11, 13, 14</sup>

Con el fin de mejorar el resultado de un procedimiento quirúrgico, tres estrategias diferentes pueden ser consideradas:

- Mejoramiento de los equipos / instrumentos.
- Cambios en la técnica quirúrgica.
- Selección apropiada de los casos.<sup>20</sup>

Específicamente, cuando ya se realizaron procedimientos previos, será necesaria una preparación retroapical que satisfaga el imperativo biológico, que consiste en el sellado hermético a cualquier agente nocivo, real o potencial, dentro de los confines de la raíz. Carr (1997) sostuvo que la preparación ultrasónica realizada correctamente puede satisfacer los requerimientos de una preparación retroapical idónea.<sup>21</sup>

El sellado hermético impide la exposición de los tejidos periapicales a las toxinas biológicas, permanentemente. Por consiguiente, una preparación retroapical y la posterior colocación de un cemento de obturación retroapical deben proporcionar un sellado a largo plazo en un entorno dinámico que responda a la posibilidad de reabsorción dentinaria y cementaria, y a los cambios en los mecanismos de defensa del paciente.<sup>21</sup>

Según Lin y col. (2010) es importante entender el potencial de cicatrización natural de las lesiones periapicales después de la eliminación de la etiología. El principio es similar a la cicatrización de heridas del tejido conectivo en otras partes del cuerpo, por lo tanto, es un "evento programado" que secuencialmente presenta las siguientes fases:

- Fase de coagulación o hemostasia.
- Fase de inflamación.
- Fase proliferativa.
- Fase de reparación y/o regeneración.
- Fase de maduración o remodelación.<sup>22</sup>

Al culminar una cirugía apical complementaria se activarán células que intervendrán en la cicatrización de la herida, entre ellas se encuentran los neutrófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos, siendo estos últimos los que serán más predominantes durante la fase proliferativa.<sup>23</sup>

La cicatrización de heridas puede resultar en regeneración o reparación, las cuales dependen de:

- La naturaleza de la herida.
- Disponibilidad de células progenitoras.
- Factores de crecimiento / diferenciación.
- Señales micro-ambientales tales como moléculas de adhesión, la matriz extracelular, y moléculas de proteínas no colágenas asociadas.<sup>22</sup>

El ligamento periodontal (PDL) es un tejido conectivo no mineralizado presente entre dos tejidos que son mineralizados, el hueso alveolar y cemento.<sup>24, 25</sup> Somerman (1988) indica que dentro de sus funciones se incluyen la erupción del diente, el anclaje del mismo en los maxilares, movilidad fisiológica durante la masticación, y suministro de información propioceptiva.<sup>24</sup>

Los fibroblastos de ligamento periodontal humano (PDLF) representan aproximadamente el 5.6% del volumen total del PDL. Giannopoulou (1996) refiere que en caso de alguna lesión o después de un procedimiento quirúrgico, se activarán, proliferarán, y migrarán hacia al lugar de la injuria, para sintetizar nuevos componentes de la matriz extracelular hasta que el defecto se haya corregido.<sup>26</sup>

Estudios de caracterización de PDLF *in vitro* de Nojima y col. (1990) y Groeneveld y col. (1993) mostraron que éstos tienen un comportamiento similar al osteoblasto, pues proliferan fosfatasa alcalina y responden a la hormona paratiroidea y a la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D3, incrementando la producción de adenosín-monofosfato cíclico (cAMP) y osteocalcina, respectivamente. Asimismo, la dexametasona incrementa su fenotipo osteogénico. Por otra parte, los PDLF tienen la capacidad de producir nódulos mineralizados *in vitro*.<sup>27, 28</sup>

Muchos materiales utilizados en el tratamiento endodóntico están en estrecho contacto con el PDL. Además, según Hakki y col. (2012) los PDLF pueden diferenciarse en cementoblastos y/o osteoblastos, conocidos agentes que intervienen en el proceso de regeneración.<sup>29</sup>

Si un material dental será utilizado en seres humanos, la biocompatibilidad o viabilidad celular es esencial, y por lo tanto un análisis detallado de su citotoxicidad tiene que ser considerado antes de su aplicación clínica.<sup>30</sup>

Cuando se hace referencia a citotoxicidad de un material, se habla de la capacidad del mismo de inducir una respuesta apropiada del huésped a una aplicación específica. Esto

significa que los tejidos del huésped que entren en contacto con el material puedan sufrir algún efecto tóxico, irritante, inflamatorio, alergénico, genotóxico o carcinogénico.<sup>31</sup>

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* permiten medir los efectos de un material sobre:

- El número de células o su crecimiento.
- La integridad de las membranas celulares.
- La biosíntesis o actividad de las enzimas.
- El material genético de la célula.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* presentan las siguientes ventajas:

- Estudiar una función específica del metabolismo celular, aislándola de otros procesos.
- Examinar un gran número de muestras de forma rápida y barata.
- Permitir cuantificar los resultados.
- Valorar la sensibilidad a los materiales tóxicos.
- Normalizar los métodos de prueba.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* presentan las siguientes limitaciones:

- Se limitan a un solo tipo celular.
- Las células utilizadas no son iguales que las células del huésped
- Los tejidos cultivados carecen de mecanismos inflamatorios u otro mecanismo de protección<sup>32,33</sup>

En cuanto a los cultivos celulares, consisten en pruebas muy sensibles, y constituyen aproximaciones a lo que puede ocurrir en la clínica humana. Se disponen de dos tipos de células:

- Líneas celulares permanentes; derivadas de colecciones de cultivo.
- Células primarias; establecidas a partir de un tejido u órgano, las cuales mantienen su viabilidad un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo.<sup>33</sup>

Un cultivo celular puede definirse como un crecimiento celular *in vitro*, esto es, en un medio adecuado, de células previamente aisladas a partir de órganos de tejidos o de fluidos de animales vivos. Se trata de obtener un grupo original de células en el que, mediante cuidados y tratamientos precisos, se mantengan en el tiempo la identidad y características de las células primitivas.<sup>34</sup>

La citotoxicidad se puede determinar usando el ensayo colorimétrico basado en el ensayo de metil-tiazol-tetrazolio (MTT), desarrollado por Mosmann en 1983. El MTT es 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio y existe como una sal de tetrazolio amarilla. Mide la supervivencia y/o proliferación celular espectrofotométricamente. El MTT se reduce en células metabólicamente activas por enzimas deshidrogenasas mitocondriales para formar cristales de formazán de color azul oscuro insolubles en agua. El color resultante puede entonces ser cuantificado mediante la medición de la absorbancia, a una longitud de onda entre 540 – 570 nm.<sup>35</sup>

La absorbancia mide cuanta luz es absorbida por un compuesto a una determinada longitud de onda, la cual es necesaria para obtener una información cuantitativa del mismo.<sup>36</sup>

Existe una relación lineal entre el número de células y la absorbancia, por lo tanto, la cantidad de MTT formado en cultivos celulares se correlaciona con la absorbancia. Una menor absorbancia se correlaciona con un menor número de células, y demuestra niveles de citotoxicidad alto. El ensayo de MTT es un método estándar para determinar la citotoxicidad de los materiales dentales en células cultivadas.<sup>35, 37, 38</sup>

En una obturación retroapical los cementos juegan un papel decisivo, ya que pueden dañar potencialmente los tejidos periapicales, promover la inflamación o destrucción, y/o impedir la reparación apical, pues finalmente lo que se pretende es promover la regeneración de un aparato periodontal de inserción que sea funcional, incluyendo el cemento que recubra la superficie radicular reseca, el ligamento periodontal y el hueso alveolar.<sup>39, 40</sup>

Un cemento de obturación retroapical ideal debería incluir en sus características el ser tolerado por los tejidos perirradiculares del huésped, ser biocompatible, antibacteriano o que enclaustra las bacterias residuales, no tóxico, no corrosivo, no reabsorbible, dimensionalmente estable, de fácil manipulación, impermeable, inactivo electroquímicamente, radiopaco, económico, y adaptable a las paredes dentinarias.<sup>41-43</sup> Song y col. (2011) lo consideran un probable predictor de resultados clínicos positivos y por lo tanto, el éxito a largo plazo de la cirugía apical complementaria es a menudo influido por el mismo.<sup>44</sup>

El Mineral Trióxido Agregado (MTA) es un cemento que fue desarrollado inicialmente en la Universidad de Loma Linda por Torabinejad y col.(1993).<sup>45</sup>

Fue usado por primera vez para perforaciones radiculares, pero también ha sido utilizado como una alternativa para varias aplicaciones clínicas, como son la obturación retroapical, manejo de reabsorciones internas, manejo de ápices inmaduros como apexificación o apexogénesis, pulpotomía, y recubrimiento pulpar.<sup>46, 47</sup> debido a su alta biocompatibilidad.<sup>48, 49</sup> La patente principal indica que contiene óxido de calcio y dióxido de silicio, aunque también contiene óxido de bismuto.<sup>50</sup> Se comercializa actualmente en 2 presentaciones: gris (GMTA) y blanco (WMTA). Inicialmente se introdujo en gris, pero debido a la posibilidad de pigmentación de la pieza dentaria tratada, se desarrolló el WMTA.<sup>51</sup> Su presentación es con polvo y agua destilada, cuya mezcla es el resultado de una relación 3:1. El periodo de fraguado es aproximadamente 3-4 horas.<sup>52</sup>

Es comparado usualmente con el cemento Portland. Islam y col. (2006) evaluaron el polvo del GMTA y del WMTA con el cemento Portland, encontrando que tienen constituyentes similares, entre ellos: silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato de calcio, y aluminoferrita tetracálcica.<sup>53</sup> Sin embargo, las principales diferencias entre los dos tipos de MTA y el cemento Portland son la ausencia de potasio y la presencia de óxido de bismuto.<sup>54</sup> Cuando el polvo del MTA es mezclado con agua destilada, se forman inicialmente hidróxido de calcio e hidrato de silicato de calcio, finalmente, se transforman en un gel sólido poco cristalizado y poroso que solidificará en 3-4 horas.<sup>55</sup> Según Camilleri y col. (2008) la relación de silicato de calcio disminuye debido a la formación de un precipitado de calcio. El calcio precipitado produce hidróxido de calcio, que es lo que causa la alta alcalinidad del MTA después de la hidratación.<sup>56</sup>

Su capacidad de sellado, potencial osteogénico, y su biocompatibilidad se han atribuido a su capacidad de liberar iones de calcio y formar una capa adherente. Diversas

investigaciones durante casi 20 años han demostrado sus excelentes propiedades físicas y biológicas.<sup>40, 57-65</sup>

Osorio y col. (1998) demostraron en fibroblastos de ratón (L-929) y fibroblastos gingivales humanos que el MTA no causó reacciones citotóxicas. Asimismo, Gorduysus y col. (2007) comparándolo con selladores endodónticos demostraron que el MTA es el material más biocompatible, y por lo tanto el menos citotóxico.<sup>64, 65</sup>

Recientemente se ha introducido en el mercado un material a base de biocerámica, el EndoSequence Root Repair Material® (ERRM). Según el fabricante, este material se compone de silicatos de calcio, óxido de circonio, óxido de tántalo, fosfato de calcio monobásico, y agentes de relleno. El ERRM está fabricado en un estado premezclado que es en forma de masilla moldeable con instrucciones apropiadas para su uso, esto es muy similar a la presentación de algunas formas de óxido de zinc sin eugenol. Una vez creada la cavidad retroapical, se puede coger una porción del cemento con un instrumento estéril y se puede llevar cuantas veces sea necesario.<sup>66</sup>

Las características que ofrece son su pH de 12.5, sus excelentes propiedades físicas y biológicas, es fácil de manipular, además es hidrofílico, insoluble, radiopaco, libre de aluminio. Tiene un tiempo de trabajo de alrededor de 30 minutos y una reacción de endurecimiento iniciada por humedad, que acaba fraguando aproximadamente después de 4 horas.<sup>67, 68</sup> Estudios han reportado su alta biocompatibilidad *in vitro*.<sup>68-72</sup>

Willershausen y col. (2013) evaluaron la proliferación de PDLF con ERRM, encontrando que tiene mejor comportamiento que el WMTA y GMTA hasta después de 96 horas de

evaluación. Al Anezi y col. (2010) demostraron en fibroblastos de ratón que la citotoxicidad del ERRM es comparable al GMTA y WMTA. Hirschmann y col. (2012) mostraron que el ERRM fue menos citotóxico que el MTA a los 8 días de evaluación.<sup>6, 69, 72</sup>

El Super EBA<sup>®</sup> (SEBA) fue desarrollado en los años 60 como un sustituto con tiempo de fraguado alterado y mayor resistencia que los cementos de óxido de zinc y eugenol. El polvo contiene 60% de óxido de zinc, 34% de óxido de aluminio (alumbre) y 6% de resina natural. El líquido contiene 62.5% de ácido etoxibenzoico (EBA) y 37.5% de eugenol.<sup>73, 74</sup> Oynick y col. (1978) indican que es considerado un cemento de óxido de zinc y eugenol mejorado por la adición del ácido etoxibenzoico.<sup>73</sup>

Su pH es neutro, es poco soluble y tiene una adecuada radiopacidad y tiene excelentes propiedades físicas. Incluso en condiciones húmedas, el SEBA se adhiere a la estructura dental, y puede añadirse de forma incremental, según sea necesario.<sup>75</sup>

El SEBA es un cemento de difícil manipulación, ya que su tiempo de fraguado es corto y está influido por la humedad. En cirugía apical complementaria el líquido y el polvo se mezclan a una proporción de 1:4, el polvo debe añadirse al líquido en pequeños incrementos; y cuando la mezcla está espesa pero aún brillante, ha de añadirse más polvo. La mezcla es adecuada cuando pierde su brillantez y no gotea cuando se manipula con la espátula.<sup>42, 75</sup>

A pesar que estudios de tolerancia en tejidos demuestran que provoca reacciones leves a moderadas debido al eugenol libre.<sup>76-80</sup> Fue propuesto como cemento de obturación

retroapical por sus buenas propiedades de sellado, así como por sus excelentes resultados clínicos.<sup>47, 81-85</sup>

Torabinejad y col. (1995) demostraron que el SEBA presenta una citotoxicidad comparable al IRM (Intermediate Restorative Material por sus silgas en inglés). Zhu y col. (1999) determinaron que IRM y SEBA fueron significativamente menos citotóxicos que la amalgama.<sup>76, 77</sup> Sin embargo, Trope (1996) realizando cirugías apicales complementarias en perros demostró que el SEBA presentó un buen comportamiento histológico después de 6 meses.<sup>81</sup>

Lin y col. (2014) realizaron un estudio retrospectivo de 2 años de seguimiento radiográfico en cirugías apicales complementarias realizadas a 82 pacientes, utilizando SEBA como cemento de obturación retroapical; el promedio de dientes sanados fue de 93.1%.<sup>78</sup>

El propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* la citotoxicidad de los cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> en fibroblastos de ligamento periodontal humano.

## II. OBJETIVOS:

### Objetivo general

Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de los cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> en fibroblastos de ligamento periodontal humano.

### Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de la viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> de 2 y 7 días de fraguado; a 1, 3 y 7 días de evaluación; y a diluciones seriadas de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.
2. Determinar el porcentaje de la viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> de 2 y 7 días de fraguado; a 1, 3 y 7 días de evaluación; y a diluciones seriadas de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.
3. Determinar el porcentaje de la viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical Super EBA<sup>®</sup> de 2 y 7 días de fraguado; a 1, 3 y 7 días de evaluación; y a diluciones seriadas de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.
4. Comparar el porcentaje de la viabilidad celular en PDLF con los cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 2 y 7 días de fraguado a 1, 3 y 7 días de evaluación; y a diluciones seriadas de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.

## **HIPÓTESIS**

La citotoxicidad *in vitro* en PDLF será menor con el cemento de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> para todos los criterios de evaluación de este estudio, en comparación con EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup>.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Diseño del estudio**

La presente investigación se desarrolló con un paradigma cuantitativo y el diseño de estudio fue experimental *in vitro*.

#### **Población**

Cada uno de los pozos de cada placa de cultivo donde se añadirá una solución con PDLF y los extractos de cada cemento de obturación retroapical a diferente tiempo de fraguado, periodo de evaluación y diluciones seriadas. Los extractos corresponden al medio de cultivo que estuvo en contacto con cada cemento de obturación retroapical.

#### **Muestra**

##### **Tamaño muestral**

Para determinar el tamaño muestral, se realizó una prueba piloto, en la cual se utilizaron extractos de los cementos de obturación retroapical MTA y ERRM con el menor periodo de fraguado, es decir 2 días; a 1 día de evaluación; a la dilución menos concentrada, es decir 1:8, en donde se esperaron valores con mayor similitud.

##### **Fórmula muestral:**

Mediante la prueba piloto se aplicó la siguiente fórmula, de comparación de medias:

Donde:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (\sigma_1 + \sigma_2)^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

- $Z_{\alpha/2}$  = Coeficiente de confianza (1.96 para el 95% de confianza).
- $Z_{\beta}$  = Coeficiente cuyo valor depende de la potencia de la prueba (0.84 para 80% de potencia).
- $\sigma_1, \sigma_2$  = Varianza de las poblaciones que son objeto del estudio.
- $(\mu_1 - \mu_2)$  = Diferencia mínima que se desea detectar como significativa.

Entre 2 cementos de obturación retroapical, MTA y ERRM:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 (7.27^2 + 7.16^2)}{(119.97 - 111.22)^2} = 2$$

Los resultados de la aplicación de la fórmula obtuvieron como resultado 2 pozos por cada extracto de cemento de obturación retroapical.

Los grupos se dividieron según el tiempo de fraguado y diluciones para cada día de evaluación (1, 3 y 7 días), existiendo un grupo control:

**Grupo CO (Control positivo):**

Controles 100% de crecimiento de PDLF, es referencia de medición para cada grupo.

Medio de cultivo + PDLF, para cada grupo y subgrupo en cada día de evaluación  
=> 3 pozos.

**Grupo MTA 2:**

Extracto de cemento de obturación retroapical MTA de 2 días de fraguado +  
Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos.

Subgrupo 1:2 => 3 pozos.

Subgrupo 1:4 => 3 pozos.

Subgrupo 1:8 => 3 pozos.

**Grupo ERRM 2:**

Extracto de cemento de obturación retroapical ERRM de 2 días de fraguado +  
Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos.

Subgrupo 1:2 => 3 pozos.

Subgrupo 1:4 => 3 pozos.

Subgrupo 1:8 => 3 pozos.

**Grupo SEBA 2:**

Extracto de cemento de obturación retroapical SEBA de 2 días de fraguado +  
Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos.

Subgrupo 1:2 => 3 pozos.

Subgrupo 1:4 => 3 pozos.

Subgrupo 1:8 => 3 pozos.

**Grupo MTA 7:**

Extracto de cemento de obturación retroapical MTA de 7 días de fraguado +

Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos.

Subgrupo 1:2 => 3 pozos.

Subgrupo 1:4 => 3 pozos.

Subgrupo 1:8 => 3 pozos.

**Grupo ERRM 7:**

Extracto de cemento de obturación retroapical ERRM de 7 días de fraguado +

Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos.

Subgrupo 1:2 => 3 pozos.

Subgrupo 1:4 => 3 pozos.

Subgrupo 1:8 => 3 pozos.

**Grupo SEBA 7:**

Extracto de cemento de obturación retroapical SEBA de 7 días de fraguado +

Medio de cultivo + PDLF.

Subgrupo 1:1 => 3 pozos

Subgrupo 1:2 => 3 pozos

Subgrupo 1:4 => 3 pozos

Subgrupo 1:8 => 3 pozos

**Blancos (Controles negativos):**

Blanco (Sólo Medio de cultivo). => 2 pozos.

Blanco de ERRM2, ERRM7, SEBA2, SEBA7, MTA2, MTA7 (Solo medio de cultivo y extracto de cada cemento de obturación retroapical, que sirvió como medio de calibración de los blancos) => 1 pozo.

**Criterios de inclusión**

Para los cementos de obturación retroapical

- Cementos de obturación retroapical dentro de su fecha de uso según los fabricantes.
- Mezclas de acuerdo a la indicación de los fabricantes.

Para la obtención de las muestras de PDLF

- Pacientes sometidos a tratamiento ortodóntico mayores de 18 años.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas con completo desarrollo radicular.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas sin presencia de caries.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas sin enfermedad periodontal preexistente.

**Criterios de exclusión**

Para los cementos de obturación retroapical

- Cementos de obturación retroapical en su fecha de caducidad.
- Mezclas no compatibles con la indicación de los fabricantes.

### Para la obtención de las muestras de PDLF

- Pacientes sometidos a tratamiento ortodóntico menores de 18 años.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas con ápice abierto.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas con presencia de caries.
- Pacientes con piezas dentarias extraídas con enfermedad periodontal preexistente.

### **Variables**

#### **Variable Independiente:**

##### ***Cementos de obturación retroapical:***

Variable cualitativa nominal politómica que se refiere al tipo de cemento de obturación retroapical, implicó 3 categorías:

- Cemento de obturación retroapical MTA Angelus® (Angelus, Londrina, PR, Brasil).
- Cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material® (Brasseler, Savannah, GA, USA).
- Cemento de obturación retroapical Super EBA® (Bosworth, Skokie, IL, USA).

#### **Variable Dependiente:**

##### ***Citotoxicidad***

Variable cuantitativa continua medida que indica el porcentaje de viabilidad celular, el cual es obtenido en base a los valores resultantes espectrofotométricamente mediante la absorbancia. Los valores menores de 100% indican una reducción o muerte de PDLF, contrariamente, los valores mayores de 100% indican un incremento en la proliferación de PDLF.

**Covariables:*****Periodo de Evaluación:***

Variable cualitativa politómica que indica el período en que se estableció del proceso de evaluación de citotoxicidad de los tres cementos de obturación retroapical en los cultivos de PDLF. Tuvo 3 categorías:

- 1 día
- 3 días
- 7 días

**Tiempo de fraguado de los cementos de obturación retroapical**

Variable cualitativa dicotómica que indica el periodo de tiempo en cual fraguaron los cementos de obturación retroapical, incluyeron 2 categorías:

- 2 días, considerándose como fraguado fresco.
- 7 días, considerándose como fraguado completo.

**Diluciones seriadas de los extractos de los cementos de obturación retroapical**

Variable cualitativa que indica la dilución seriada de los cementos de obturación retroapical en el medio de cultivo, incluyéndose 4 categorías:

- 1:1
- 1:2
- 1:4
- 1:8

## **Técnicas y/o procedimientos**

### **Validación del instrumento y calibración**

**Método:** Ensayo de metil-tiazol-tetrazolio (MTT).

### **Procedimiento**

#### **Preparación de las muestras de PDLF**

Para este estudio se utilizaron “fibroblastos de ligamento periodontal humano” (PDLF), que se obtuvieron por medio de premolares erupcionados y extraídos por motivos no patológicos, así como por razones ortodónticas en un solo paciente, al cual se le proporcionó una hoja informativa antes de las exodoncias (**ANEXO 1**), la cual fue aprobada por el comité de ética (**ANEXO 2**) junto con las informaciones para la recolección de los datos (**ANEXO 3**). Antes de las exodoncias, se realizó una incisión surcal alrededor de las piezas dentarias, obteniendo una elevación limitada del colgajo (es decir, no se extendió hasta la unión mucogingival).

El tejido gingival se separó de la zona cervical radicular por medio de un raspado profundo para evitar la contaminación de los tejidos de ligamento periodontal por el tejido conectivo gingival. Todos los procedimientos de laboratorio fueron realizados en una Cabina de flujo laminar SterilGard III (The Baker Company, Sanford, ME, USA) para asegurar condiciones asépticas. Las muestras se colocaron en el “medio de biopsia” [medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, glutamina, 5 µg/ml de anfotericina B, y suero fetal bovino (FBS) al 10%] y posteriormente fueron lavadas tres veces con este medio antes de su procesamiento.

Estas precauciones se tomaron para que la contaminación con los tejidos gingivales y apicales se minimice, y sólo los tejidos de ligamento periodontal del tercio medio de la superficie radicular sean utilizados (**ANEXO 4**).

El tejido necesario del tercio medio de la superficie radicular fue removido con un bisturí N° 15. Posteriormente, estos tejidos fueron colocados en placas de cultivo de 10 cm para la aplicación de la técnica de explantación de tejidos mediante DMEM, el cual fue suplementado con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, 5 µg/ml de Anfotericina B, y FBS al 10%.

Los pequeños trozos de tejido estuvieron dispersos en un portaobjetos de vidrio y posteriormente fueron colocados en placas de cultivo. Luego se colocaron en una incubadora con control de humedad Autoflow NU-4850 (Nuair, Plymouth, MN, USA) a 37°C, 100% de humedad relativa y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en el “medio de biopsia”. Al día siguiente, se reemplazó el “medio de biopsia” con “medio de cultivo” (DMEM suplementado con 50 µg/ml de sulfato de Gentamicina, 5 µg/ml de Anfotericina B, 1.16 g/L de Glutamina, y FBS al 10%).

Cuando los fibroblastos de ligamento periodontal (PDLF) que rodearon los trozos de tejido de ligamento periodontal fueron confluentes, se transfirieron a frascos de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> utilizando Tripsina al 0.08% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.04%, y se designaron "Primeras células de transferencia".

Este fenómeno ocurrió al cabo de 15 a 20 días, entonces las células fueron subcultivadas. Las células utilizadas estuvieron entre los pasajes 4 y 5 (**ANEXO 5**).

### **Preparación de los cementos de obturación retroapical**

Tanto MTA Angelus<sup>®</sup> (Angelus, Londrina, PR, Brasil), EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> (Brasseler, Savannah, GA, USA) y Super EBA<sup>®</sup> (Bosworth, Skokie, IL, USA) se obtuvieron de fuentes comerciales, no habiendo para los investigadores ningún conflicto de intereses (**ANEXO 2**). Se elaboraron, bajo condiciones asépticas con materiales e instrumental previamente esterilizado dos discos de cada material a 37°C y 100% de humedad relativa durante 2 y 7 días, respectivamente.

Para dar forma a los discos de cada cemento de obturación retroapical se utilizaron moldes de goma de tal forma que se obtuvieron discos de 10 mm de diámetro y 3 mm de espesor, utilizando un porta-amalgama para la dispensación y un atacador de amalgama para la compactación (**ANEXO 6**).

Después del fraguado, los discos fueron expuestos a luz ultravioleta durante 20 minutos en cada superficie para asegurar la esterilidad de los mismos, y se transfirieron a placas de cultivo de 24 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contuvieron 1 ml de DMEM por pozo y se incubaron a 37°C, 100% de humedad relativa y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, obteniendo de esta manera los extractos de cada cemento de obturación retroapical (**ANEXO 7**).

### **Ensayos de citotoxicidad**

La suspensión de PDLF (100 ml/pozo) se sembró en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/100µL y se incubó durante 24 horas para lograr la unión de las células antes de la adición de los extractos.

Posteriormente, cada extracto fue dividido en 6 grupos experimentales, correspondientes a los cementos de 2 y 7 días de fraguado; 1 grupo control de 100% de crecimiento (control positivo), que contuvo la suspensión de PDLF con DMEM, el blanco de los cementos de obturación retroapical sirvió como control negativo. Posteriormente, se hizo una dilución seriada de los extractos a una relación 1:1 con DMEM para conseguir un total de 4 concentraciones de cada extracto (1:1, 1:2, 1:4 y 1:8). **(ANEXO 8)**.

Después de la incubación por 1, 3, y 7 días, la citotoxicidad se determinó mediante el “ensayo de metil-tiazol-tetrazolio” (MTT) utilizando el M5655 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) según las instrucciones del fabricante.

Cada placa de cultivo fue incubada por 4 horas con 25 µl en cada pozo de MTT (5mg/ml) disuelto en FBS. Luego de este periodo se adicionó 100 µl de una solución disolvente compuesta de 20 ml de agua destilada + 200 µl de HCl (Ácido clorhídrico) + 2 g de SDS (Dodecilsulfato, sal sódica) que fue utilizada para disolver los cristales de formazán en una solución azul oscuro. Las placas fueron dejadas por 24 horas en incubación, y posteriormente fueron llevadas a un lector de placas VersaMax ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) **(ANEXO 9)**.

### **Instrumento**

Finalmente, utilizando la ficha de recolección de datos **(ANEXO 3)**, viabilidad celular se calculó en base al porcentaje de la absorbancia de los pozos de prueba en relación a los pozos control. La absorbancia del blanco se restó de los valores previamente obtenidos.

### **Plan de análisis**

Se realizó el análisis estadístico univariado y bivariado con el programa SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

#### **Análisis univariado:**

De las variables cuantitativas se obtuvo la medida de tendencia central (media), y la medida de dispersión (desviación estándar).

#### **Análisis bivariado:**

Se realizó el análisis de la relación entre variables; si los datos presentaban distribución normal se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes, y si no presentaban distribución normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, a un nivel de significancia de 99%.

#### **Análisis trivariado:**

Se realizó el análisis de la relación entre variables; si los datos presentaban distribución normal se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA), y si no presentaban distribución normal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, a un nivel de significancia de 99%.

### **Consideraciones éticas**

Se proporcionó una hoja informativa al paciente donante de tejido de ligamento periodontal antes de las extracciones previamente planificadas en la clínica dental docente de la UPCH, la cual fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (**ANEXO 2**).

