



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA**

**“Evaluación de la bioactividad del cemento de silicato de calcio (Biodentine<sup>®</sup>) y del efecto del grabado dentinario previo a su aplicación”.**

**Constanza Quintana Olivares**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Eduardo Fernández Godoy**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Camila Corral Núñez**

**Prof. Cristian Covarrubias Gallardo**

**Adscrito a PRI ODO 14/011**

**Santiago – Chile**

**2016**

## AGRADECIMIENTOS

*A mi familia, a mis padres por permitirme llegar hasta este momento, sin ellos  
habría sido imposible, por su apoyo, comprensión y cariño,*

*A mi abuelita por sus consejos, alegría y cariño en cada momento,*

*A mi hermano mi partner desde siempre,*

*A Camilo por estar siempre a mi lado con una sonrisa,*

*A mis amigos y amigas que hicieron feliz mi tiempo en la Universidad. Un  
agradecimiento especial a mi querida e incondicional amiga Anita.*

*A mis tutores, Prof. Cristián Covarrubias, Dr. Eduardo Fernández y  
especialmente a la Dra. Camila Corral por haber sido la mejor tutora, dispuesta  
siempre a ayudar, gracias por acompañarme en este proceso.*

*A PRI ODO 14/011 por permitirme participar de su proyecto,*

*A las instalaciones de la Facultad, laboratorio, clínica y oficina de microscopia.*

## ÍNDICE

Introducción	1
Marco Teórico	4
1. Estrategias para reemplazar tejido dentario	4
2. Biodentine	5
2.1 Reacción de fraguado	6
2.2 Propiedades Bioactivas	8
3. Dentina como sustrato de unión	10
Hipótesis y Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
1. Caracterización estructural de Biodentine	14
2. Ensayo de Bioactividad in vitro de Biodentine	16
3. Evaluación ex vivo de Bioactividad de Biodentine	18
Resultados	21
Discusión	31
Conclusiones	37
Referencias Bibliográficas	38
Anexos	43
1. Instrucciones para manipulación de Biodentine	43
2. Consentimiento Informado	44

## RESUMEN

**Introducción:** Biodentine® (BD), es un cemento en base a silicato tricálcico desarrollado como sustituto de dentina coronal y radicular. Se ha visto que cuando BD está en contacto directo con fluidos fisiológicos se depositan fosfatos de calcio en su superficie, pero se desconoce su interacción con dentina con túbulos expuestos. El presente trabajo tiene por finalidad evaluar la bioactividad de BD y el efecto del grabado dentinario en su capacidad de inducir mineralización.

**Materiales y Métodos:** La capacidad de BD para inducir formación de apatita fue evaluada en solución fisiológica simulada (SBF). Discos de BD® fueron inmersos en SBF por 3 y 7 días, y discos sin la presencia de SBF fueron utilizados como control. Se realizó análisis por difracción de rayos x (DRX) y análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para identificar la presencia de hidroxiapatita (HA) en la superficie de las muestras. Se obtuvieron imágenes con microscopía electrónica de barrido (MEB) y se realizó análisis por dispersión de rayos X (EDX) en muestras mantenidas por 7 días en SBF. Vidrio ionómero fue utilizado como material de referencia. Discos de dentina media fueron obtenidos de terceros molares humanos. Se aplicó BD® en discos grabados con ácido ortofosfórico al 37% y en discos no grabados, fueron inmersas en SBF por 10 días y se fracturaron perpendicular a la interfase. La interfase entre cemento y dentina fue examinada usando microscopia electrónica de barrido (MEB). Imágenes representativas de la interfase fueron capturadas a 1000x y 3000x.

**Resultados:** Análisis con DRX y FTIR detectó la presencia de señales de HA en muestras de BD luego de 7 días de inmersión en SBF. MEB-EDX confirmó la presencia mayoritaria de Ca y P en los depósitos de HA. En la interface entre BD y dentina tratada, se observó una banda de dentina estructuralmente alterada y bloqueo de túbulos dentinarios.

## **Conclusiones**

BD es capaz de formar HA cristalina cuando está inmerso en SBF y de generar una capa mineralizada en dentina adyacente a él solo cuando es aplicado sobre una superficie previamente grabada, en un modelo ex vivo.

## INTRODUCCIÓN

Existe actualmente una amplia diversidad de materiales dentales con distintas aplicaciones, lo cual muchas veces dificulta la toma de decisión informada sobre que material sería el de elección a ocupar en un caso específico (Bader M 1996). Frente al nuevo marco de la Odontología Conservadora, se presenta la necesidad de materiales dentales que sean capaces no sólo de reemplazar el tejido dentario perdido, sino también que induzcan reparación y regeneración de tejidos, logrando así una unión íntima entre el tejido dentario y el material dental.

En este escenario, se introducen al mercado los silicatos de calcio que han comenzado a ocupar un espacio importante dentro que los distintos materiales utilizados en Odontología Restauradora. Si bien, su uso en Endodoncia es de larga data, demostrando propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, su utilización en procedimientos de operatoria dental ha sido reciente. *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA) fue el primero de estos materiales en desarrollarse y patentarse en 1995 (Septodont). Después, en el año 2011 se fabricó el producto Biodentine<sup>®</sup> (BD, Septodont, Saint Maur des Fosses, France), el que posee mejores propiedades mecánicas y menor tiempo de endurecimiento (Bachoo, Seymour et al. 2013).

BD, es un cemento en base a silicato de calcio que puede ser utilizado como reemplazo de dentina tanto a nivel coronario como radicular (Septodont). Se indica su uso como restauración definitiva de dentina y temporal de esmalte, en tratamientos de recubrimiento pulpar directo e indirecto, pulpotomías, reparación en perforaciones radiculares, obturaciones a retro y apicectomías (Septodont , Bachoo, Seymour et al. 2013). La presentación de este cemento es en forma de polvo contenido en una cápsula y líquido en ampolla. El polvo está constituido por silicato de calcio, carbonato de calcio y dióxido de zirconio, y el líquido de cloruro de calcio, agua y un polímero hidrosoluble (Bachoo, Seymour et al. 2013).

Se ha estudiado la interfase formada entre dentina/BD, observándose una capa de dentina alterada adyacente al material, que se ha denominado “zona de infiltración mineral” (Atmeh, Chong et al. 2012). Se cree que esta se produciría por un proceso de difusión mineral desde el cemento a la dentina, posterior a un efecto de desnaturalización por el fuerte pH alcalino de este tipo de cementos (Atmeh, Chong et al. 2012). Esta capa se ha reportado de un grosor de  $6,5 \pm 0,6$   $\mu\text{m}$  (Atmeh, Chong et al. 2012), rica en silicio y calcio (Bachoo, Seymour et al. 2013). Además, se ha evidenciado la formación de prolongaciones minerales intratubulares, compuestos frecuentemente por Ca, P y Si, sugiriendo precipitación intratubular (Han and Okiji 2013).

Una de las propiedades relevantes de este material es su bioactividad (Septodont), que le permite generar una respuesta biológica específica en la interfase del material, formando una unión entre el tejido y el material de restauración (Cao and Hench 1996). Los silicatos de calcio son capaces de tener propiedades bioactivas al estar en contacto con fluidos fisiológicos (MTA, BD). Se ha observado que cuando BD está en contacto con fluidos fisiológicos, se deposita una capa de fosfatos de calcio y apatita en la superficie, favorecido por el ambiente alcalino generado por el cemento (Gandolfi, Taddei et al. 2011). De esta manera, se espera que estos depósitos minerales puedan contribuir a reducir la filtración ocupando los espacios entre material/dentina, al estar expuestos a fluido dentinario en los túbulos (Han and Okiji 2013). Dicha cualidad hace suponer que un material que desarrolle este tipo de respuesta generará una unión más íntima en la interfase diente/restauración.

Si bien se ha observado que cuando BD está en contacto directo con fluidos fisiológicos se depositan fosfatos de calcio en su superficie, se desconoce su comportamiento al contacto directo con dentina con túbulos expuestos o bloqueados por la capa de barro dentinario. El barro dentinario se genera al realizar remoción mecánica con instrumental rotatorio de tejido dentinario y está compuesto de dentina, remanentes de procesos odontoblásticos, tejido pulpar y

bacterias (Violich and Chandler 2010), generando un bloqueo de la entrada de los túbulos dentinarios.

Distintos ácidos se han utilizado para remover o modificar la capa de barro dentinario, previo al uso de otros materiales. El uso de ácido ortofosfórico se ha ocupado para acondicionar dentina antes del uso de resinas compuestas, permitiendo remover la capa de barro dentinario generada al realizar una cavidad de manera predicable. La remoción del barro dentinario mediante acondicionamiento de dentina, permite exponer la entrada de los túbulos dentinario con el fluido dentinario (Pashley and Carvalho 1997, Oliveira, Pugach et al. 2003), lo cual podría tener un efecto en la interacción de BD con dentina.

En el caso de tratamientos de recubrimiento pulpar directo e indirecto, en los que se podría utilizar BD, no existe claridad sobre si sería recomendable o no remover esta capa antes de su aplicación. Aunque el fabricante recomienda la aplicación directa del producto sin necesidad de acondicionamiento previo de la dentina (Septodont), no hay estudios específicos que evalúen el efecto de la presencia del barro dentinario en la respuesta bioactiva del producto. Es por ello que el presente trabajo tiene por finalidad evaluar la interfase entre dentina y BD generadas con y sin remoción de la capa de barro dentinario, previo a la aplicación del material sobre dentina.