Para el manejo y desecho de las muestras se siguió las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo en Ciencia y tecnología (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.<sup>86</sup>

## **Recursos**

### **Materiales e instrumentos**

- Cemento de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> (Londrina, PR, Brasil) (1)
- Cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> (Brasseler, Savannah, GA, USA) (1)
- Cemento de obturación retroapical Super EBA<sup>®</sup> (Bosworth, Skokie, IL, USA) (1)
- Medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- Sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- FBS (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) (1)
- Tripsina + EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- Pipetas (Bellco, Vineland, NJ, USA) (50)
- Micropipeteador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (1)
- Multipipeteador 25-250  $\mu$ g (Biohit, Helsinki, Finlandia) (1)
- Multipipeteador 40-200  $\mu$ g (Biohit, Helsinki, Finlandia) (1)
- Viales (Gibco/Life technologies, Paisley, UK) (6)
- Tubos de ensayo (Gibco/Life technologies, Paisley, UK) (20)
- Tubos Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)(10)
- Papel de pesaje 6x6'' (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) (3)

- Jeringas filtro MillexGV de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Cork, Irlanda) (6)
- Plataforma de mezclado Titramax 100 (Heidolph, Schwabach, Alemania) (1)
- Microscopio invertido PhotoZoom (Cambridge Instruments, Watertown, MA, USA) (1)
- Balanza analítica Mettler AE100 (Mettler-Toledo, Giesen, Alemania) (1)
- Alcohol isopropílico 70% (BD Biosciences, Nueva Jersey, USA) (10)
- Incubadora con control de humedad Autoflow NU-4850 (Nuaire, Plymouth, MN, USA) (1)
- Mezcladora Vortex Genie 2 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) (1)
- Baño maría digital (VWR Scientific, Radnor, PA, USA) (1)
- Cabina de flujo laminar SterilGard III (The Baker Company, Sanford, ME, USA) (1)
- Placas de cultivo de 24 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) (2)
- Placas de cultivo de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) (3)
- MTT M5655 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1)
- Solución SDS (Dodecilosulfato, sal sódica) (Merck, Hohenbrunn, Alemania) (1)
- Ácido Clorhídrico 37% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Lector de placas VersaMax ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (1)
- Platina de vidrio (3)
- Espátula de cemento (Saona, Perú) (3)
- Mango de bisturí (Saona, Perú) (5)
- Hoja de bisturí N° 15 (5)
- Guantes quirúrgicos (Modern, Shanghai Motex Healthcare, Shanghai, China) (10 pares)
- Atacador de amalgama (Saona, Perú) (1)
- Porta-amalgama (Saona, Perú) (1)
- Manguera de 1 cm de diámetro (1 m) (1)
- Cámara fotográfica Samsung PL210 (Samsung Electronics, Beijing, China) (1)

- Regla milimetrada de 30 mm (Artesco, Perú) (1)
- Laptop Dell Inspiron 1525 (Dell Industries, Round Rock, TX, USA) (1)
- Software IBM SPSS 20 (Armonk, New York, USA)
- Software SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Útiles de escritorio

### **Recursos humanos**

- 2 investigadores
- 1 laboratorista

### **Recursos ambientales**

- Departamento de Biología celular y Virología de los Laboratorios de investigación y desarrollo en ciencia y tecnología Abraham Vaisberg Wolach (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

#### IV. RESULTADOS

El presente estudio evaluó la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano.

Se utilizaron un total de 276 pozos, con un total de 3 pozos para cada grupo, 27 pozos en total para el control 100% de crecimiento (control positivo) y 6 pozos para el control negativo.

La citotoxicidad del cemento de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> se evaluó de la siguiente manera:

El grupo MTA 2 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $113.83 \pm 2.908$  para la dilución 1:1,  $105.63 \pm 2.921$  para la dilución 1:2,  $105.81 \pm 4.696$  para la dilución 1:4, y  $119.97 \pm 7.278$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación fue de  $157.33 \pm 8.058$  para la dilución 1:1,  $139.75 \pm 5.987$  para la dilución 1:2,  $117.11 \pm 4.509$  para la dilución 1:4, y  $109.28 \pm 4.347$  para la dilución 1:8. Finalmente, en 7° día de evaluación fue de  $166.40 \pm 12.335$  para la dilución 1:1,  $136.76 \pm 2.242$  para la dilución 1:2,  $127.95 \pm 22.960$  para la dilución 1:4, y  $94.82 \pm 27.198$  para la dilución 1:8.

#### **(Tabla 1) (Gráfico N°1)**

El grupo MTA 7 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $97.95 \pm 1.942$  para la dilución 1:1,  $91.91 \pm 12.206$  para la dilución 1:2,  $97.61 \pm 6.702$  para la dilución 1:4, y  $117.36 \pm 3.206$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación de  $130.75 \pm 4.258$  para la dilución 1:1,  $125.62 \pm 5.306$  para la dilución 1:2,  $113.14 \pm 0.432$  para la dilución 1:4, y  $115.84 \pm 8.142$  para la dilución 1:8.

Finalmente, en el 7° día de evaluación de  $116.24 \pm 10.511$  para la dilución 1:1,  $126.21 \pm 9.112$  para la dilución 1:2,  $114.34 \pm 7.059$  para la dilución 1:4, y  $120.60 \pm 3.345$  para la dilución 1:8. **(Tabla 1) (Gráfico N°1)**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el grupo MTA 2 con las diluciones 1:1 y 1:2, y para el grupo MTA 7 con las diluciones 1:1, 1:2 y 1:4 entre los 3 periodos de evaluación ( $P < 0.05$ ). **(Tabla 1)**

La citotoxicidad del cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material® se evaluó de la siguiente manera:

El grupo ERRM 2 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $96.18 \pm 4.697$  para la dilución 1:1,  $98.09 \pm 1.256$  para la dilución 1:2,  $103.13 \pm 2.538$  para la dilución 1:4, y  $111.22 \pm 7.162$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación fue de  $62.68 \pm 1.265$  para la dilución 1:1,  $85.52 \pm 2.280$  para la dilución 1:2,  $88.07 \pm 3.596$  para la dilución 1:4, y  $90.75 \pm 1.968$  para la dilución 1:8. Finalmente, en el 7° día de evaluación fue de  $49.72 \pm 0.785$  para la dilución 1:1,  $73.71 \pm 3.716$  para la dilución 1:2,  $79.84 \pm 2.572$  para la dilución 1:4, y  $85.16 \pm 3.687$  para la dilución 1:8. **(Tabla 2) (Gráfico N°2)**

El grupo ERRM 7 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $94.10 \pm 2.660$  para la dilución 1:1,  $98.66 \pm 8.871$  para la dilución 1:2,  $95.60 \pm 5.711$  para la dilución 1:4, y  $116.22 \pm 7.616$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación fue de  $107.67 \pm 3.557$  para la dilución 1:1,  $123.71 \pm 8.314$  para la dilución 1:2,  $113.55 \pm 5.882$  para la dilución 1:4, y  $116.36 \pm 8.046$  para la dilución 1:8.

Finalmente, en el 7° día de evaluación fue de  $120.00 \pm 13.160$  para la dilución 1:1,  $140.76 \pm 11.435$  para la dilución 1:2,  $124.45 \pm 11.371$  para la dilución 1:4, y  $128.36 \pm 15.521$  para la dilución 1:8. **(Tabla 2) (Gráfico N°2)**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el grupo ERRM 2 con todas las diluciones, y para el grupo ERRM 7 con las diluciones 1:1 y 1:2 entre los 3 periodos de evaluación ( $P < 0.05$ ). **(Tabla 2)**

La citotoxicidad del cemento de obturación retroapical Super EBA® se evaluó de la siguiente manera:

El grupo SEBA 2 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $9.02 \pm 2.396$  para la dilución 1:1,  $114.42 \pm 6.641$  para la dilución 1:2,  $92.08 \pm 16.501$  para la dilución 1:4, y  $116.58 \pm 5.416$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación fue de  $6.97 \pm 0.302$  para la dilución 1:1,  $100.31 \pm 6.443$  para la dilución 1:2,  $102.04 \pm 5.002$  para la dilución 1:4, y  $95.88 \pm 2.247$  para la dilución 1:8. Finalmente, en el 7° día de evaluación fue de  $5.60 \pm 1.265$  para la dilución 1:1,  $100.81 \pm 5.008$  para la dilución 1:2,  $94.85 \pm 8.281$  para la dilución 1:4, y  $93.37 \pm 2.040$  para la dilución 1:8. **(Tabla 3) (Gráfico N°3)**

El grupo SEBA 7 mostró una viabilidad celular en el 1° día de evaluación de  $5.28 \pm 0.067$  para la dilución 1:1,  $111.31 \pm 4.023$  para la dilución 1:2,  $106.68 \pm 4.260$  para la dilución 1:4, y  $117.88 \pm 5.398$  para la dilución 1:8. En el 3° día de evaluación fue de  $6.75 \pm 1.564$  para la dilución 1:1,  $88.99 \pm 5.769$  para la dilución 1:2,  $96.18 \pm 3.032$  para la dilución 1:4, y  $102.71 \pm 7.235$  para la dilución 1:8.

Finalmente, en el 7° día de evaluación fue de  $3.63 \pm 0.229$  para la dilución 1:1,  $94.83 \pm 2.729$  para la dilución 1:2,  $106.08 \pm 0.761$  para la dilución 1:4, y  $101.82 \pm 8.051$  para la dilución 1:8. **(Tabla 3) (Gráfico N°3)**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el grupo SEBA 2 con la dilución 1:8, y para el grupo SEBA 7 con las diluciones 1:1 y 1:2 y 1:4 entre los 3 periodos de evaluación ( $P < 0.05$ ). **(Tabla 3)**

La viabilidad celular de todos los cementos de obturación retroapical se encuentran en el **Gráfico N°4**.

Al comparar la citotoxicidad entre tipo de cemento de obturación retroapical a los 2 y 7 días de tiempo de fraguado, según periodo de evaluación y diluciones, hubo diferencia estadísticamente significativa con la dilución 1:1 en los 3 periodos de evaluación entre los grupos de MTA; con todas las diluciones en el 3° día de evaluación y con las diluciones 1:1 y 1:2 en el 7° día de evaluación entre los grupos de ERRM; y con la dilución 1:2 en el 3° y 7° día de evaluación entre los grupos de SEBA ( $P < 0.05$ ). **(Tabla N°4)**

Al comparar la citotoxicidad entre tipo de cemento de obturación retroapical según el mismo tiempo de fraguado, periodo de evaluación y diluciones, a los 2 días de tiempo de fraguado entre los grupos MTA y ERRM hubo diferencia estadísticamente significativa con la diluciones 1:1 y 1:2 en los 3 días de periodo de evaluación, con la dilución 1:4 en el 3° día de evaluación, y con la dilución 1:8 en el 1° y 3° día de evaluación ( $P < 0.05$ ); a los 2 días de tiempo de fraguado entre los grupos MTA y SEBA hubo diferencia

estadísticamente significativa con la dilución 1:1 en los 3 días de periodo de evaluación, y con la dilución 1:2 en el 3° y 7° día de evaluación ( $P < 0.05$ ); a los 2 días de tiempo de fraguado entre los grupos ERRM y SEBA hubo diferencia estadísticamente significativa con la dilución 1:1 en los 3 días de evaluación, y con la dilución 1:2 en el 7° día de evaluación ( $P < 0.05$ ). A los 7 días de tiempo de fraguado entre los grupos MTA y ERRM hubo diferencias estadísticamente significativas con la dilución 1:1 en el 3° día de evaluación ( $P < 0.05$ ); a los 7 días de tiempo de fraguado entre los grupos ERRM y SEBA hubo diferencias estadísticamente significativas con la dilución 1:1 en los 3 días de periodo de evaluación, y con la dilución 1:4 en el 1° día de evaluación ( $P < 0.05$ ); a los 7 días de tiempo de fraguado entre los grupos MTA y SEBA hubo diferencias estadísticamente significativas con la dilución 1:1 en los 3 días de periodo de evaluación, con la dilución 1:2 en el 3° y 7° día de evaluación, y con las diluciones 1:4 y 1:8 en el 3° día de evaluación ( $P < 0.05$ ). **(Tabla N°5)**

Al comparar la citotoxicidad entre diluciones según tipo de cemento de obturación retroapical, tiempo de fraguado y periodo de evaluación, entre 1:1 y 1:2 hubo diferencia estadísticamente significativa en los 3 días de periodo de evaluación con los grupos MTA 2 y SEBA 7, en el 3° Y 7° día de evaluación con los grupos ERRM 2 y SEBA 2, y en el 3° día de evaluación con el grupo ERRM 7 ( $P < 0.05$ ). Entre 1:1 y 1:4 hubo diferencia estadísticamente significativa en el 3° día de evaluación con los grupos MTA 2 y MTA 7, en el 3° y 7° día de evaluación con el grupo ERRM 2, y en los 3 días de periodo de evaluación con los grupos SEBA 2 y SEBA 7 ( $P < 0.05$ ). Entre 1:1 y 1:8 hubo diferencia estadísticamente significativa en el 3° y 7° día con el grupo MTA 2, en el 1° y 3° día de evaluación con los grupos MTA 7 y SEBA 7, en los 3 días de periodo de evaluación con el grupo ERRM 2, en el 1° día de evaluación con el grupo ERRM 7, en los 3 días de

periodo de evaluación con el grupo SEBA 2 ( $P < 0.05$ ). Entre 1:2 y 1:4 hubo diferencia estadísticamente significativa en el 3° día de evaluación con el grupo MTA 2, en el 1° día de evaluación con el grupo ERRM 2, y en el 7° día de evaluación con el grupo SEBA 7 ( $P < 0.05$ ). Entre 1:2 y 1:8 hubo diferencia estadísticamente significativa en el 1° y 3° día de evaluación con el grupo MTA 2, y en el 3° y 7° día de evaluación con el grupo ERRM 2 ( $P < 0.05$ ). Entre 1:4 y 1:8 hubo diferencia estadísticamente significativa en el 1° día de evaluación con los grupos MTA 7, ERRM 7 y SEBA 7 ( $P < 0.05$ ). **(Tabla N°6)**

Al compara la citotoxicidad entre periodos de evaluación según tipo de cemento de obturación retroapical, tiempo de fraguado y diluciones, entre el 1° y 3° día de evaluación hubo diferencia estadísticamente significativa en las diluciones 1:1 y 1:2 con el grupo MTA 2, en la dilución 1:1 con el grupo MTA 7, en todas las diluciones con el grupo ERRM 2, en la dilución 1:1 con el grupo ERRM 7, en la dilución 1:8 con el grupo SEBA 2, y en las diluciones 1:4 y 1:8 con el grupo SEBA 7 ( $P < 0.05$ ). Entre el 1° y 7° día de evaluación hubo diferencia estadísticamente significativa en las diluciones 1:1 y 1:2 con los grupos MTA 2 y SEBA 7, en la dilución 1:4 con el grupo MTA 7, en todas las diluciones con el grupo ERRM 2, en la dilución 1:2 con el grupo ERRM 7, en la dilución 1:8 con el grupo SEBA 2 ( $P < 0.05$ ). Entre el 3° y 7° día de evaluación hubo diferencias estadísticamente significativas en las diluciones 1:1, 1:4 y 1:8 con el grupo ERRM 2, en la dilución 1:2 con el grupo ERRM 7, y en la dilución 1:4 con el grupo SEBA 7 ( $P < 0.05$ ). **(Tabla N°7)**

Al comparar la citotoxicidad entre tipo de cemento de obturación retroapical y tiempo de fraguado según periodo de evaluación y diluciones, entre los cementos de obturación retroapical de 2 días de tiempo de fraguado hubo diferencia estadísticamente significativa

en las diluciones 1:1 y 1:2 en los 3 días de periodos de evaluación, en la dilución 1:4 en el 3° y 7° día de evaluación, y en la dilución 1:8 en el 3° día de evaluación ( $P < 0.05$ ). Entre los cementos de obturación retroapical de 7 días de tiempo de fraguado hubo diferencia estadísticamente significativa en la dilución 1:1 en los 3 días de periodos de evaluación, en la dilución 1:2 en el 3° y 7° día de evaluación, y en la dilución 1:4 en el 3° día de evaluación ( $P < 0.05$ ). **(Tabla N°8)**

## V. DISCUSIÓN

El propósito del estudio fue evaluar *in vitro* la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical: MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 2 y 7 fraguado en fibroblastos de ligamento periodontal humano en periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días utilizando diluciones seriadas.

Al culminar una cirugía apical complementaria colocando un cemento de obturación retroapical, se desarrollará una serie de eventos programados que darán lugar a la cicatrización apical, la cual puede plasmarse en reparación y/o regeneración, dependiendo de factores extrínsecos e intrínsecos.<sup>22</sup> En este estudio, para simular el entorno clínico, se utilizaron fibroblastos de ligamento periodontal humano debido a que estas células primarias son necesarias para pruebas de sensibilidad específica,<sup>49, 68</sup> y porque desempeñan una labor esencial en la cicatrización.<sup>22, 26</sup> Para aumentar el rigor de la colección de las muestras, éstas se obtuvieron del tercio medio radicular para evitar algún tipo de contaminación con los tejidos gingival y apical de las piezas extraídas.<sup>24</sup>

Los periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días fueron elegidos básicamente porque corresponden a la participación exponencial y decrecimiento de los fibroblastos luego de una injuria, como puede ser una cirugía apical complementaria.<sup>23</sup>

Con respecto a la calibración del fraguado de los cementos de obturación retroapical, de acuerdo a Damas y col. 48 horas no son suficientes, sólo después de 168 horas (7 días) se puede obtener muestras completamente fraguadas de los tres cementos, especialmente por ERRM. Ma y col. en el 2011 demostraron que el ERRM necesita de 2 días de

fraguado para considerarlo como “fraguado fresco”, así como 7 días de fraguado para considerarlo como “fraguado completo”.<sup>68, 71</sup>

La citotoxicidad es una de las características más comúnmente investigada en estudios *in vitro* para determinar la biocompatibilidad de un material endodóntico antes de las pruebas en estudios clínicos.<sup>6</sup> Específicamente, en los cementos de obturación retroapical es de particular interés, ya que puede ocasionar la degeneración de los tejidos periapicales y el retraso de la cicatrización de la herida. En condiciones *in vitro*, las pruebas para medir la citotoxicidad resultan simples y pueden llevarse a cabo bajo condiciones controladas. En la presente investigación, la utilización de extractos a diferentes concentraciones fue para observar a qué cantidad de dosis se obtuvo una respuesta, así como para simular el entorno postquirúrgico en la zona apical, en donde los elementos tóxicos del cemento de obturación retroapical filtran en los fluidos circundantes a la cripta ósea.<sup>49</sup>

Debido a que tanto MTA, ERRM y SEBA pueden liberar componentes iónicos que pueden interferir con la actividad enzimática intracelular se utilizó el ensayo MTT, el cual mide la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, las cuales forman cristales de formazán de color azul oscuro. La absorbancia del color resultante se correlaciona con la cantidad de células, y demuestra los niveles de citotoxicidad. Las ventajas de este método son la simplicidad, rapidez y precisión. Además, no requiere radioisótopos.<sup>35</sup>

La viabilidad celular del MTA en PDLF en nuestro estudio fue muy alta con el tiempo de fraguado de 2 días, lo cual coincide con el estudio de Osorio y col. quienes en 1998 demostraron en fibroblastos de ratón y fibroblastos gingivales humanos que el MTA de 2

días de fraguado, en comparación con otros materiales endodónticos entre ellos el SEBA, no causó reacciones citotóxicas en un periodo de evaluación de 72 horas.<sup>64</sup>

También coincidimos con el estudio de Keiser y col. en el 2000 quienes demostraron que el MTA de fraguado fresco como el de 1 día de fraguado es menos tóxico que SEBA y amalgama en todas las diluciones seriadas. Asimismo, concordamos con Gorduysus y col. en 2007, que, en muestras de 1 día de fraguado en periodos de evaluación de 24, 48 y 72 horas, compararon el MTA con otros selladores endodónticos con el ensayo MTT, y demostraron que el MTA es el material mas biocompatible, y por lo tanto el menos citotóxico.<sup>49, 65</sup>

Sin embargo encontramos que la viabilidad celular del MTA fue reduciéndose a los 7 días de fraguado lo cual es similar al estudio de Willershausen y col. quienes en 2013 evaluaron la proliferación de PDLF con WMTA, GMTA y ERRM con 1 día de fraguado en un periodo de 6, 24, 72 y 96 horas de evaluación, encontrando diferencias estadísticamente significativas los derivados de MTA y ERRM, habiendo una disminución de la proliferación de PDLF con MTA en la evaluación de 24 a 96 horas, aunque ellos utilizaron el test Alamar Blue, así como también discos y no extractos de los cementos de obturación retroapical.<sup>6</sup>

En cuanto a la citotoxicidad del ERRM, nuestro estudio fue realizado con la presentación “masilla”, el cual mostró una citotoxicidad similar al MTA en el tiempo de fraguado de 7 días lo cual coincide con el estudio de Ma y col. quienes 2011 evaluaron en fibroblastos gingivales la citotoxicidad del ERRM con MTA, IRM y Cavit, encontrando que el MTA y el ERRM presentaron comportamientos similares.<sup>68</sup>

Particularmente el estudio de Ma y col. las muestras de ERRM tuvieron una alta viabilidad en el 3° día de evaluación que en el 7° día de evaluación en la muestras de 2 y 7 días de fraguado, nuestro estudio presentó en el mismo periodo de evaluación un fenómeno de disminución de la viabilidad celular con las muestras de 2 días de fraguado, y un incremento en las muestras de 7 días de fraguado, proporcional a las diluciones; las diferencias pueden explicarse probablemente a la metodología utilizada en las muestras de tejido tomadas.

Así como también concordamos con Al Anezi y col. quienes demostraron en 2010 en fibroblastos de ratón que la citotoxicidad del ERRM es comparable al GMTA y WMTA.<sup>69</sup> Nuestros resultados de citotoxicidad de MTA y ERRM tuvieron similar tendencia, a pesar que obtuvimos valores más altos. De la misma manera concordamos con Damas y col. quienes en 2011 mostraron que el ERRM de 7 días de fraguado tuvo un comportamiento similar al MTA en 24 horas de evaluación en fibroblastos epiteliales.<sup>71</sup> En cuanto a los periodos de evaluación concordamos con Hirschmann y col. quienes en 2012 mostraron en fibroblastos dermales que el ERRM de 7 días de fraguado fue más tóxico que el MTA a las 48 horas, se mantuvieron similares a los 5 días y fue menos citotóxico a los 8 días, no habiendo diferencias estadísticamente significativas en comparación con MTA.<sup>72</sup>

Un hallazgo interesante en cuanto al tiempo de fraguado, ERRM obtuvo una relación proporcional decreciente en las diluciones seriadas a los 2 días de fraguado, muy por el contrario, fue creciente a los 7 días de fraguado.

Nuestros resultados revelaron que SEBA mostró una citotoxicidad dependiente de la dilución más concentrada (1:1) significativamente más alta ( $P < 0.05$ ) que los otros cementos de obturación retroapical. Esto se confirmó debido a la baja tasa de supervivencia de PDLF en el medio. El aumento de la muerte celular se observó desde el 1° de evaluación, habiendo muy pocas células, hasta el 7° de evaluación, habiendo aún menos. Samara y col. (2011) indican que, aunque el SEBA ha sido ampliamente utilizado en la práctica clínica, la citotoxicidad sigue siendo un problema, debido a la citotoxicidad que es inducida principalmente por la filtración del eugenol.<sup>79</sup>

Esto coincide con los estudios de Osorio y col. así como con Song y col. quienes en 2014 compararon en PDLF la citotoxicidad del SEBA con 2 presentaciones de MTA y Endocem con un periodo de fraguado de 7 días y a 6, 12 y 48 horas de evaluación, encontrando que el SEBA es significativamente más citotóxico que las 2 presentaciones de MTA, estos resultados concuerdan con los nuestros a pesar de que se utilizaron metodologías distintas, pues ellos utilizaron el test WST-1 y discos en lugar de extractos.<sup>64, 80</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup> de 2 días de fraguado es mayor que de 7 días de fraguado. Aumenta proporcionalmente a los periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días. Así como hubo una tendencia a ser mayor a las diluciones seriadas más concentradas con 2 días de fraguado, observándose diferencias estadísticamente significativas.
2. El porcentaje de viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> de 7 días de fraguado es mayor que de 2 días de fraguado. Decece proporcionalmente a los periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días con 2 días de fraguado, aumentando proporcionalmente con 7 días de fraguado. Así como hubo una tendencia a ser mayor a las diluciones seriadas más concentradas con 7 días de fraguado, observándose diferencias estadísticamente significativas.
3. El porcentaje de viabilidad celular en PDLF con el cemento de obturación retroapical Super EBA<sup>®</sup> de 2 días de fraguado, a pesar de observarse alguna diferencia estadísticamente significativa en algunas diluciones, la tendencia fue mantenerse similar al de 7 días de fraguado. Decece proporcionalmente a los periodos de evaluación de 1, 3 y 7 días. Así como fue menor a la dilución más concentrada, observándose diferencias estadísticamente significativas.

4. La comparación entre los cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> muestra un porcentaje de viabilidad celular de PDLF dependiente mayoritariamente al tiempo de fraguado, y minoritariamente al periodo de evaluación y diluciones seriadas, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

## **RECOMENDACIONES**

- Dentro de las limitaciones de este estudio *in vitro* los resultados sugieren que los tres cementos de obturación retroapical son recomendados en cirugía apical complementaria dado que a determinada dosis su comportamiento biológico es similar.
- Es necesario realizar más investigaciones en otras condiciones de fraguado, periodos de evaluación y concentración para avalar la idoneidad del uso clínico de los tres cementos de obturación retroapical estudiados.
- Se recomienda mayores investigaciones *in vitro* con el cemento de obturación retroapical ERRM, debido a su reciente introducción y poca evaluación. Todo en conjunto para que paulatinamente permita que se realicen estudios clínicos a corto y largo plazo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernabé PF, Holland R. Cirugía paraendodóntica; Cómo practicarla con fundamento científico. En: Estrela C. Ciencia endodóntica. São Paulo: Ed. Artes Médicas;2005, p. 657-76.
2. Glickman GN, Hartwell GR. Surgical Procedures in Endodontics. En: Ingle's Endodontics. 6° Ed. Beijing: People's Medical Publishing House (PMPH);2008, p. 1233-35.
3. Bramante CM, Bebert A. Cirurgia Paraendodôntica. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2000. p. 1-3.
4. Rhodes JS. Advanced Endodontics. Clinical Retreatment and Surgery. 1° Ed.Londres: Taylor & Francis; 2006. p. 177-183.
5. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. J Dent Res. 2004;83(5):408-13.
6. Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, Weyer V, Willershausen B, Marroquin BB. Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. Arch Oral Biol. 2013;58(9):1232-7.
7. Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. J Endod. 2009;35(5):634-42.
8. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):348-81.
9. Ruddle CJ. Nonsurgical retreatment. J Endod. 2004;30(12):827-45.
10. Gagliani M, Gorni F, Strohmer L. Periapical resurgery versus periapical surgery: a 5 years longitudinal comparison. Int Endod J. 2005;38(5):320-327.
11. Kim S, Baek S. The microscope and endodontics. Dent Clin North Am. 2004;48(1):11-8.
12. Gutmann JL. Principles of endodontic surgery for the general practitioner. Dent Clin North Am. 1984;28(4):895-908.
13. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: A review. J Endod. 2006;32(7):601-23.
14. Rubinstein RA, Kim S. Long-term follow-up of cases considered healed one year after apical microsurgery. J Endod. 2002;28(5):378-83.
15. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: A review. Int Endod J. 2006;39(4):249-81.

16. Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006; 39(5):343-56.
17. Zuolo ML, Ferreira MO, Gutmann JL. Prognosis in periradicular surgery: a clinical prospective study. *Int Endod J.* 2000;33(2):91-8.
18. Barone C, Dao TT, Basrani BB, Wang N, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study—phases 3, 4, and 5: apical surgery. *J Endod.* 2010;36(1):28-35.
19. Carrotte P. Surgical endodontics. *Br Dent J.* 2005;198(2):71-9.
20. von Arx T, Peñarrocha M, Jensen S. Prognostic factors in apical surgery with root-end filling: a meta-analysis. *J Endod.* 2010;36(6):957-73.
21. Carr GB. Ultrasonic root end preparation. *Dent Clin North Am.* 1997;41(3):541-54.
22. Lin L, Chen MY, Ricucci D, Rosenberg PA. Guided tissue regeneration in periapical surgery. *J Endod.* 2010;36(4):618-25.
23. Witte Mb, Barbul A. General principle of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28.
24. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster FA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988;67(1):66-70.
25. Hakki SS, Hakki EE, Nohutcu RM. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2009;44(6):794-802.
26. Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res.* 1996;75(3):895-902.
27. Nojima N, Kobayashi M, Shinome M, Takayashi N, Suda T, Haseguwa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal Res.* 1990;25(3):179-85.
28. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen. A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor. *J Dent Res.* 1993;72(9):1344-50.
29. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(3):240-8.
30. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29(20):2941–53.

31. Araki Ribeiro D, Hungaro Duarte MA, AkemiMatsumoto M, AlencarMarques ME, FaveroSalvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod.* 2005;31(8):605-7.
32. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(3):359-66.
33. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22 Suppl 2:S6-11.
34. Arenholt-Bindslev D, Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int Endod J.* 1990;23(2):84-91.
35. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
36. Boyer R. *Modern Experimental Biochemistry.* 2° Ed. California: The Benjamin Cummings publishing company; 1999.
37. Pascon EA, Spångberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *J Endod.* 1990;16(9):429-33.
38. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010;43(9):769-74.
39. Bernath M, Szabo J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endod J.* 2003; 36(4):256-61.
40. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Reza Yavari H, Reza Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod.* 2006;32(8):776-80.
41. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;87(4):398-404.
42. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am.* 1992;36(2):357-78.
43. Gutmann JL, Pitt Ford TR. Management of the resected root end: a clinical review. *Int Endod J.* 1993;26(5):273-83.
44. Song M, Jung I-Y, Lee S-J, Lee C-Y, Kim E. Prognostic factors for clinical outcomes in endodontic surgery: a retrospective study. *J Endod.* 2011;37(7):927-33.
45. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root-end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5.

46. Torabinejad M, Chivian N. Clinical application of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-205.
47. Aqrabawi J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *Br Dent J.* 2000;188(5):266-8.
48. Asrari M, Lobner D. In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials. *J Endod.* 2003;29(11):743-6.
49. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000;26(5):288-91.
50. Torabinejad M, White DJ. Tooth filling material and use. US Patent number 5,769,638;Jun 1998.
51. Kratchman SI. Perforation repair and one-step apexification procedures. *Dent Clin North Am* 2004;48(1):291-307.
52. Hashem AA, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: Sealability study. *J Endod.* 2008;34(1):59-61.
53. Islam I, Chng HK, Yap AU. X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J.* 2006;39(3):220-5.
54. Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(6):809-15.
55. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007; 40(6):462-70.
56. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2008; 41(5):408-17.
57. Walker M, Diliberto A, Lee C. Effect of Setting Conditions on Mineral Trioxide Aggregate Flexural Strength. *J Endod.* 2006;32(4):334-6.
58. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997;23(4):225-8.
59. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2004;30(1):25-9.
60. Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Int Endod J.* 2004;37(11):738-48.

61. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012;38(4):495-500.
62. Bates CF, Carnes DL, del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod.* 1996;22(11):575-8.
63. Yatsushiro JD, Baumgartner JC, Tinkle JS. Longitudinal study of the microleakage of two root-end filling materials using a fluid conductive system. *J Endod.* 1998;24(11):716-9.
64. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998;24(2):91-6.
65. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2007;33(12):1450-4.
66. Koch KA, Brave DG, Bioceramics, Part 2: The clinician's viewpoint. *Dent Today.* 2012;31(2):118, 120, 122-5.
67. Hansen S, Marshall G, Sedgley C. 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. *J Endod.* 2011;37(4):502-6.
68. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *J Endod.* 2011;37(6):793-8.
69. Al Anezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of EndoSequence Root Repair Material; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):122-5.
70. 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. *J Endod.* 2012;38(4):486-9.
71. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod.* 2011;37(3):372-5.
72. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385-8.
73. Oynick J, Oynick T. A study of a new material for retrograde fillings. *J Endod.* 1978;4(7):203-6.

74. Thirawat J, Edmunds DH. Sealing ability of materials used as retrograde root fillings in endodontic surgery. *Int Endod J.* 1989;22(6):295-8.
75. Kim S. Microcirugía endodóntica. En: Cohen S, Burns RC. *Endodoncia, Vías de la pulpa.* 8° Ed. Madrid: Elsevier Science Mosby;2002, p. 715-16.
76. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(10):489-92.
77. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells. *J Endod.* 1999;25(6):410-2.
78. Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;15;71(2):429-40.
79. Samara A, Sarri Y, Stravopodis D, Tzanetakis GN, Kontakiotis EG, Anastasiadou E. A comparative study of the effects of three root-end filling materials on proliferation and adherence of human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2011;37(6):865-70.
80. Song M, Yoon TS, Kim SY, Kim E. Cytotoxicity of newly developed pozzolan cement and other root-end filling materials on human periodontal ligament cell. *Restor Dent Endod.* 2014;39(1):39-44.
81. Trope M, Lost C, Schmitz HJ, Friedman S. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(2):221-8.
82. Song M, Kim E. A Prospective Randomized Controlled Study of Mineral Trioxide Aggregate and Super Ethoxy-Benzoic Acid as Root-end Filling Materials in Endodontic Microsurgery. *J Endod.* 2012;38(7):875-9.
83. Pitt Ford TR, Andreasen JO, Dorn SO, Kariyawasam SP. Effect of Super EBA as a root-end filling on healing after replantation. *J Endod.* 1995;21(1):13-5.
84. Li H, Zhai F, Zhang R, Hou B. Evaluation of Microsurgery with SuperEBA as Root-end Filling Material for Treating Post-treatment Endodontic Disease: A 2-year Retrospective Study. *J Endod.* 2014;40(3):345-50.
85. Rubinstein RA, Kim S. Short-term observation of the results of endodontic surgery with the use of a surgical operation microscope and Super-EBA as root-end filling material. *J Endod* 1999;25(1):43-8.
86. *Manual de Bioseguridad de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología.* Lima: Editorial UPCH;2013.

## VIII. TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla N°1

### PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DEL CEMENTO DE OBTURACIÓN RETROAPICAL MTA EN PDLF (%)

Días de fraguado	Dilución	n	1° día de Evaluación		3° día de Evaluación		7° día de Evaluación		Significancia
			□	DS	□	DS	□	DS	
<b>MTA 2</b>	1:1	3	113.83	2.908	157.33	8.058	166.40	12.335	<0.05
	1:2	3	105.63	2.921	139.75	5.987	136.76	2.242	< 0.001
	1:4	3	105.81	4.696	117.11	4.509	127.95	22.960	*0.066
	1:8	3	119.97	7.278	109.28	4.347	94.82	27.198	0.249
<b>MTA 7</b>	1:1	3	97.95	1.942	130.75	4.258	116.24	10.511	<0.05
	1:2	3	91.91	12.206	125.62	5.306	126.21	9.112	<0.05
	1:4	3	97.61	6.702	113.14	0.432	114.34	7.059	<0.05
	1:8	3	117.36	3.206	115.84	8.142	120.60	3.345	0.576

Prueba de análisis de varianza ANOVA

\* Prueba de Kruskal-Wallis

□: Promedio de los porcentajes de viabilidad celular.

MTA 2: Cemento de obturación retroapical MTA Angelus® de 2 días de fraguado.

MTA 7: Cemento de obturación retroapical MTA Angelus® de 7 días de fraguado.

Tabla N°2

**PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DEL CEMENTO DE OBTURACIÓN  
RETROAPICAL ERRM EN PDLF (%)**

Días de fraguado	Dilución	n	1° día de Evaluación		3° día de Evaluación		7° día de Evaluación		Significancia
			□	DS	□	DS	□	DS	
<b>ERRM 2</b>	1:1	3	96.18	4.697	62.68	1.265	49.72	0.785	< 0.001
	1:2	3	98.09	1.256	85.52	2.280	73.71	3.716	< 0.001
	1:4	3	103.13	2.538	88.07	3.596	79.84	2.572	< 0.001
	1:8	3	111.22	7.162	90.75	1.968	85.16	3.687	<0.05
<b>ERRM 7</b>	1:1	3	94.10	2.660	107.67	3.557	120.00	13.160	<0.05
	1:2	3	98.66	8.871	123.71	8.314	140.76	11.435	<0.05
	1:4	3	95.60	5.711	113.55	5.882	124.45	11.371	*0.051
	1:8	3	116.22	7.616	116.36	8.046	128.36	15.521	0.364

Prueba de análisis de varianza ANOVA

\* Prueba de Kruskal-Wallis

□: Promedio de los porcentajes de viabilidad celular.

ERRM 2: Cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material® de 2 días de fraguado.

ERRM 7: Cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material® de 7 días de fraguado.

Tabla N°3

**PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DEL CEMENTO DE OBTURACIÓN  
RETROAPICAL SEBA EN PDLF (%)**

Días de fraguado	Dilución	n	1° día de Evaluación		3° día de Evaluación		7° día de Evaluación		Significancia
			□	DS	□	DS	□	DS	
<b>SEBA 2</b>	1:1	3	9.02	2.396	6.97	0.302	5.60	1.265	0.095
	1:2	3	114.42	6.641	100.31	6.443	100.81	5.008	*0.061
	1:4	3	92.08	16.501	102.04	5.002	94.85	8.281	0.555
	1:8	3	116.58	5.416	95.88	2.247	93.37	2.040	< 0.001
<b>SEBA 7</b>	1:1	3	5.28	0.067	6.75	1.564	3.63	0.229	<0.05
	1:2	3	111.31	4.023	88.99	5.769	94.83	2.729	<0.05
	1:4	3	106.68	4.260	96.18	3.032	106.08	0.761	<0.05
	1:8	3	117.88	5.398	102.71	7.235	101.82	8.051	*0.066

Prueba de análisis de varianza ANOVA

\* Prueba de Kruskal-Wallis

□: Promedio de los porcentajes de viabilidad celular.

SEBA 2: Cemento de obturación retroapical Super EBA® de 2 días de fraguado.

SEBA 7: Cemento de obturación retroapical Super EBA® de 7 días de fraguado.

**Tabla N°4**

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD ENTRE TIPO DE CEMENTO DE  
OBTURACIÓN RETROAPICAL DE 2 Y 7 DÍAS DE TIEMPO DE FRAGUADO  
SEGÚN PERIODO DE EVALUACIÓN Y DILUCIÓN**

Tiempo de fraguado	Periodo de Evaluación	Dilución			
		1:1	1:2	1:4	1:8
<b>MTA 2 - MTA 7</b>					
	1° día de Evaluación	<0.05	0.190	*0.400	0.412
	3° día de Evaluación	<0.05	0.162	0.288	0.156
	7° día de Evaluación	<0.05	0.120	0.361	0.240
<b>ERRM 2 - ERRM 7</b>					
	1° día de Evaluación	0.628	0.931	0.255	0.547
	3° día de Evaluación	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	7° día de Evaluación	<0.05	<0.05	*0.100	0.060
<b>SEBA 2 - SEBA 7</b>					
	1° día de Evaluación	0.118	*1.000	0.189	0.168
	3° día de Evaluación	0.844	<0.05	0.325	0.321
	7° día de Evaluación	0.119	0.061	0.163	*0.400

\* Prueba U de Mann-Whitney  
Prueba *t* de Student para muestras independientes

MTA 2, ERRM 2, SEBA 2: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 2 días de fraguado.

MTA 7, ERRM 7, SEBA 7: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 7 días de fraguado.

Tabla N°5

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD ENTRE TIPO DE CEMENTO DE OBTURACIÓN RETROAPICAL SEGÚN EL MISMO TIEMPO DE FRAGUADO, PERIODO DE EVALUACIÓN Y DILUCIÓN**

Tiempo de fraguado	Dilución	Periodo de Evaluación		
		1° día de Evaluación n	3° día de Evaluación n	7° día de Evaluación n
<b>MTA 2 - ERRM 2</b>				
	<b>1:1</b>	<0.05	<0.05	<0.05
	<b>1:2</b>	<0.05	<0.05	<0.05
	<b>1:4</b>	*0.400	<0.05	0.062
	<b>1:8</b>	< 0.001	<0.05	0.631
<b>MTA 2 - SEBA 2</b>				
	<b>1:1</b>	< 0.001	<0.05	<0.05
	<b>1:2</b>	*0.100	<0.05	<0.05
	<b>1:4</b>	*0.400	0.092	0.203
	<b>1:8</b>	0.256	0.072	0.939
<b>ERRM 2 - SEBA2</b>				
	<b>1:1</b>	<0.05	< 0.001	<0.05
	<b>1:2</b>	*0.100	0.056	<0.05
	<b>1:4</b>	0.419	0.080	0.101
	<b>1:8</b>	0.132	0.169	0.058
<b>MTA 7 - ERRM 7</b>				
	<b>1:1</b>	0.086	<0.05	0.636
	<b>1:2</b>	0.635	0.770	0.344
	<b>1:4</b>	0.730	0.907	*0.700
	<b>1:8</b>	0.859	0.960	0.534
<b>ERRM 7 - SEBA 7</b>				
	<b>1:1</b>	< 0.001	< 0.001	<0.05
	<b>1:2</b>	0.229	0.050	<0.05
	<b>1:4</b>	<0.05	0.071	*0.100
	<b>1:8</b>	0.786	0.237	*0.100
<b>MTA 7 - SEBA 7</b>				
	<b>1:1</b>	< 0.001	<0.05	<0.05
	<b>1:2</b>	0.056	<0.05	<0.05
	<b>1:4</b>	0.202	<0.05	0.166
	<b>1:8</b>	0.824	<0.05	*0.100

\* Prueba U de Mann-Whitney

Prueba *t* de Student para muestras independientes

MTA 2, ERRM 2, SEBA 2: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus®, EndoSequence Root Repair Material® y Super EBA® de 2 días de fraguado.

MTA 7, ERRM 7, SEBA 7: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus®, EndoSequence Root Repair Material® y Super EBA® de 7 días de fraguado.

Tabla N°6

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD ENTRE DILUCIONES SEGÚN TIPO DE CEMENTO DE OBTURACIÓN RETROAPICAL, TIEMPO DE FRAGUADO Y PERIODO DE EVALUACIÓN**

Diluciones	Tiempo de fraguado	Periodo de Evaluación		
		1° día de Evaluación	3° día de Evaluación	7° día de Evaluación
<b>1:1 1:2</b>				
	MTA 2	<0.05	<0.05	<0.05
	MTA 7	0.483	0.261	0.282
	ERRM 2	0.533	< 0.001	<0.05
	ERRM 7	0.441	<0.05	0.108
	SEBA 2	*0.100	<0.05	< 0.001
	SEBA 7	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>1:1 1:4</b>				
	MTA 2	*0.200	<0.05	0.063
	MTA 7	0.937	<0.05	0.807
	ERRM 2	0.087	< 0.001	< 0.001
	ERRM 7	0.700	0.212	*0.100
	SEBA 2	<0.05	< 0.001	< 0.001
	SEBA 7	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>1:1 1:8</b>				
	MTA 2	0.246	<0.05	<0.05
	MTA 7	<0.05	<0.05	0.532
	ERRM 2	<0.05	< 0.001	< 0.001
	ERRM 7	<0.05	0.162	0.516
	SEBA 2	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	SEBA 7	< 0.001	< 0.001	*0.100
<b>1:2 1:4</b>				
	MTA 2	*1.000	<0.05	0.575
	MTA 7	0.517	0.054	0.149
	ERRM 2	<0.05	0.357	0.079
	ERRM 7	0.642	0.159	*0.400
	SEBA 2	*0.100	0.731	0.346
	SEBA 7	0.243	0.129	<0.05
<b>1:2 1:8</b>				
	MTA 2	<0.05	<0.05	0.115
	MTA 7	0.061	0.156	0.373
	ERRM 2	0.082	<0.05	<0.05
	ERRM 7	0.060	0.333	0.328
	SEBA 2	*0.400	0.324	0.076
	SEBA 7	0.167	0.062	*0.700
<b>1:4 1:8</b>				
	MTA 2	*0.100	0.096	0.182
	MTA 7	<0.05	0.623	0.237

<b>ERRM 2</b>	0.139	0.321	0.109
<b>ERRM 7</b>	<0.05	0.652	*1.000
<b>SEBA 2</b>	0.071	0.123	0.778
<b>SEBA 7</b>	<0.05	0.223	*1.000

---

\* Prueba U de Mann Whitney

Prueba T para muestras independientes

MTA 2, ERRM 2, SEBA 2: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 2 días de fraguado.

MTA 7, ERRM 7, SEBA 7: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 7 días de fraguado.

Tabla N°7

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD ENTRE PERIODO DE EVALUACIÓN SEGÚN TIPO DE CEMENTO DE OBTURACIÓN RETROAPICAL, TIEMPO DE FRAGUADO Y DILUCIONES**

Periodo de Evaluación	Tiempo de fraguado	Dilución			
		1:1	1:2	1:4	1:8
<b>1° día de Evaluación - 3° día de Evaluación</b>					
	MTA 2	<0.05	<0.05	*0.100	0.071
	MTA 7	<0.05	0.070	0.062	0.650
	ERRM 2	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	ERRM 7	<0.05	0.113	0.092	0.959
	SEBA 2	0.314	*0.100	0.500	<0.05
	SEBA 7	0.234	0.052	<0.05	<0.05
<b>1° día de Evaluación - 7° día de Evaluación</b>					
	MTA 2	<0.05	< 0.001	*0.100	0.287
	MTA 7	0.094	0.067	<0.05	0.151
	ERRM 2	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	ERRM 7	0.079	<0.05	*0.100	0.230
	SEBA 2	0.195	*0.100	0.821	<0.05
	SEBA 7	<0.05	<0.05	0.833	*0.100
<b>3° día de Evaluación - 7° día de Evaluación</b>					
	MTA 2	0.081	0.367	0.419	0.506
	MTA 7	0.227	0.945	0.796	0.292
	ERRM 2	<0.05	0.053	<0.05	<0.05
	ERRM 7	0.163	<0.05	*0.400	0.133
	SEBA 2	0.220	0.941	0.239	0.370
	SEBA 7	0.080	0.230	<0.05	*1.000

\* Prueba U de Mann-Whitney  
Prueba *t* de Student para muestras independientes

MTA 2, ERRM 2, SEBA 2: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 2 días de fraguado.