## MARCO TEÓRICO

### 1. Estrategias para reemplazar tejido dentario

Dentro de la investigación en materiales dentales, por años se ha estado en búsqueda de un sustituto de dentina que reemplace este tejido cuando ha sido dañado, siendo la forma de unión un elemento crítico para lograr un correcto sellado marginal y un adecuado comportamiento clínico.

Entre los materiales y estrategias utilizadas hoy en odontología se encuentran los sistemas adhesivos donde la unión con la superficie dental es a través de micro retenciones. Para esto, se aplica ácido ortofosfórico en la superficie dentaria, produciendo en dentina la exposición de una red microporosa de colágeno (Van Meerbeek, De Munck et al. 2003) donde posteriormente, el adhesivo penetra en los túbulos dentinarios expuestos formando tags de resina (Ferrari and Davidson 1996) los cuales generan una zona denominada capa híbrida entre el material y la restauración (Nakabayashi, Nakamura et al. 1991). A pesar de las ventajas que posee este sistema adhesivo, las resinas contienen moléculas hidrofóbicas que son sensibles a la humedad y a la contaminación por fluidos orales durante el procedimiento de restauración, lo que puede comprometer la adhesión a la estructura dentinaria (Silverstone, Hicks et al. 1985), provocando un fracaso en el sellado marginal.

Otro material utilizado ampliamente, es el cemento de vidrio ionómero, que se usa para reemplazar tejido dentinario, como base cavitaria y en restauraciones temporales y permanentes (Croll and Nicholson 2002). Se ha visto que estos cementos liberan iones fluoruro de forma sostenida en la interfase diente/restauración lo que ayuda a prevenir la microfiltración y por ende las caries secundarias (Brook and Hatton 1998). Por otro lado, tiene deficiencias como su escasa capacidad de pulido, alta porosidad y baja resistencia mecánica, limitando su uso a sectores con bajo requerimiento mecánico. Además, su sensibilidad a ambientes húmedos, hace esencial el control de humedad y de contaminación con saliva durante su aplicación para evitar microfiltración (Peng, Stark et al. 2011). Se

ha visto que cuando vidrio ionómero está en contacto con dentina, existe permeabilidad en la interfase, pudiéndose absorber humedad del medio ambiente (Yiu, Tay et al. 2004).

Tiempo después, se introducen al mercado los cementos en base a silicato de calcio. El primer material de este tipo fue el *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA) que apunta su uso como relleno endodóntico principalmente, por sus propiedades bioactivas y biocompatibilidad (Han and Okiji 2013). En un intento para mejorar las limitaciones de MTA, como sus bajas propiedades mecánicas, largo tiempo de fraguado, dificultad en su manipulación y decoloración, se han desarrollado nuevos cementos en base a silicatos de calcio.

## **2. Biodentine ®**

BD es un cemento en base a silicato de calcio, desarrollado como un sustituto bioactivo de dentina (Septodont 2012), de naturaleza inorgánica no metálica. Su presentación comercial es en forma de cápsula que contiene el polvo y un líquido en una ampolla. El polvo contiene silicato tricálcico, carbonato de calcio y dióxido de zirconio y el líquido combina cloruro de calcio, agua y un agente reductor de agua. Las propiedades de los compuestos constituyentes se muestran en la **tabla 1**.

El fabricante ha propuesto que la disminución del tiempo de fraguado (12 minutos), comparada con otros silicatos de calcio tradicionales, como MTA que es cercano a 70 minutos (Asgary, Shahabi et al. 2008), se debe al menor tamaño de las partículas de polvo, lo que permitiría una mayor área de reacción (Septodont 2014). Además, el cloruro de calcio adicionado al líquido, ha probado ser un potente acelerador de la reacción en estos materiales (Kogan, He et al. 2006). El fabricante también declara que las mejores propiedades mecánicas se deben a la falta de impurezas, junto a la adición de carbonato de calcio al polvo que le confieren la densidad óptima del polvo (Septodont 2014). El polímero hidrosoluble probablemente juega un rol importante en lograr una mejor densidad de polvo, permitiendo una mezcla de fácil manejo con menor cantidad de agua (Septodont

2014). Finalmente, se presume que la adición de óxido de zirconio fue para otorgar radiopacidad (Tanomaru-Filho, Jorge et al. 2007, Camilleri, Kralj et al. 2012), a diferencia de MTA, en el que el agente radiopaco es óxido de bismuto, un compuesto que ha sido considerado por algunos autores como adverso para el material (Camilleri, Montesin et al. 2004).

<b>Polvo</b>	
Silicato Tricálcico (Ca <sub>3</sub> Si)	Componente estructural del material
Silicato Di-Cálcico (Ca <sub>2</sub> Si)	Estructura secundaria del material
Carbonato y Oxido de Calcio	Relleno
Oxido de Zirconio	Radio opacificador
<b>Líquido</b>	
Cloruro de calcio	Acelerador
Polímero Hidrosoluble	Agente reductor de agua

**Tabla 1.** Composición de BD (Bachoo, Seymour et al. 2013)

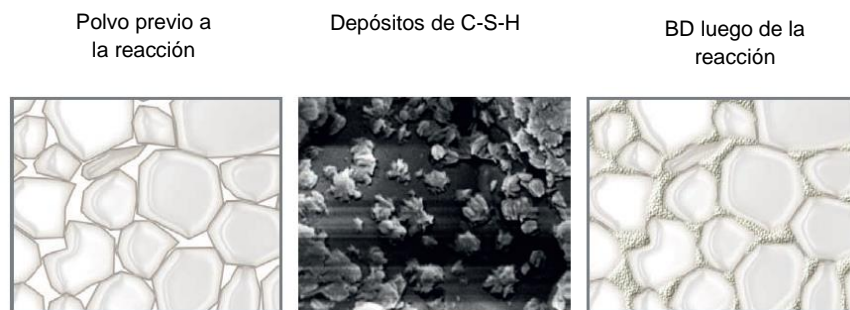
### 2.1 Reacción de fraguado de Biodentine

La reacción de fraguado de este material se inicia al mezclar el polvo con el líquido, lo que genera una serie de reacciones, dentro de las cuales el silicato tricálcico se hidrata con agua, permitiendo la formación de un gel de silicato de calcio hidratado (C-S-H) e hidróxido de calcio (3Ca(OH)<sub>2</sub>) (Septodont 2014).

La reacción de hidratación esta resumida en la siguiente fórmula:



El proceso de disolución ocurre en la superficie de cada grano de silicato de calcio. El gel de silicato de calcio hidratado y el exceso de hidróxido de calcio tiende a precipitar en la superficie de las partículas por saturación del medio. Los granos de silicato tricálcico que no han reaccionado se rodean por el gel de silicato de calcio hidratado. La formación del gel de silicato de calcio se debe a la permanente hidratación del silicato tricálcico, que gradualmente ocupa los espacios entre los granos (Septodont 2014), como muestra la **Figura 1**. Los fluidos corporales tienen iones fosfato que interactúan con el silicato de calcio y conducen a la formación de depósitos de apatita que provocan el sellado del material (Butt, Talwar et al. 2014). El proceso de endurecimiento resulta de la formación de cristales que se depositan en una solución sobresaturada.



**Figura 1.** Representación de la reacción de fraguado de BD (Septodont 2014)

La reacción de fraguado inicial dura aproximadamente 12 minutos. Sin embargo, se ha podido observar por espectroscopía de impedancia que la reacción continúa hasta por 14 días. El estudio de Villat et al. sugiere que la reacción completa de hidratación de este silicato es mucho más lenta que la reacción ácido-base de cementos de vidrio ionómero, concluyendo que esta reacción podría continuar por meses, en los cuales continúa el intercambio iónico, disminuyendo la porosidad y aumentando las propiedades mecánicas del material (Villat, Tran et al. 2010).

## 2.2 Propiedades bioactivas

Las propiedades bioactivas de un material dental son indispensables para la reparación de los tejidos. La bioactividad se le atribuye a materiales que tienen la capacidad de formar apatita en su superficie cuando está en contacto con fluidos fisiológicos simulados *in vitro* (Tay, Pashley et al. 2007).

Bioactividad, se ha definido como la capacidad de un material de provocar una respuesta biológica específica en la interfase del material, que resulta en la formación de una unión entre el tejido y el material (Cao and Hench 1996). En relación a tejidos mineralizados, se entiende como la habilidad de un material de unirse a hueso mediante la formación de una apatita en su superficie cuando está en presencia de fluidos fisiológicos (Hench 1988). Se ha observado que cuando BD está en contacto con fluidos fisiológicos, se deposita una capa de fosfatos de calcio y apatita en la superficie. (Gandolfi, Taddei et al. 2011). Al evaluar su interfase con dentina, se ha observado la formación de prolongaciones minerales dentro de los túbulos dentinarios formando una zona de infiltración mineral, lo que ocurriría por su pH alcalino, que produciría un grabado caustico inicial, seguido por infiltración mineral (Camilleri 2013). Además, permite la diferenciación de células pulpares y biomineralización cuando es utilizado como material de recubrimiento pulpar (Laurent, Camps et al. 2012, Zanini, Sautier et al. 2012). También, se ha observado en estudios *in vivo* la formación de puentes dentinarios cuando BD es ocupado en exposiciones pulpares, probando así sus propiedades bioactivas al causar una respuesta biológica provocando la unión del material con el tejido (Nowicka, Lipski et al. 2013).

Algunos estudios han analizado la interfase formada y los cambios químicos que se generan cuando el material está en contacto con dentina tanto radicular como coronaria (Han and Okiji 2011, Atmeh, Chong et al. 2012, Kim, Nosrat et al. 2014). Sin embargo, existen un limitado número de ellos y la metodología presenta gran variabilidad. Dentro de los estudios que evalúan la interacción de BD con dentina radicular se encuentra el de Kim et al. (Kim, Nosrat et al. 2015) . En este estudio se analizaron segmentos de dentina de la porción

radicular de dientes humanos, los que fueron instrumentados, y se removió la capa de barro dentinario (con EDTA e hipoclorito) previo a la aplicación de BD intracanalicular. Al analizar la interfase del material con dentina radicular después de 4 semanas de inmersión en una solución fisiológica simulada, se observó la presencia de una capa distinguible entre el material y la dentina, de alrededor de 4.8  $\mu\text{m}$

Otro estudio en que también se evaluó la interfase entre BD y dentina radicular (esta vez en dientes bovinos) que también involucró la remoción de barro dentinario previo a aplicación de material, se observó también la presencia de una capa en la interfase luego de 90 días de inmersión en una solución fosfatada, la cual se extendía con estructuras tipo-tag dentro de los túbulos dentinarios. Además, al evaluar la composición de dentina adyacente al material se observaron mayores concentraciones de Ca y Si que en dentina sin tratar (Han and Okiji 2011).

Por otra parte, los estudios que analizan la interacción de BD con dentina coronaria, situación que se genera en tratamientos de recubrimiento pulpar directo, indirecto y en su uso como base cavitaria, son particularmente escasos y existe poca claridad de si se ha realizado un tratamiento previo o no a la aplicación del producto. En un estudio realizado por Atmeh et al., se analizó la interfase dentina/BD y dentina/vidrio ionómero, en el cual se observaron discos de dentina con ambos materiales al MEB. Sin embargo, en la metodología no se menciona si se hizo o no acondicionamiento de dentina previo a la aplicación del material. Las muestras se mantuvieron inmersas en agua destilada por 4 días y se analizaron los resultados. Se observó la formación de estructuras tipo tags penetrando los túbulos dentinarios. Además de la aparición de una zona de infiltración mineral adyacente a la interfase (de 10 a 20  $\mu\text{m}$ ) y de una banda de dentina alterada estructuralmente bajo la interfase observada en las muestras con BD y no así en las con vidrio ionómero (Atmeh, Chong et al. 2012).

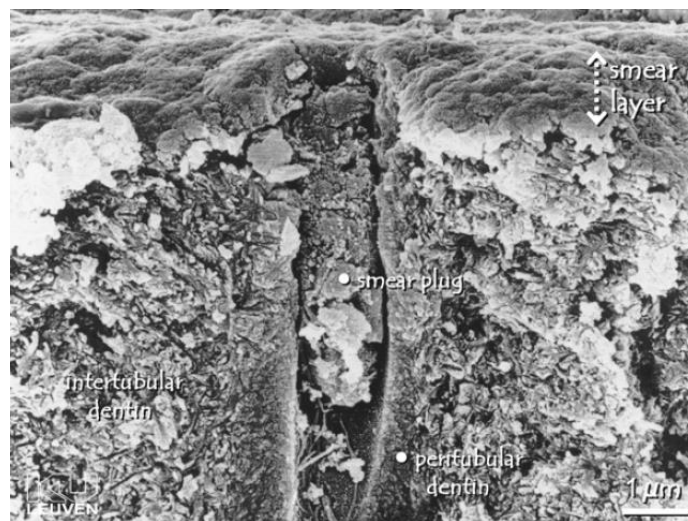
### **3. Dentina como sustrato de unión**

La estructura de la dentina se compone de una matriz orgánica que representa aproximadamente un 30 a 40 % de su volumen, un 20% de agua y el resto de una fracción mineral compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio amorfo (Abramovich 1999). Histológicamente, sus unidades estructurales básicas son los túbulos dentinarios y la matriz dentinaria o intertubular. La dentina es un tejido poroso densamente perforado por estructuras tubulares que alojan las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos situados en la periferia de la cámara pulpar, los túbulos dentinarios. Por esto, la dentina debe considerarse como parte de un complejo pulpodentinario (Yoshida, Yoshida et al. 2002, Zaslansky, Zabler et al. 2010).

Entre la prolongación odontoblástica y la pared del túbulo dentinario, se encuentra el espacio periprocesal. En su interior existen haces de fibras colágenas dispuestas tangencialmente al proceso odontoblástico. Algunos investigadores sugieren que en este espacio se alojan además las terminaciones nerviosas y la linfa dentinaria, las cuales se continúan con el tejido conectivo pulpar. Este fluido le confiere la humedad propia de la dentina y además participa en los procesos de transmisión del impulso nervioso, cuya dirección y sentido del flujo depende de la naturaleza del estímulo (Pashley, Matthews et al. 1996, Hashimoto, Ito et al. 2004).

La estructura tubular y la presencia de fluido dentinario hacen de la dentina un sustrato permeable (Pashley and Carvalho 1997), en donde el flujo transdental influye fisicoquímicamente sobre los sistemas grabantes y adhesivos, y también en el constante dinamismo dado por los fenómenos multidireccionales del fluido dentinario, pudiendo afectar biológicamente la interfase entre diente y material de restauración, provocando sensibilidad postoperatoria y fracasos en el sellado marginal.

Cuando se realizan cortes de la estructura dentaria con elementos rotatorios u otro instrumento, los componentes residuales forman una capa que se adosa íntimamente a la superficie, el barro dentinario, que además va a ocluir la entrada de los túbulos dentinarios, reduciendo la permeabilidad dentinaria (Perdigao 2007), como se muestra en la **Figura 2**. El barro dentinario es poroso y permeable por la presencia de canales submicrométricos que permiten el paso de fluido dentinario a través de él. Su composición básica consta de hidroxiapatita, fragmentos de colágeno amorfo alterado y por colágeno desnaturalizado en forma coloidal, además de procesos odontoblásticos, tejido pulpar y bacterias (Violich and Chandler 2010). Su grosor, rugosidad, densidad y grado de unión depende en gran medida del tipo de instrumento utilizado, así como la profundidad y ubicación en la dentina (Breschi, Perdigao et al. 2003).



**Figura 2.** Corte correspondiente a barro dentinario (smear layer) bloqueando la entrada del túbulo dentinario con prolongaciones intratubulares (smear plug) (Eliades G 2005)

Como el barro dentinario constituye una barrera física, este debiera ser removido y una estrategia para lograrlo involucra grabado ácido de la superficie y su posterior lavado. Así, se desmineraliza la matriz intertubular a una profundidad de hasta 2 a 7  $\mu\text{m}$ , descubriendo la trama colágena fibrilar, aumentando la permeabilidad intertubular (Pashley and Carvalho 1997, Oliveira, Pugach et al. 2003).



La remoción del barro dentinario mediante acondicionamiento de dentina, permite exponer la entrada de los túbulos dentinario con el fluido dentinario (Pashley and Carvalho 1997, Oliveira, Pugach et al. 2003), lo cual podría tener un efecto en la interacción de BD con dentina. Aunque el fabricante recomienda la aplicación directa del producto sin necesidad de acondicionamiento previo de dentina (Septodont), no hay estudios específicos que evalúen el efecto de la presencia del barro dentinario en la respuesta bioactiva del producto. Es por ello que el presente trabajo tiene por finalidad evaluar la bioactividad de BD y el efecto del grabado dentinario en su capacidad de inducir mineralización en un modelo *in vitro* y *ex vivo*, respectivamente.

## **HIPÓTESIS**

BD posee la capacidad para inducir la formación de hidroxapatita *in vitro* y es capaz de inducir la mineralización de dentina solo cuando esta ha sido grabada.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la bioactividad de BD y el efecto del grabado dentinario en su capacidad de inducir mineralización en modelo *in vitro* y *ex vivo*, respectivamente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

OE 1: Caracterizar estructuralmente el cemento BD y evaluar su capacidad de formación de apatita *in vitro*.

OE 2: Evaluar el efecto del grabado en la bioactividad de BD, utilizando un modelo *ex vivo*.

## **METODOLOGÍA**

### **1. Caracterización estructural del material Biodentine (Figura 3).**

La caracterización de la estructura de BD se evaluó con difracción de rayos X (DRX), Espectroscopía Infrarroja (FTIR) y Microscopía electrónica de barrido (MEB). Se procedió a confeccionar discos de 7 mm de diámetro por 2.5 mm para su posterior análisis. Para la preparación de BD® se siguieron las indicaciones establecidas por el fabricante (Anexo 1), Vidrio ionómero, GC Fuji IX Capsule (VI; GC Corporation, Tokyo, Japan) se utilizó como material de referencia. Se mantuvieron las muestras en estufa a 37 °C a 100% de humedad por 24 horas para que los materiales endurecieran completamente.