MTA 7, ERRM 7, SEBA 7: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus<sup>®</sup>, EndoSequence Root Repair Material<sup>®</sup> y Super EBA<sup>®</sup> de 7 días de fraguado.

Tabla N°8

**COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD ENTRE TIPO DE CEMENTO DE OBTURACIÓN RETROAPICAL Y TIEMPO DE FRAGUADO SEGÚN PERIODO DE EVALUACIÓN Y DILUCIONES**

Tiempo de fraguado	Periodos de Evaluación	Diluciones			
		1:1	1:2	1:4	1:8
<b>MTA 2 - ERRM 2 - SEBA 2</b>					
	1° día de Evaluación	<0.001	*<0.05	*0.329	0.337
	3° día de Evaluación	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05
	7° día de Evaluación	<0.001	<0.001	<0.05	0.736
<b>MTA 7 - ERRM 7 - SEBA 7</b>					
	1° día de Evaluación	<0.001	0.095	0.109	0.936
	3° día de Evaluación	<0.001	<0.05	<0.05	0.129
	7° día de Evaluación	<0.001	<0.05	*0.099	*0.066

Prueba de análisis de varianza ANOVA

\* Prueba de Kruskal-Wallis

MTA 2, ERRM 2, SEBA 2: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus®, EndoSequence Root Repair Material® y Super EBA® de 2 días de fraguado.

MTA 7, ERRM 7, SEBA 7: Cementos de obturación retroapical MTA Angelus®, EndoSequence Root Repair Material® y Super EBA® de 7 días de fraguado.

Gráfico N°1

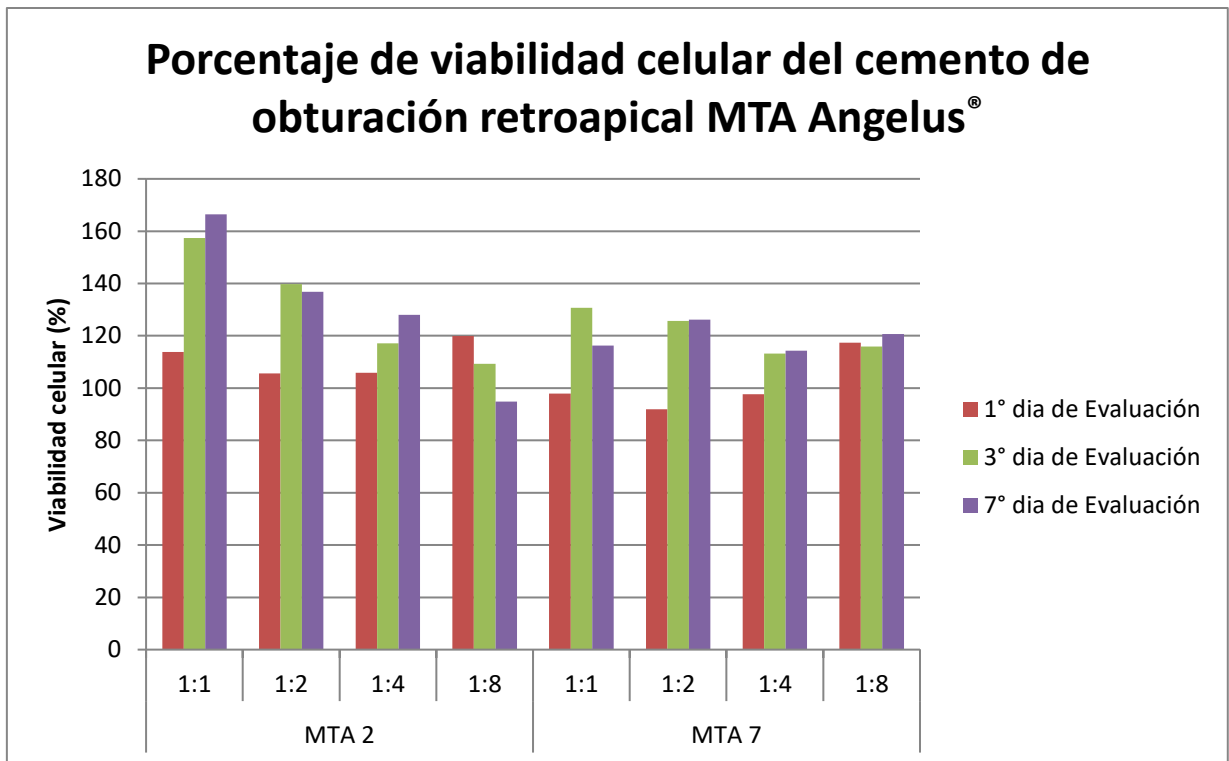


Gráfico N°2

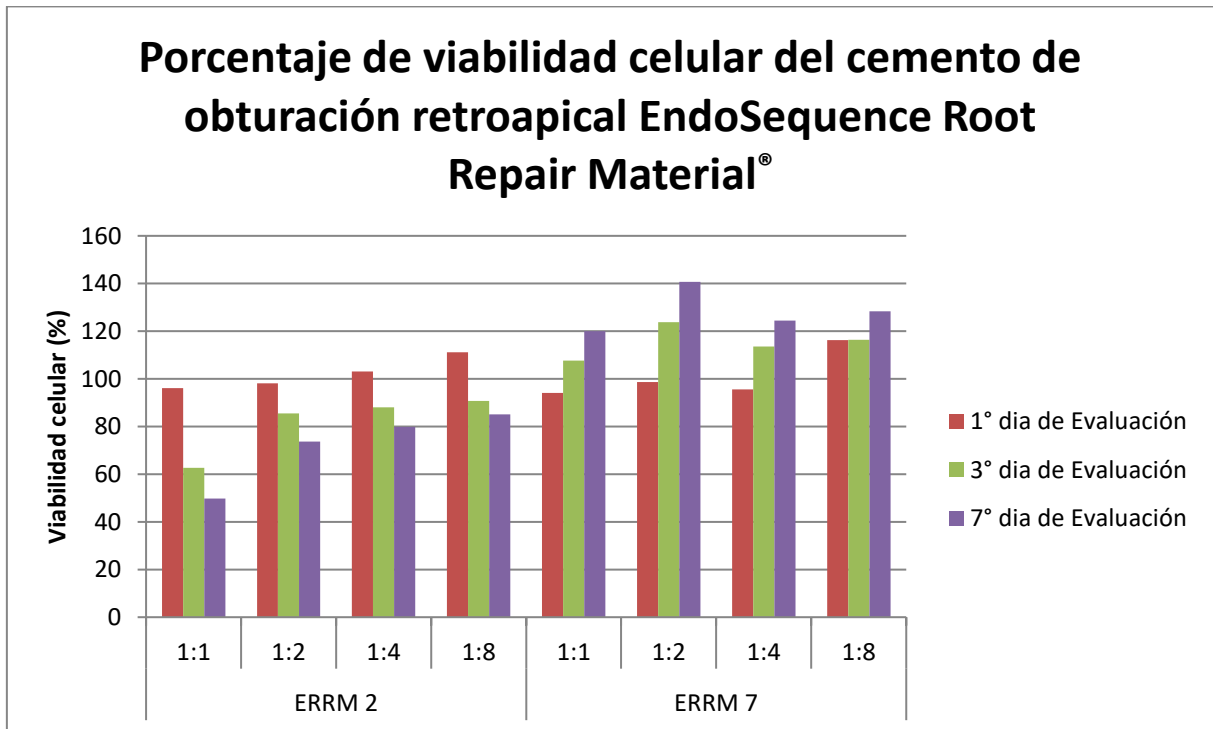


Gráfico N°3

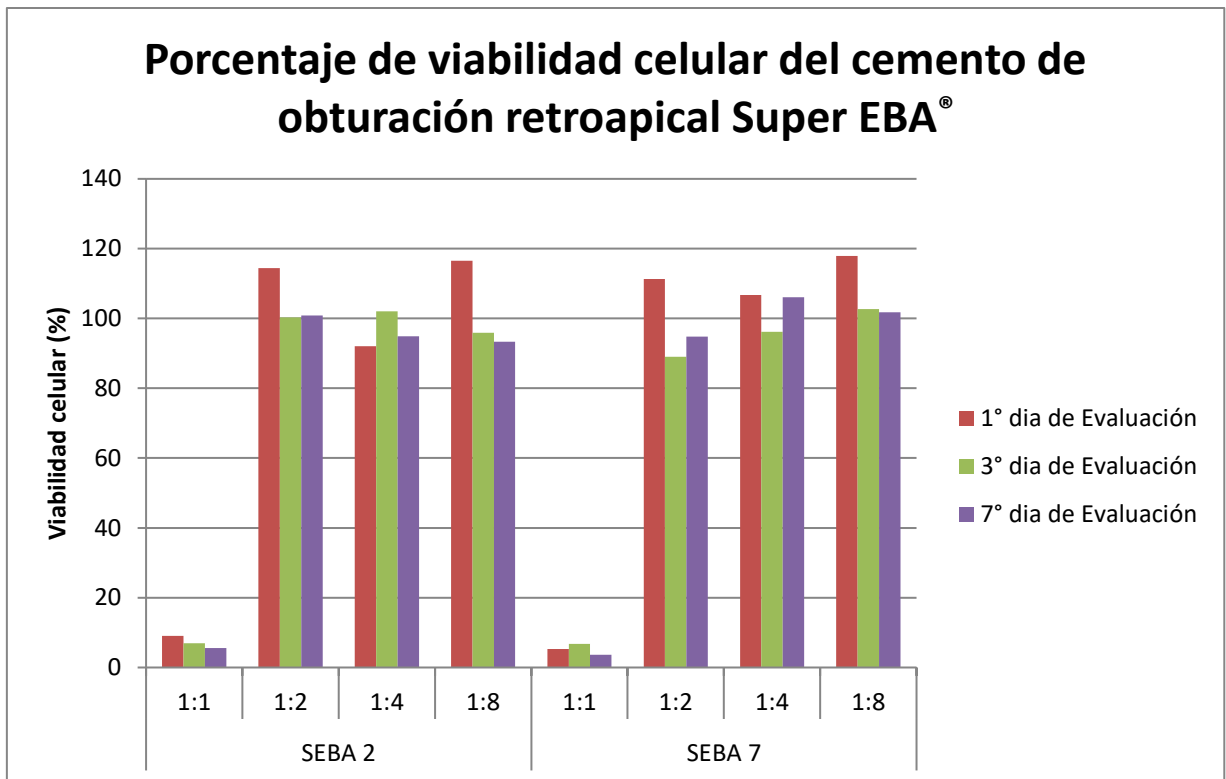
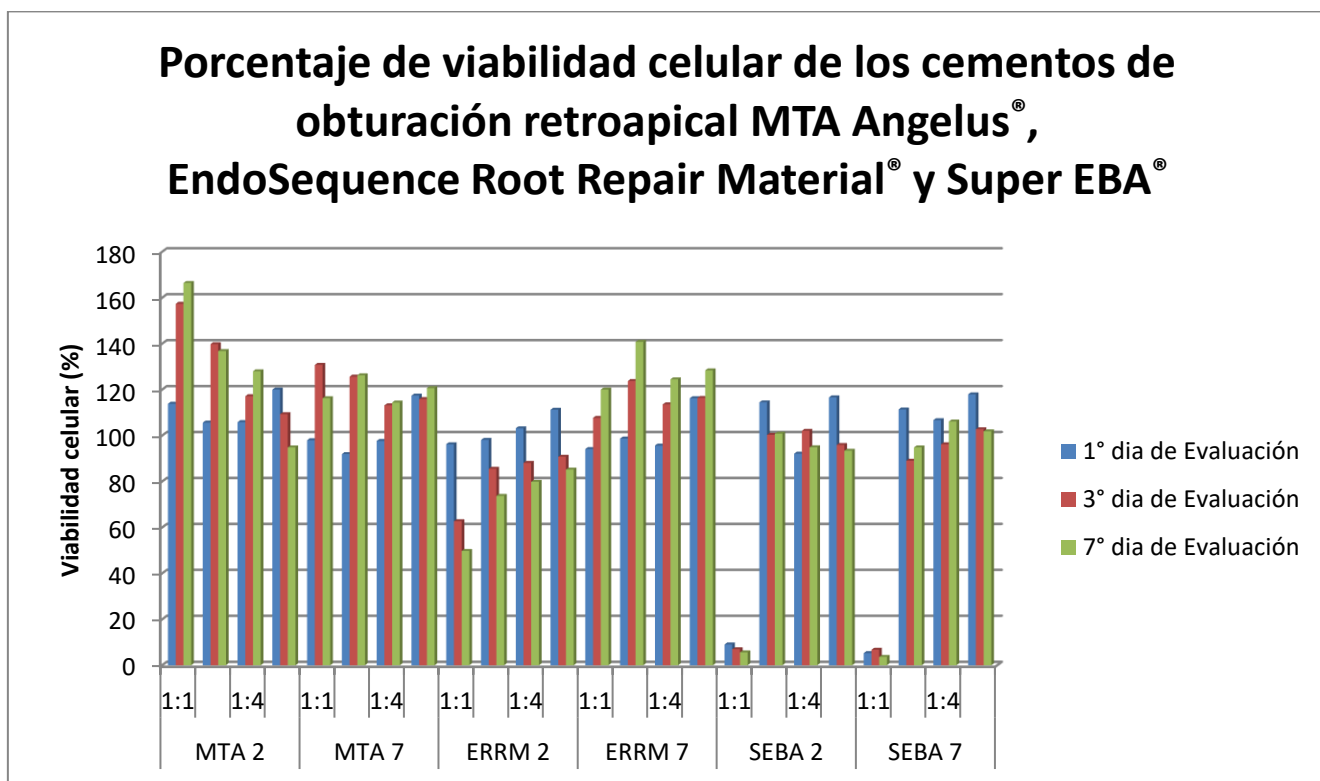


Gráfico N°4



## ANEXOS

### ANEXO 1:

## HOJA INFORMATIVA PARA EL PARTICIPANTE DEL ESTUDIO, APROBADA POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA UPCH

**HOJA INFORMATIVA PARA EL PARTICIPANTE DEL ESTUDIO**

“Evaluación *in vitro*” de la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano”

Investigador: Eric Hernán Coaguila Llerena  
UPCH Teléfono: [REDACTED]

Lo(a) estamos invitando a participar en un estudio llamado: “Evaluación *in vitro*” de la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano”. Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual tiene por objetivo evaluar el efecto que tienen tres cementos de uso odontológico en células de ligamento periodontal, las cuales provienen del tejido alrededor de la raíz de una pieza dentaria.  
La información que le proporcionaremos le permitirá decidir de manera informada si desea participar o no

**Procedimientos**

- ✓ Ud. está siendo invitado(a) a participar porque presenta un plan de tratamiento de Ortodoncia en la Clínica Dental Docente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual incluye la extracción de cuatro piezas dentarias en sus arcadas. Dichas extracciones serán realizadas como procedimientos rutinarios por su odontólogo tratante en la clínica.
- ✓ Si usted decide participar en este estudio nosotros sólo colectaremos las 2 piezas dentarias que le fueron extraídas y las utilizaremos en un estudio experimental para medir cuán tóxico es el cemento usado en odontología.
- ✓ Su muestras serán guardadas por un periodo máximo de 1 año y luego serán eliminadas.

**Beneficios:**  
No existe beneficio directo por participar en el estudio. Sin embargo, usted recibirá un triptico donde se especifican los cuidados en salud oral.

**Costos e incentivos**  
Usted no deberá pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de colaborar a un mejor entendimiento del efecto de tres cementos de uso odontológico.

**Riesgos e incomodidades**  
No existen riesgos por participar en el estudio.

**Confidencialidad**  
Nosotros no obtendremos ningún dato personal (por ejemplo, nombre, teléfono, etc.). Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita su identificación como participante en este estudio.  
Usted puede hacer todas las preguntas que desee antes de decidir si desea participar o no, nosotros las responderemos gustosamente. Si, una vez que usted ha aceptado participar, posteriormente se desanima o no desea continuar, puede hacerlo sin ninguna preocupación. Ninguna medida será tomada en su contra.


**Contacto**  
Cualquier duda respecto a esta investigación, puede consultar con el investigador principal, Eric Hernán Coaguila Llerena al celular [REDACTED] usted tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al presidente del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Dr. Fredy Canchihuamán Rivera al teléfono 01- 319000 anexo 2271

Una copia de esta hoja informativa le será entregada

Cordialmente,

C.D. Eric Hernán Coaguila Llerena  
DNI [REDACTED]

28



## ANEXO 2:

# APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA UPCH Y DECLARACIÓN FINANCIERA DE CONFLICTOS DE INTERESES



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación  
Dirección Universitaria de Investigación,  
Ciencia y Tecnología - DUICT

### CONSTANCIA 08 - 07- 14

El Presidente del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética. La aprobación incluyó los documentos finales descritos en anexo a la presente constancia.

Título del Proyecto : "Evaluación *in vitro*" de la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano"  
Código de inscripción : 60955  
Investigador principal : Eric Hernán Coaguila Llerena

La **APROBACION** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **17 de febrero del 2015**. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 18 de febrero del 2014



Fredy Canchihuamán Rivera, MD MPH PhD

Presidente

Comité Institucional de Ética en Investigación

/fpr

Código SIDISI: 0000060955  
Título Completo del Proyecto: Evaluación "in vitro" de la citotoxicidad de tres cementos de obturación retroapical en fibroblastos de ligamento periodontal humano.  
Nombre del Investigador Principal: Eric Hernán Coaguila Llerena

Si su proyecto implica a más de una Unidad de Gestión imprima varias veces esta hoja

**DECLARACIÓN FINANCIERA Y  
DE CONFLICTOS DE INTERESES**

**1. Potenciales Conflictos de Interés:**

Para cada uno de los investigadores del estudio, indique si existe algún interés económico o financiero en el estudio o en sus resultados

	NOMBRE DEL INVESTIGADOR	CONFLICTO DE INTERÉS		
		SI	NO	NO APLICÁ
1	Eric Hernán Coaguila Llerena		X	
2	Zulema Velásquez Huamán		X	
3	Abraham Vaisberg Wolach		X	

Si la respuesta fue afirmativa, por favor indique el número correspondiente al investigador y describa los detalles al respecto.



### ANEXO 3:

#### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Una ficha para cada placa de 96 pozos en cada día de evaluación (1, 3, y 7 días).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CO	CO	CO	ERR M2	ERR M2	ERR M2	SEB A2	SEB A2	SEB A2	MT A2	MT A2	MT A2
A	1:1											
B	1:2											
C	1:4											
D	1:8											
	ERR M7	ERR M7	ERR M7	SEB A7	SEB A7	SEB A7	MT A7	MT A7	MT A7			
E	1:1										Blan co	Blan co
F	1:2										Blan co ERR M2	Blan co ERR M7
G	1:4										Blan co SEB A2	Blan co SEB A7
H	1:8										Blan co MT A2	Blan co MT A7

CO : Controles 100% de crecimiento de PDLF (Control positivo).

ERRM2 : Cemento de obturación retroapical ERRM de 2 días de fraguado.

SEBA2 : Cemento de obturación retroapical Super EBA de 2 días de fraguado.

MTA2 : Cemento de obturación retroapical MTA de 2 días de fraguado.

ERRM7 : Cemento de obturación retroapical ERRM de 7 días de fraguado.

SEBA7 : Cemento de obturación retroapical Super EBA de 7 días de fraguado.

MTA7 : Cemento de obturación retroapical MTA de 7 días de fraguado.

Blanco : Blanco (Sólo Medio de cultivo) (Control negativo).

Blanco ERRM2 : Blanco de cemento de obturación retroapical ERRM2.

BlancoERRM7 : Blanco de cemento de obturación retroapical ERRM7.

Blanco SEBA2 : Blanco de cemento de obturación retroapical SEBA2.

Blanco SEBA7 : Blanco de cemento de obturación retroapical SEBA7.

Blanco MTA2 : Blanco de cemento de obturación retroapical MTA2.

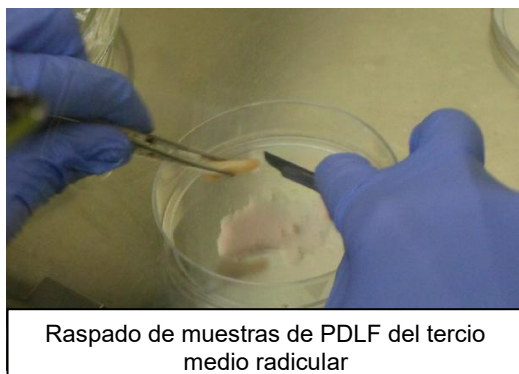
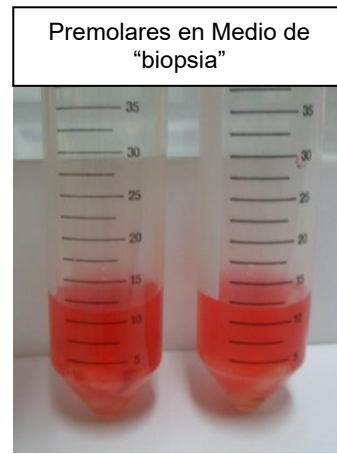
Blanco MTA7 : Blanco de cemento de obturación retroapical MTA7.

### Subgrupos

1:1 - 1:2 - 1:4 - 1:8 : Diluciones de los extractos.

## ANEXO 4:

### OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PDLF



## ANEXO 5:

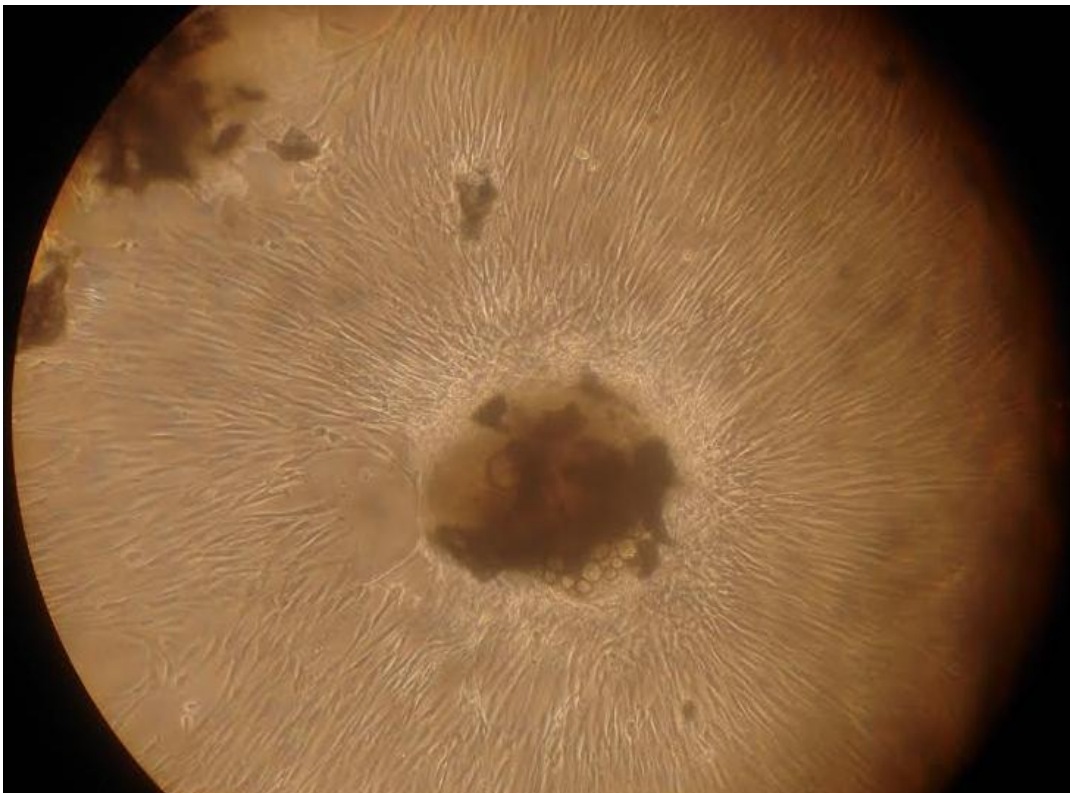
### CULTIVOS PRIMARIOS DE PDLF



Colocación de los explantes en la incubadora con control de humedad Autoflow NU-4850 (Nuair, Plymouth, MN, USA)



Recambios de DMEM hasta obtener la confluencia



Confluencia celular de los explantes de PDLF

## ANEXO 6:

### PREPARACIÓN DE LOS CEMENTOS DE OBTURACIÓN RETROAPICAL



Cemento de obturación retroapical MTA Angelus®



Cemento de obturación retroapical Super FRA®



Cemento de obturación retroapical EndoSequence Root Repair Material®



Moldes de gomas obtenidos de una manguera de 1 cm de diámetro



Mezcla de los cementos de obturación retroapical



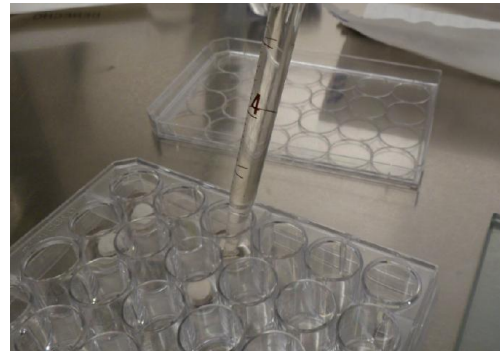
Dispensación en los discos, con atacador y porta-amalgama

## ANEXO 7:

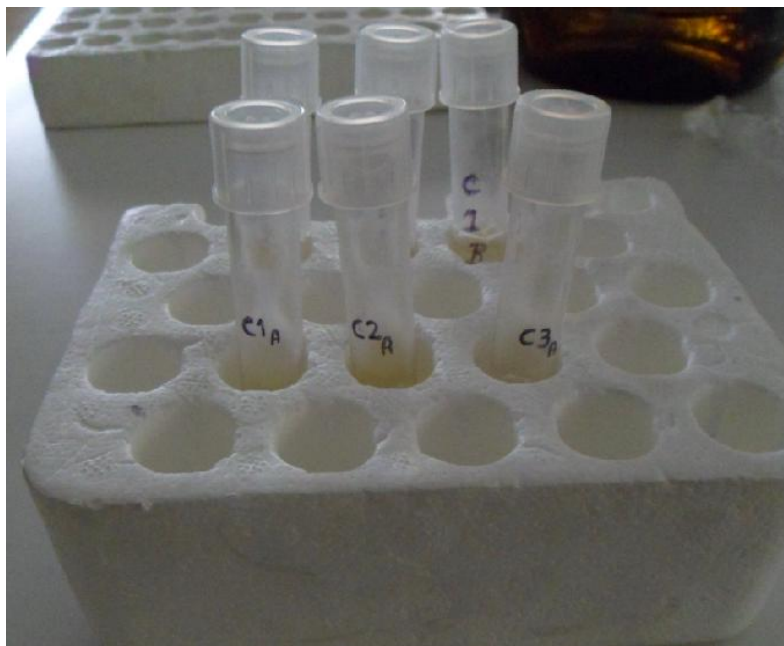
### PROCESAMIENTO DE LOS DISCOS DE LOS CEMENTOS DE OBTURACIÓN RETROAPICAL



Exposición de los discos a rayos ultravioleta



Colocación de 1 ml de DMEM en los discos para obtener los extractos de cada cemento de obturación retroapical



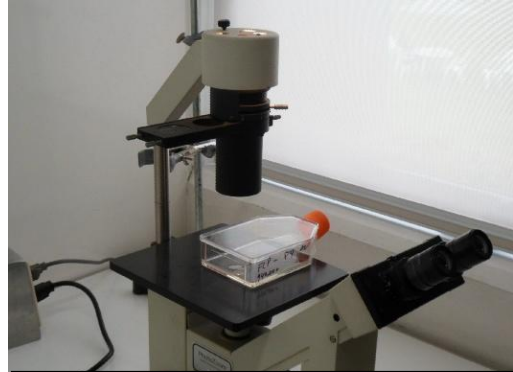
Extractos de los tres cementos de obturación retroapical (MTA, ERRM y SEBA) de 2 y 7 días de fraguado

## ANEXO 8:

### PROCESAMIENTO DE LOS PDLF Y LOS EXTRACTOS DE LOS CEMENTOS DE OBTURACIÓN RETROAPICAL EN LAS PLACAS DE CULTIVO CELULAR



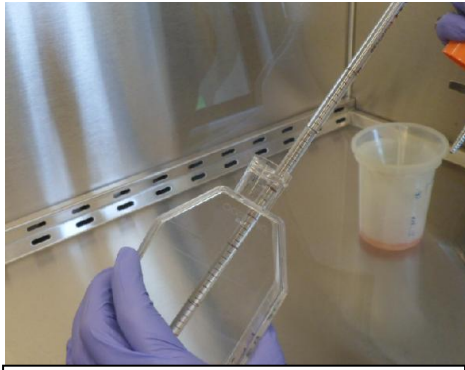
Soluciones previamente colocadas en el Baño María



Observación de los PDLF en el Microscopio invertido PhotoZoom (Cambridge Instruments, Watertown, MA, USA)