#### **1.1 Análisis por difracción de rayos X (DRX)**

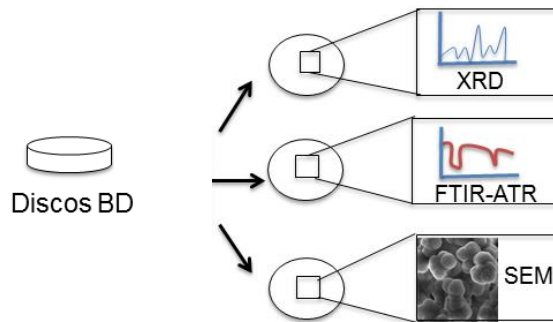
La caracterización de la estructura de BD y VI se evaluó mediante difracción de rayos – X (XRD) para reconocer la estructura cristalina de los materiales. Las muestras se analizaron en un Difractómetro D 5000 X-Ray (Siemens, Karlsruhe, Germany) usando radiación  $\text{CuK}\alpha$  dentro de un rango  $2\theta$  de 5 - 40 °.

#### **1.2 Análisis por Espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)**

Se utilizó Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada, para identificar la estructura interna de BD y VI, a través de la energía vibracional de los grupos funcionales que lo componen. La caracterización de las muestras se realizó con FTIR-ATR Cary 630 Agilent Technologies FTIR-ATR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se consideró un rango de longitud onda de  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 1.3 Análisis con Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental

Se caracterizaron las muestras de BD y VI con Microscopía Electrónica de barrido (MEB), para el estudio de la superficie del material. Se ubicaron los discos de BD en la superficie del portamuestras de aluminio con la ayuda de una cinta conductora adhesiva de carbono. Las muestras fueron metalizadas con Sputter Coater SCG 050 y visualizadas en microscopio electrónico de barrido Jeol JSM IT300LV, equipado con Espectroscopía de dispersión de Rayos x (EDX) PentaFET Precision, Oxford Instruments con software Aztec, para el análisis elemental de las muestras. Se obtuvieron imágenes representativas a 500x y 2000x.



**Figura 3:** Caracterización estructural de BD

## 2. Ensayo de bioactividad in vitro de Biodentine (Figura 4)

La identificación de los depósitos de hidroxiapatita fueron analizados con DRX, FTIR-ATR y MEB. Para esto, se prepararon discos de BD y VI de 7 mm de diámetro y 2,5 mm, aplicando el material en moldes de silicona de las dimensiones indicadas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron mantenidas en contenedores individuales con 50 mL de solución fisiológica simulada (SBF). La solución de SBF se preparó 24 hr antes de ser utilizada, de acuerdo a la siguiente composición:

Tabla 2: Cantidades de reactivos a utilizar en la preparación de SBF.

Reactivo	SBF para 1 L
Agua destilada	750 mL
NaCl	7,996 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
KCL	0,224 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,179 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,305 g
HCL 1 M	40 mL
CaCl <sub>2</sub>	0,278 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> (Buffer Tris)	6,057 G
HCL para ajustar a pH 7,4	_____

Las muestras se incubaron por 3 y 7 días en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante.

### 2.1 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

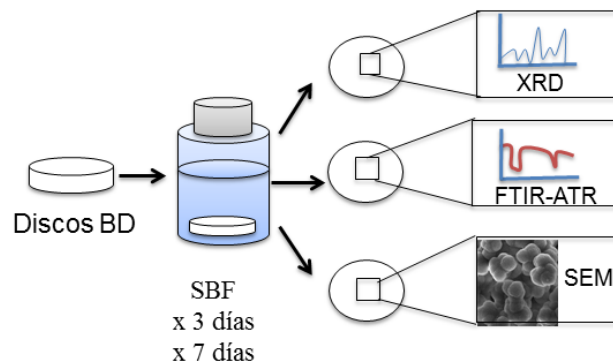
La identificación de los depósitos de hidroxiapatita que se formaron luego de su inmersión en SBF fueron analizados con DRX, según las especificaciones nombradas anteriormente.

### 2.2 Análisis por Espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)

Los depósitos de hidroxiapatita formados en SBF se caracterizaron con FTIR-ATR, con las especificaciones antes mencionadas.

### 2.3 Análisis con Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental

Los discos inmersos en SBF por 7 días se deshidrataron y ubicaron en la superficie de portamuestras de aluminio con la ayuda de una cinta conductora adhesiva de carbono. Las muestras fueron metalizadas con Sputter Coater SCG 050 y visualizadas en microscopio electrónico de barrido Jeol JSM IT300LV equipado con EDX. Se obtuvieron imágenes representativas a 500x y 2000x y el análisis elemental EDX fue realizado en áreas representativas visualizadas a 2000x en las muestras incubadas por 7 días en SBF.



**Figura 4:** Ensayo Bioactividad *In vitro* de BD

### **3. Evaluación ex vivo de bioactividad de Biodentine (Figura 5).**

Se recolectaron terceros molares y se seleccionaron según los siguientes criterios de inclusión: dientes libres de caries, restauraciones y fracturas con indicación de exodoncia. Se solicitó la autorización por parte del paciente mediante un consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2).

Se procedió a limpiar los molares manualmente con curetas (Gracey N°11-12, 13-14 American Eagle USA), para la remoción de restos de tejido periodontal y a desinfectarlos en solución de timol al 0,1% durante 24 hrs. Posterior a ello, se almacenaron en suero fisiológico.

Las raíces de los molares se incluyeron en bloques de acrílico de autocurado. Para esto, se confeccionaron matrices de silicona de 1.5 x 1.5 x 1 cm de profundidad. Se procedió a aislar las matrices con vaselina líquida y rellenar con acrílico autocurable marca Marché. Se ubicaron los molares al interior del molde con acrílico de manera que quedaran con la raíz incluida en acrílico y la corona visible. Luego de terminada la polimerización del material, se retiraron y se conservaron en suero fisiológico.

Para obtener discos de dentina media de 2 mm de grosor, se utilizó la cortadora Isomet Buehler (Ler Lake Bluff, IL, USA). Los cortes fueron realizados paralelos a la cara oclusal y bajo refrigeración constante con agua corriente. Para la estandarización de barro dentinario se utilizó lija de 600 gránulos por cm<sup>2</sup>, sobre una superficie plana, bajo agua circulando por 60 segundos.

Se obtuvieron discos de dentina de 2 mm de grosor, los cuales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de estudio:

- Grupo BD grabado: Se grabó la superficie seleccionada con ácido ortofosfórico al 37% por 20 segundos y se aplicó BD según las instrucciones del fabricante.
- Grupo BD sin grabado: Se aplicó BD según las indicaciones del fabricante en superficies sin acondicionamiento previo.

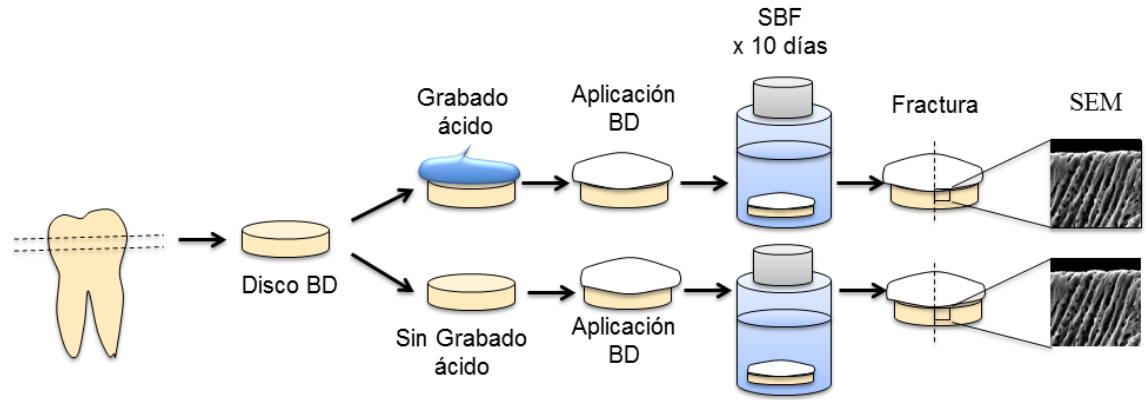
La superficie grabada, se lavó con agua destilada por el doble del tiempo y fue secada con aire de jeringa triple a distancia de manera de obtener una superficie húmeda, no reseca.

Se preparó BD según las indicaciones del fabricante y se procedió a aplicar el material en los discos de manera uniforme con una espátula proporcionada por el fabricante, esperando el tiempo de endurecimiento.

Las muestras se mantuvieron en contenedores individuales plásticos (botellas de 50 ml) con solución fisiológica simulada (SBF). Esta solución fue preparada 24 hrs antes de su utilización. Las muestras se incubaron por 7 días en un baño termostático a 37°C con agitación constante. Luego de cumplidos los tiempos de incubación se retiraron los discos. Estos se fracturaron perpendicular a la interfase dentina-BD.

Las muestras fueron desecadas a 100°C por 24 horas. Posteriormente, se ubicaron en la superficie de portamuestras de aluminio con la ayuda de una cinta conductora adhesiva de carbono. Las muestras fueron metalizadas con Sputter Coater SCG 050 y visualizadas en microscopio electrónico de barrido Top-Con SM 300. Se obtuvieron imágenes representativas de la interfase dentina-BD, con aumentos de 1000x y 3000x.