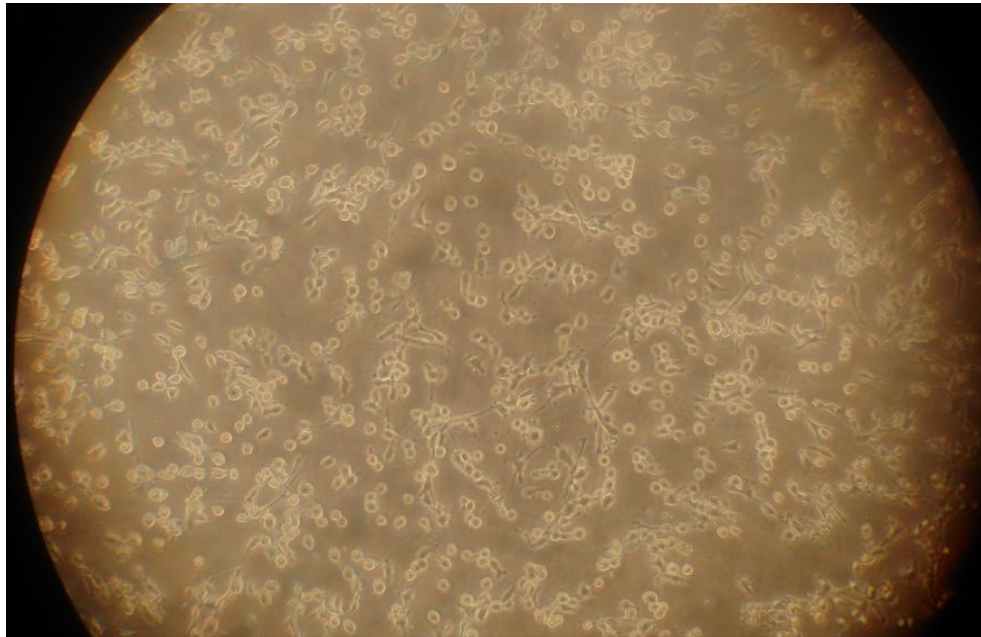
Medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)  
Tripsina + EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)  
FBS (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)



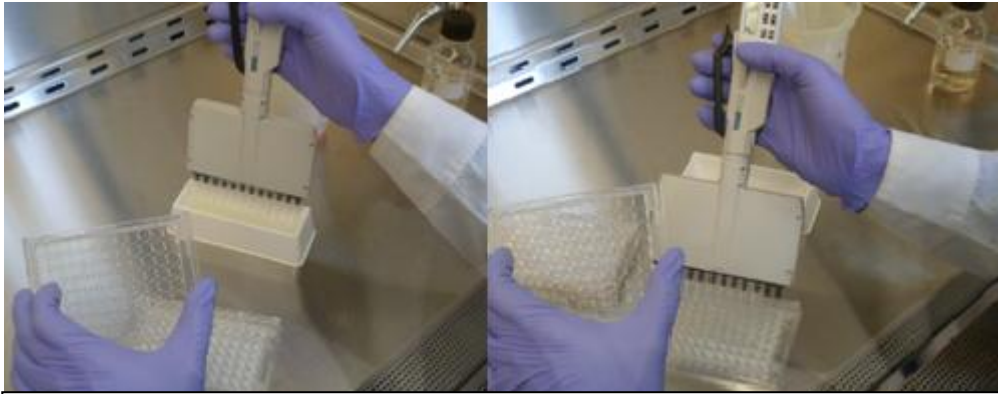
Tripsinización de las muestras



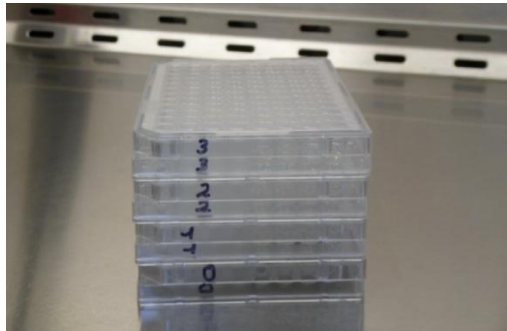
Muestras en DMEM para su posterior colocación en las placas de cultivo celular



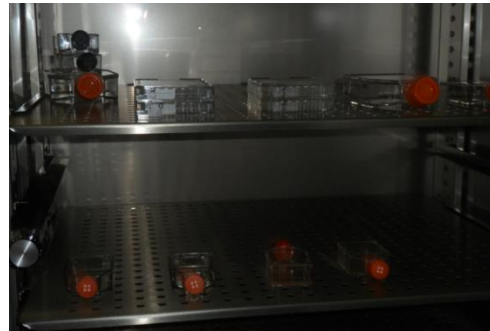
PDLF tripsinizados



Uso del multipipeteador para llevar las muestras de PDLF y los extractos de los cementos de obturación retroapical a las placas de cultivo celular de 96 pozos



Placas de cultivo celular rotuladas



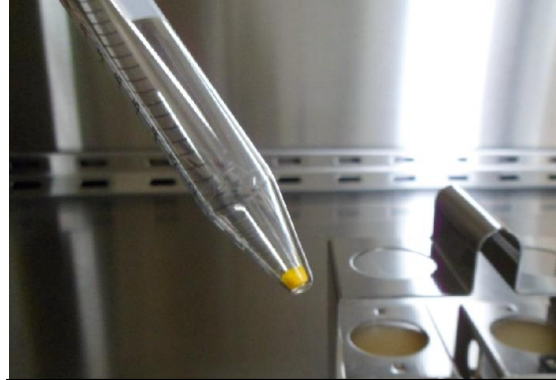
Placas de cultivo en la incubadora por 1, 3 y 7 días de evaluación

## ANEXO 9:

### ENSAYO MTT EN LAS PLACAS DE CULTIVO CELULAR CONTENIDAS DE PDLF Y EXTRACTOS DE LOS CEMENTOS DE OBTURACIÓN RETROAPICAL



Pesaje del MTT



MTT en un tubo de ensayo

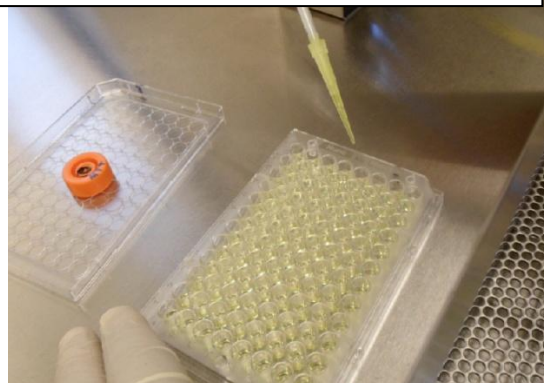
Adición de FBS mediante Jeringas filtro MillexGV de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Cork, Irlanda)



Solución de MTT en el micropipeteador

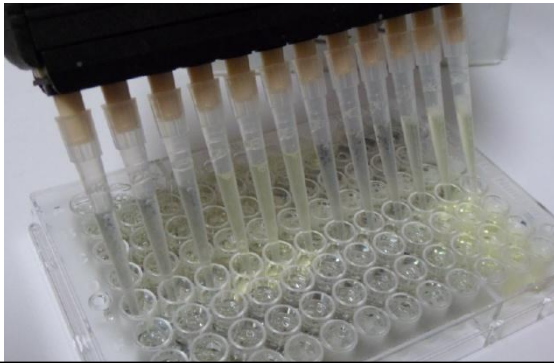


Colocación de MTT en los pozos de cultivo celular, por 4 horas.

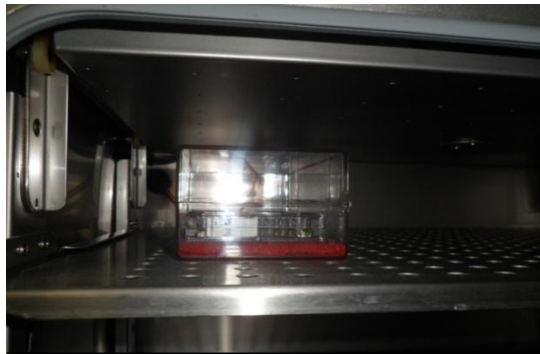


Solución de Agua destilada + HCl + SDS

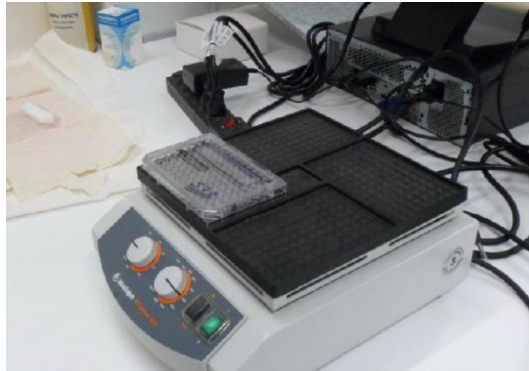




Solución de Agua destilada + HCl + SDS llevada con multipipeteador a las placas de cultivo



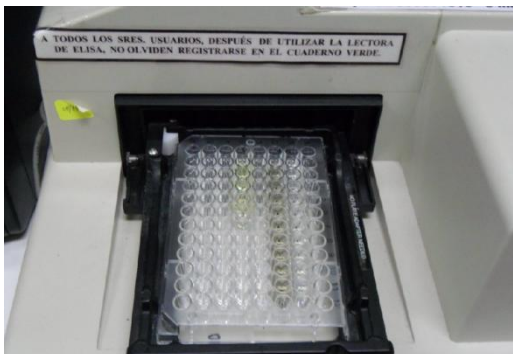
Incubación de las placas de cultivo por 24 horas



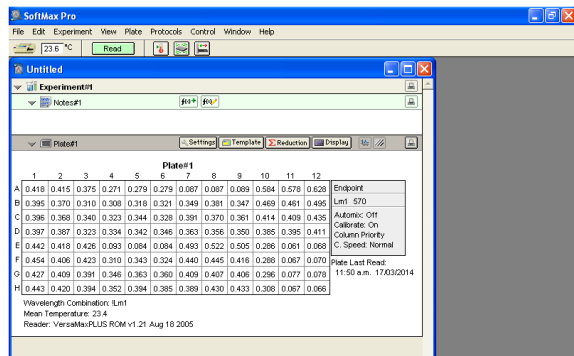
Mezcla de la solución en la plataforma de mezclado Titramax 100 (Heidolph, Schwabach, Alemania)



Lector de placas VersaMax ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)



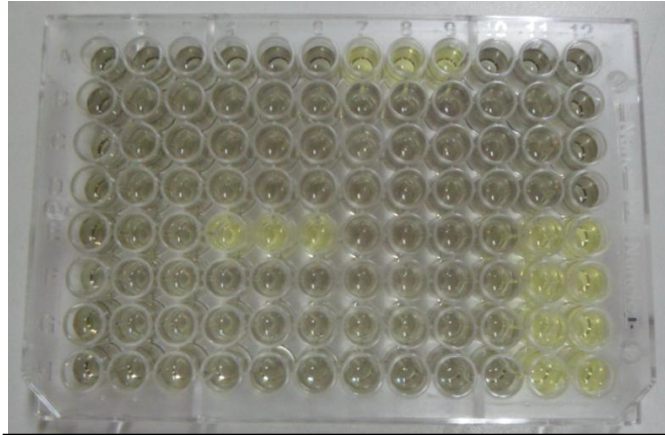
Lectura de las placas de cultivo a 570 nm



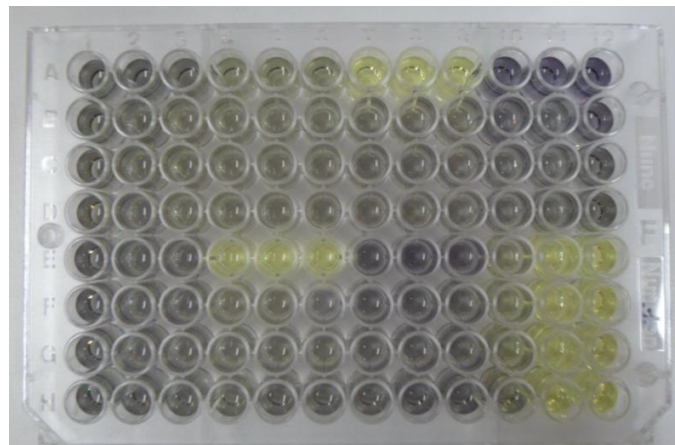
Software SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)

**ANEXO 10:**

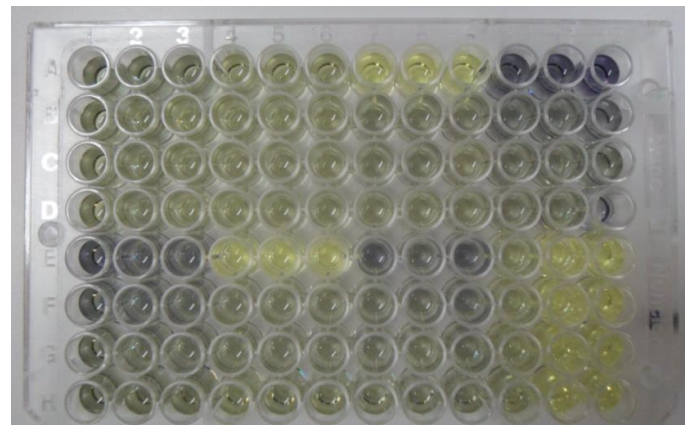
**PLACAS DE CULTIVO CELULAR CONTENIDAS DE PDLF Y EXTRACTOS DE LOS CEMENTOS DE OBTURACIÓN RETROAPICAL EN LOS PERIODOS DE EVALUACIÓN DE 1, 3 Y 7 DÍAS**



1 día de evaluación



3 días de evaluación



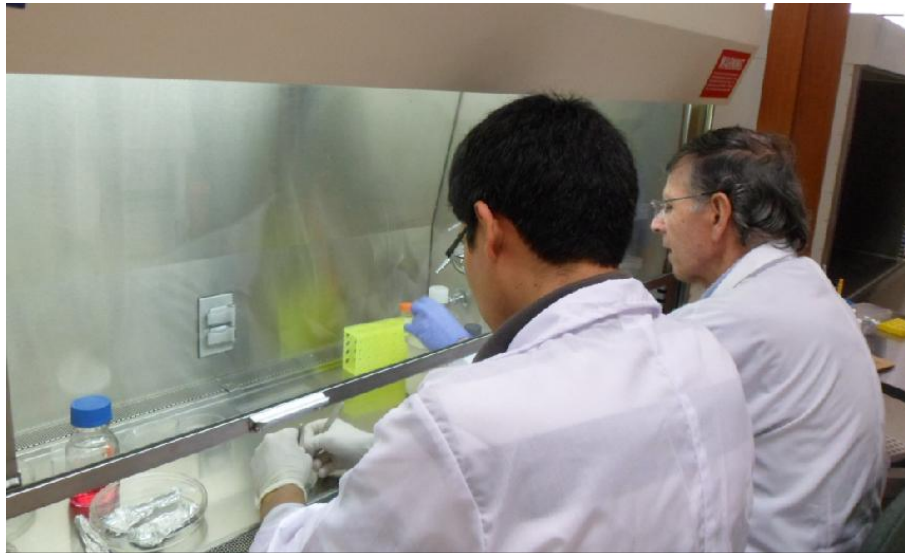
7 días de evaluación

## ANEXO 11:

### AMBIENTES DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



Laboratorios de investigación y desarrollo en ciencia y tecnología Abraham Vaisberg Wolach (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)



Investigadores en el Departamento de Biología celular y Virología