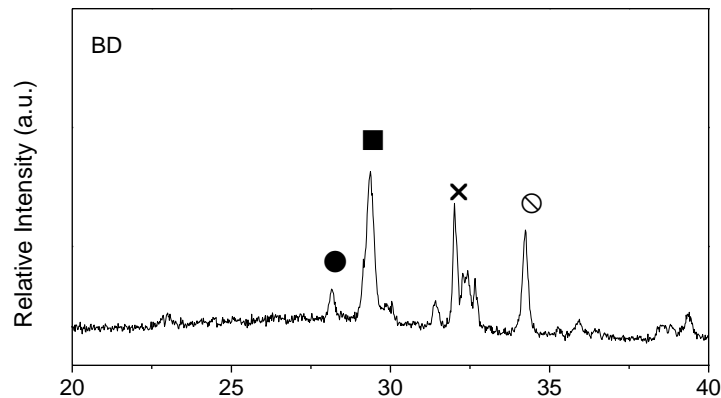


**Figura 5:** Ensayo Bioactividad *Ex vivo* de BD

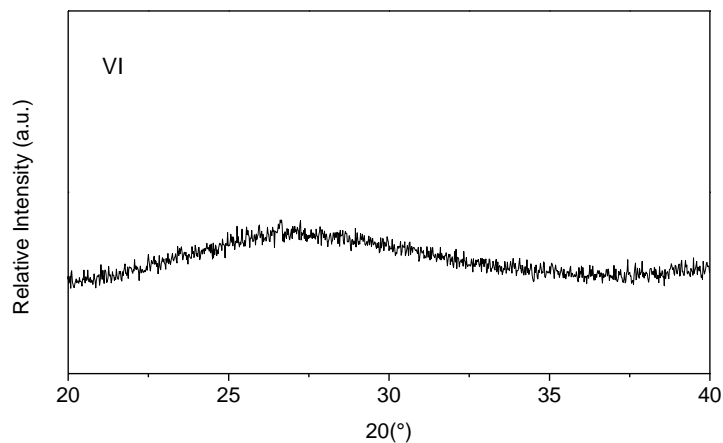
## RESULTADOS

### 1. Caracterización estructural del material Biodentine.

Los patrones DRX de BD se muestran en el **Gráfico 1**, mostrando numerosas señales indicando una estructura cristalina. BD en el difractómetro mostró señales para silicato tricálcico, carbonato de calcio, óxido de zirconio e hidróxido de calcio. XRD difractograma de VI no presentó patrones definidos de acuerdo a la estructura amorfa del material (**Gráfico 2**).

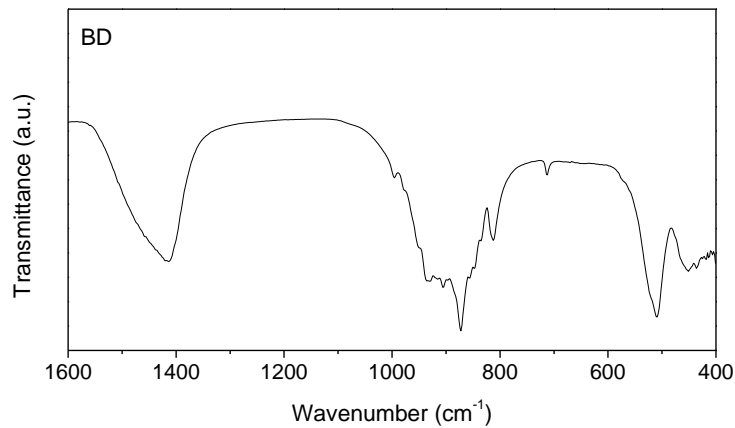


**Gráfico 1.** Análisis por Difracción de Rayos X de BD (BD t0), mostrando las principales fases presentes (●  $ZrO_2$ , Baddeleyite, ■ Calcite,  $CaCO_3$ ; ⊗ Calcium Silicate  $Ca_3SiO_5$ ; ⊘ Portlandite,  $Ca(OH)_2$ )

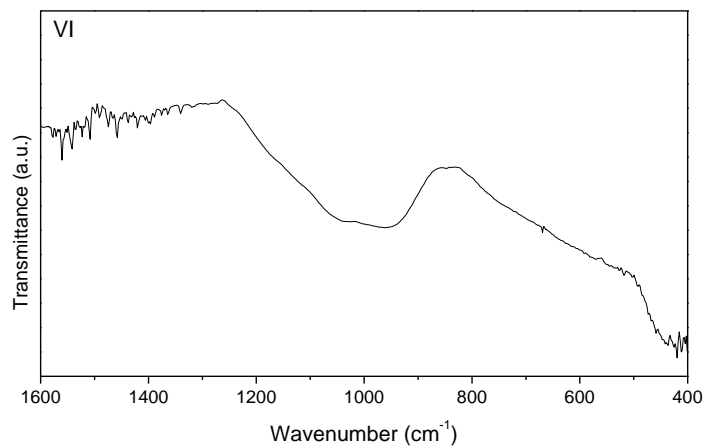


**Gráfico 2.** Análisis por Difracción de Rayos X de VI (VI t0)

Los espectros de FTIR-ATR de BD (BD t0) en la región 1600-400  $\text{cm}^{-1}$  se muestra en el **Gráfico 3**. El espectro presentó bandas agudas ubicadas en 1418, 931, 871, 712 y 505  $\text{cm}^{-1}$  atribuible a la vibración interna de la estructura de silicato y de carbonato de calcio de BD (Camilleri 2013). El espectro FTIR-ATR para VI exhibió una amplia banda visible en la región de 1000  $\text{cm}^{-1}$  causada por los puentes Si-O-Si y a los grupos terminales Si-O (Camilleri 2013) (**Gráfico 4**).

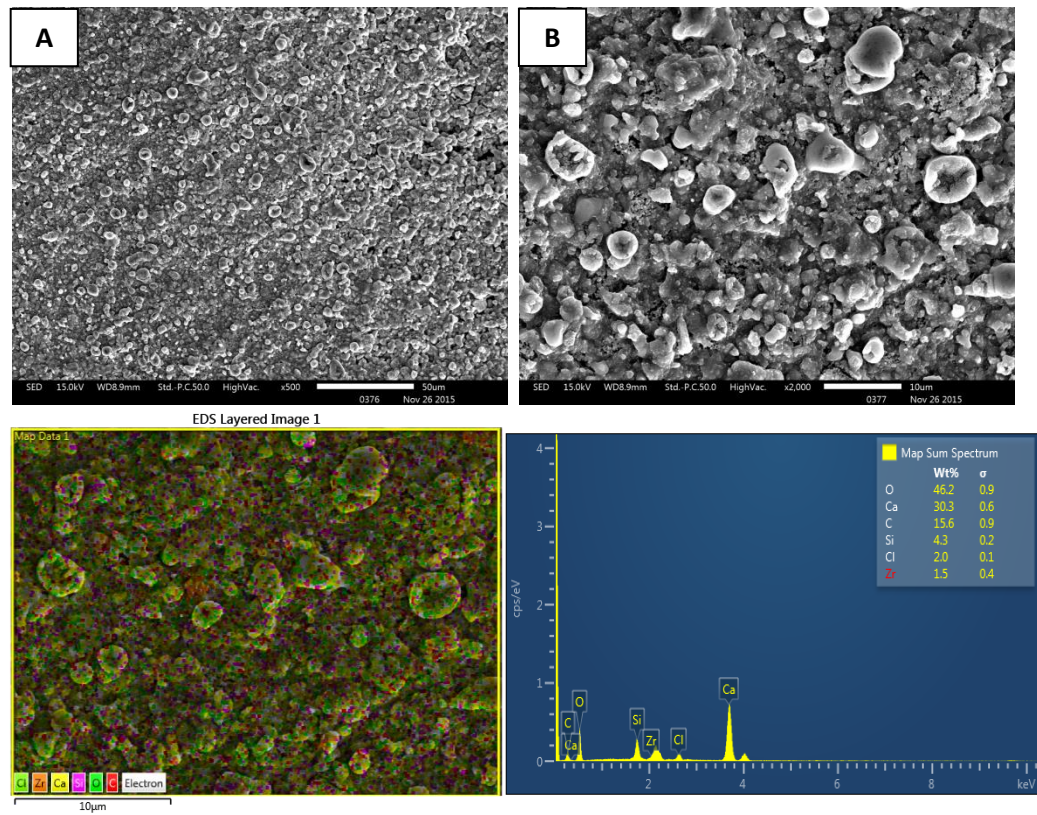


**Gráfico 3.** Espectros FTIR-ATR de BD (BD t0)



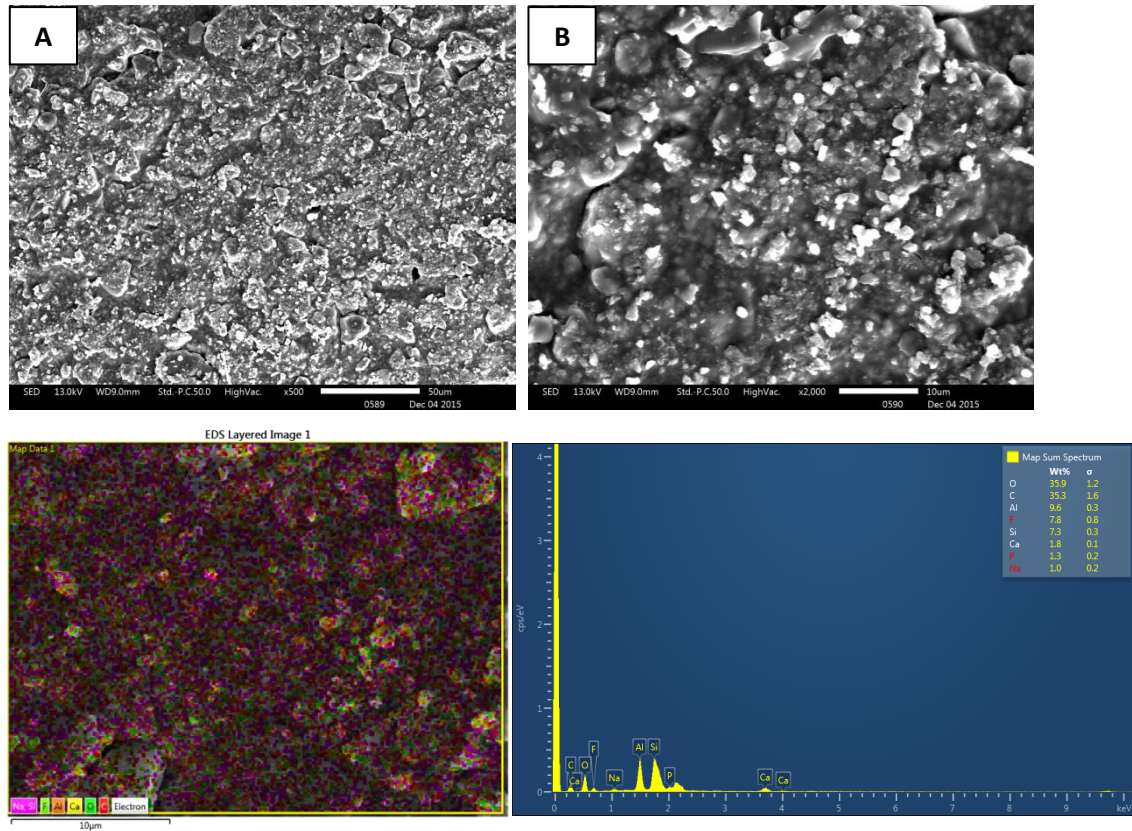
**Gráfico 4.** Espectros FTIR-ATR de VI (VI t0)

El análisis MEB de BD muestra una superficie homogénea en la que sobresalen estructuras de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de morfología globular, las cuales se observan unidas al cemento. En el análisis elemental EDX, se determinó que calcio, sílice y oxígeno son los principales componentes de la estructura estudiada y que, zirconio, cloro y carbono se encuentran en menor cantidad (**Figura 6**).



**Figura 6.** Imágenes representativas obtenidas con análisis MEB de BD sin presencia de SBF a 500x (A), 2000 x (B), con Análisis elemental EDX.

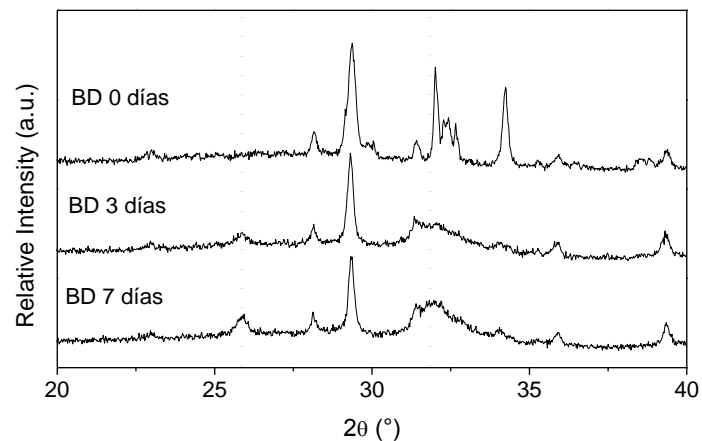
El análisis MEB de VI mostró una superficie homogénea, con partículas dispuestas en forma irregular, de forma variable de un tamaño aproximado de 2  $\mu\text{m}$ . El análisis elemental EDX identificó la presencia de sílice, aluminio y oxígeno en mayor cantidad, seguido de flúor, fósforo y sodio (**Figura 7**).



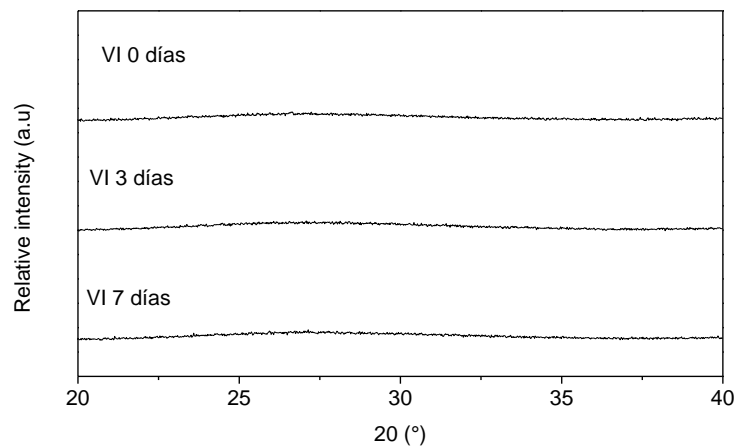
**Figura 7.** Imágenes representativas obtenidas con análisis MEB de VI como muestras de control a 500x (A), 2000 x (B) con análisis elemental EDX.

## 2. Bioactividad in vitro de Biodentine

Patrones DRX de BD inmerso en SBF por 3 y 7 días se muestran en el **Gráfico 5**. Luego de 3 y 7 días de inmersión en SBF, se observó una reducción en la intensidad de las señales en las muestras. Sin embargo, luego de 7 días de inmersión en SBF, patrones DRX presentaron una de las señales características para apatita a  $25,90^\circ$  correspondiente al plano 002 del cristal de apatita, lo cual no se observó en las muestras sin la presencia de SBF. En los patrones DRX para VI, no se observan señales, indicando ausencia de fase cristalina (**Gráfico 6**).

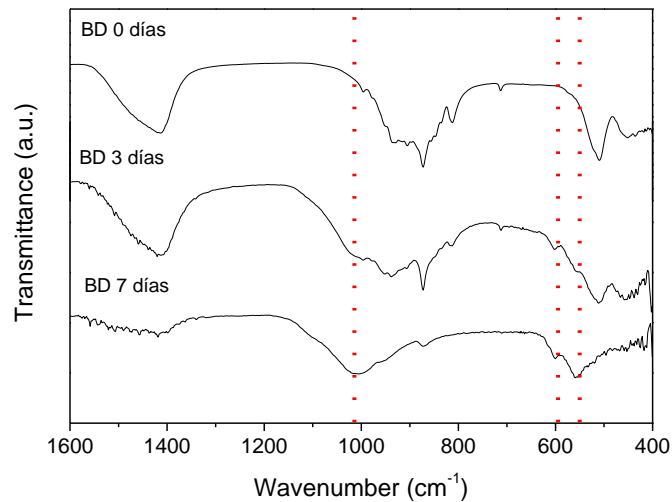


**Gráfico 5.** Análisis por Difracción de Rayos X de BD inmerso en SBF por 3 y 7 días

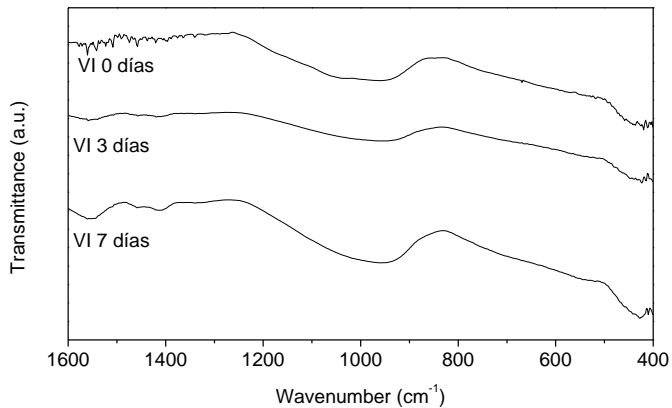


**Gráfico 6.** Análisis por Difracción de Rayos X de VI inmerso en SBF por 3 y 7 días

La formación de apatita se analizó con FTIR-ATR. Los cristales de apatita presentan bandas características alrededor de 557, 601 y 1014  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de los grupos fosfato. El **Gráfico 7** muestra los espectros FTIR-ATR de la superficie de los discos inmersos en SBF por 3 y 7 días en la región de 1600-400  $\text{cm}^{-1}$ . Luego de 3 y 7 días de inmersión en SBF, se expresa gradualmente la desaparición de señales a 1418, 931, 871, 712 y 505  $\text{cm}^{-1}$  y aparición de señales a 557, 601 y 1014  $\text{cm}^{-1}$  (**Gráfico 8**). El Espectro ATR-FTIR para VI, mostró una banda amplia en la región de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , que se mantiene durante los 3 y 7 días de inmersión en SFB, indicando la ausencia de grupos fosfatos.

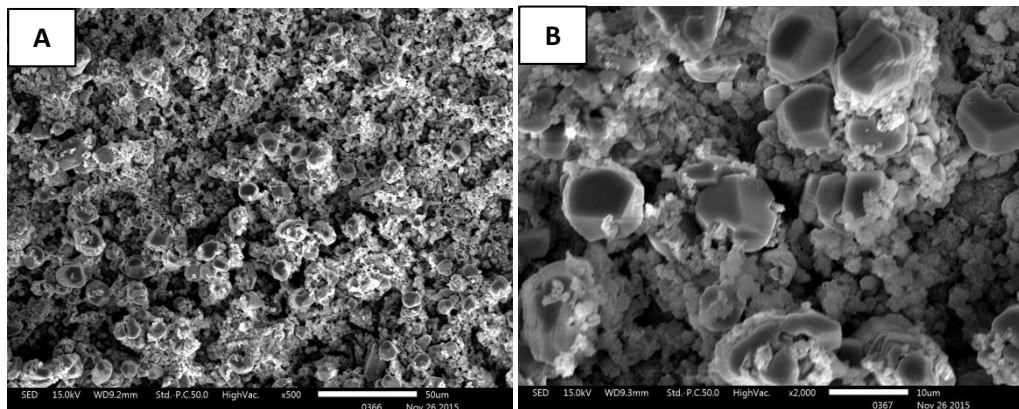


**Gráfico 7.** Espectros ATR-FTIR de BD inmerso en SBF por 3 y 7 días. Se presentan bandas características alrededor de 557,601 y 1014  $\text{cm}^{-1}$



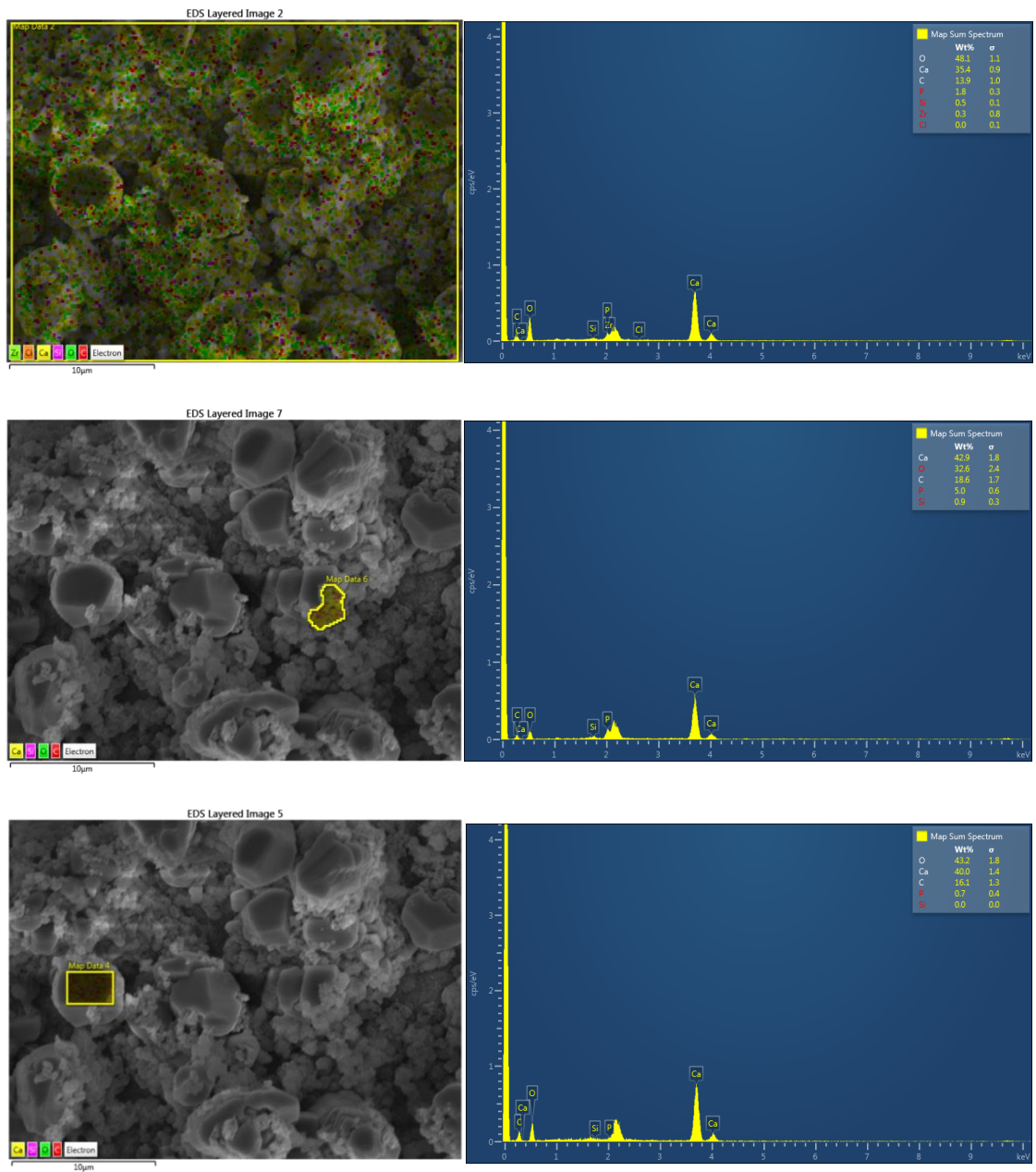
**Gráfico 8.** Espectros ATR-FTIR de VI inmerso en SBF por 3 y 7 días.

Se verificó la formación de apatita en la superficie del material con análisis MEB/EDX. En la **Figura 8** se observan las muestras luego de 7 días de inmersión en SBF. BD indujo la formación de precipitados de morfología globular, generando una capa compacta en su superficie. Se analizó la imagen obtenida a 2000x con EDX el cual reveló que la estructura está compuesta principalmente de calcio, fósforo, oxígeno y zirconio. Se diferenciaron dos fases, una estructura de mayor tamaño formada por conglomerados globulares de 8  $\mu\text{m}$  aproximadamente y adyacente a estos, partículas de 2  $\mu\text{m}$  que los rodean. Ambas fases se evaluaron con EDX, el cual demostró que los depósitos minerales de mayor tamaño están compuestos principalmente por calcio, fósforo y otros elementos traza, a diferencia de las partículas de menor tamaño que tienen mayor contenido de fósforo (**Figura 9**).



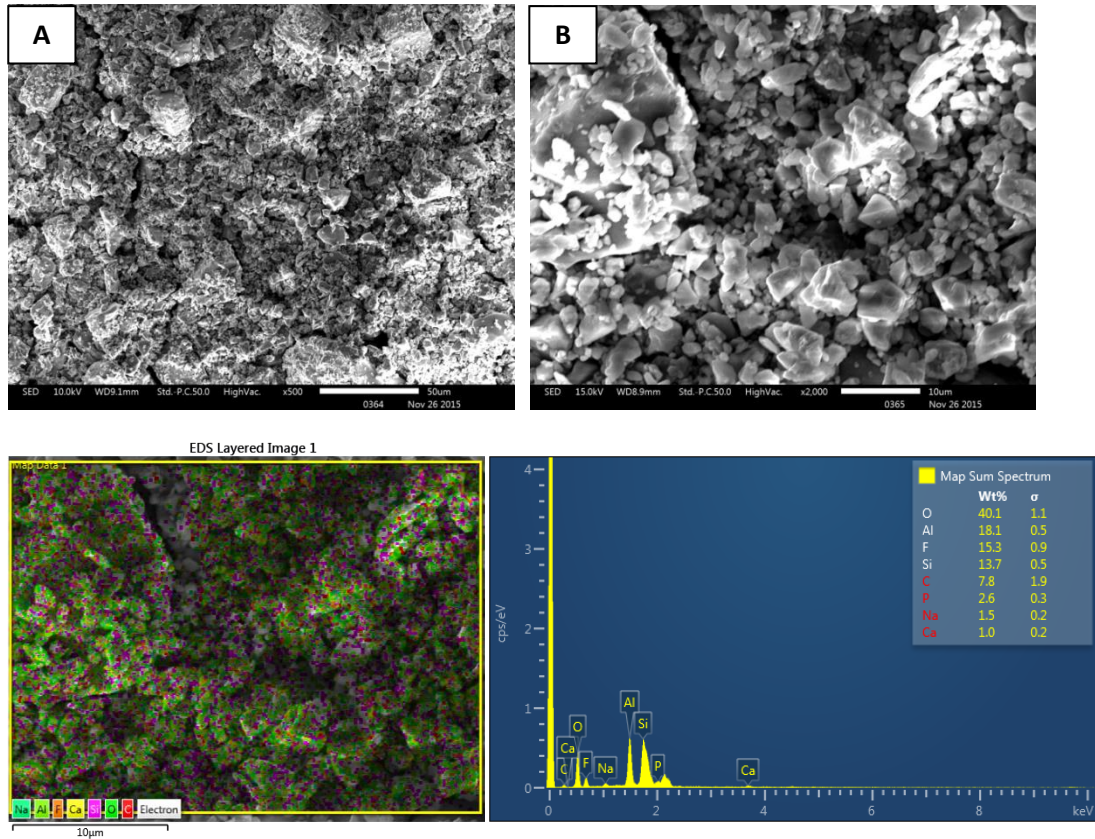
**Figura 8.** Imágenes representativas de BD obtenidas con análisis MEB a los 7 días de inmersión en SBF a 500x (A), 2000 x (B).





**Figura 9.** Imagen representativa de BD obtenidas con análisis MEB a los 7 días de inmersión en SBF a 2000 x con análisis elemental EDX de la estructura completa y de dos fases presentes.

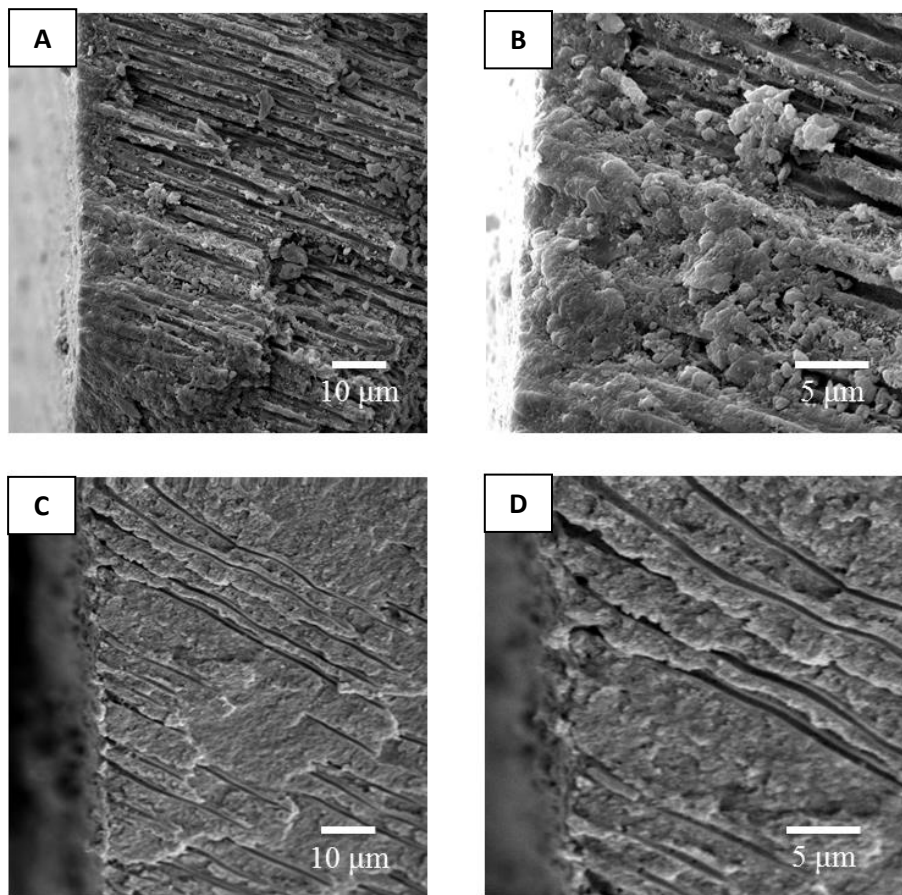
El análisis para VI, mostró partículas de forma irregular de aproximadamente 2 a 5  $\mu\text{m}$ , que se agrupan formando conglomerados. EDX determinó que aluminio, sílice y oxígeno se encuentran en mayor cantidad y flúor, sodio y calcio en menor cantidad (**Figura 10**).



**Figura 10.** Imágenes representativas obtenidas con análisis MEB de VI a los 7 días de inmersión en SBF a 500x (A), 2000 x (B). con análisis elemental EDX.

### 3. Bioactividad ex vivo de Biodentine

Una imagen representativa obtenida con MEB (**Figura 11**) de la interfase entre dentina grabada y BD mostró una banda entre 2-7  $\mu\text{m}$  adyacente a la superficie en la que se aplicó el material. Se observó alteración de la estructura normal de la dentina, los túbulos dentinarios no se encuentran visibles y parecieran estar bloqueados. La interfase entre dentina no grabada y BD mostró túbulos dentinarios abiertos y la capa de barro dentinario adyacente.



**Figura 11.** Imágenes representativas obtenidas de análisis SEM A) Dentina grabada 1000x, B) Dentina grabada 3000x, C) Dentina sin grabar 1000x, D) Dentina sin grabar 3000x

## DISCUSIÓN

En este estudio, se comprobó la bioactividad de BD a través de la detección de depósitos de hidroxiapatita en su superficie al estar inmerso en SBF. Además, se demostró que el grabado dentinario previo a la aplicación de BD permite la formación de una capa interfacial mineralizada entre dentina y BD.

Se utilizaron tres técnicas de caracterización para BD, DRX FTIR-ATR y MEB. En este estudio, los patrones de BD sin presencia de SBF, muestran variadas señales que indican la formación de una estructura cristalina, siendo estos para silicato tricálcico, carbonato de calcio, óxido de zirconio e hidróxido de calcio, los principales compuestos constituyentes de BD. Luego de 3 y 7 días de inmersión en SBF, se observó una reducción en la intensidad de las señales, pudiendo deberse a la disolución de algunos componentes cristalinos en SBF. Sin embargo, luego de la inmersión en SBF por 3 y 7 días, se observó la aparición de una nueva señal a  $25,90^\circ$ , el cual se mostró más pronunciado a los 7 días de incubación. El patrón XRD observado, corresponde a una de las señales características para apatita, que corresponde al plano 002 del cristal (Reyes-Gasga, Martínez-Pineiro et al. 2013), indicando la formación de cristal de apatita, siendo evidente luego de 7 días de incubación en SBF. Es importante destacar que esta señal no se observó en las muestras sin presencia de SBF, dando a entender que BD es bioactivo en contacto con SBF.

El análisis FTIR-ATR de los discos de BD sin presencia de SBF presentó bandas agudas ubicadas alrededor de  $1418, 931, 871, 712$  y  $505\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a la vibración interna de la estructura de silicato de BD. Luego de la inmersión en SBF, se confirmó la presencia de apatita con la aparición de señales a  $557, 601$  y  $1014\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a bandas de vibración de grupos fosfato de la estructura cristalina de apatita (Lin, Li et al. 2009). Las señales de FTIR característicos de apatita a  $557, 601$  y  $1014\text{ cm}^{-1}$  se vuelven más agudos y

dominantes en el espectro de BD luego de 7 días, confirmando el crecimiento de una capa de apatita.

Las imágenes obtenidas con MEB a los 7 días de inmersión en SBF mostraron la presencia de precipitados de morfología globular dispuestos en la superficie del cemento. El análisis EDX señaló que los depósitos minerales formados están principalmente compuestos de calcio y fósforo y otros elementos traza. Lo que corroboraría los resultados obtenidos con las dos técnicas anteriormente descritas, en que se evidencia la presencia de depósitos de apatita en la superficie de BD posterior a su inmersión en SBF. Por otro lado, los mismos análisis aplicados en vidrio ionómero, demuestran la falta de bioactividad del material, ya que no se reveló formación de apatita cuando estuvo inmerso en SBF, como ocurrió con BD.

La capacidad de BD de inducir cristalización de apatita se ha sugerido en algunos estudios, sin embargo la formación de apatita cristalina en la superficie de BD no se ha confirmado. Camilleri et al (Camilleri, Sorrentino et al. 2013) observaron la formación de depósitos minerales tipo apatita con morfología globular en BD luego de 28 días de inmersión en solución salina balanceada de Hank (HBSS), sin embargo no se detectaron señales de apatita con XRD. Grech et al. (Grech, Mallia et al. 2013), verificaron luego de la inmersión de BD en HBSS por 28 días, la formación de silicato de calcio hidratado e hidróxido de calcio y además la presencia de una fase carbonatada confirmada con XRD, pero no se detectó señales de apatita. En el mismo, señales FTIR indicaron también aparición de silicato de calcio hidratado debido a la presencia de bandas típicas entre  $1200$  y  $800\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo las señales obtenidas son amplias y poco definidas (Grech, Mallia et al. 2013). MEB mostró la disposición de granos del cemento hidratado rodeado de una matriz compuesta por silicato de calcio hidratado e hidróxido de calcio. En contraste, en el presente trabajo se verificó la formación de apatita cristalina, a través de las tres técnicas descritas anteriormente, en la superficie de las muestras inmersas en SBF por 7 días.

De acuerdo a la metodología establecida en este estudio, se aplicó BD en la superficie de discos de dentina media previamente grabada y se mantuvieron en SBF por 7 días. Se observó la presencia de una banda de dentina estructuralmente alterada de 2-7  $\mu\text{m}$  adyacente a BD, con bloqueo de la entrada de túbulos dentinarios, lo que no ocurrió en la interfase entre dentina no grabada y BD, en la cual se observaron túbulos dentinarios abiertos y la capa de barro dentinario adyacente. El resultado obtenido se explica ya que la remoción de barro dentinario permite la permeabilidad de los túbulos dentinarios (Pashley and Carvalho 1997) y posibilita la obtención de una superficie libre, que permite la interacción de BD con fluidos presentes en los túbulos dentinarios.

Durante el acondicionamiento de dentina utilizando ácido ortofosfórico, se remueve la capa de barro dentinario y sus prolongaciones intratubulares, desmineralizando además dentina adyacente intacta a una profundidad de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Van Meerbeek, Inokoshi et al. 1992). De este modo, se expone la trama de colágeno y los túbulos dentinarios se vuelven anchos y sus orificios de entrada toman forma de embudo. Con esto, se logra una superficie microporosa que mejora la capacidad de unión y permite la permeabilidad de los túbulos dentinarios (Tay and Pashley 2001). Por consiguiente, en este trabajo se removió esta capa mediante grabado ácido, para luego aplicar BD y obtener la máxima expresión sus propiedades bioactivas.

Algunos estudios han analizado la interfase formada entre BD y dentina radicular o coronaria, sin embargo, existen un limitado número de ellos y la metodología presenta gran variabilidad. Kim et al (Kim, Nosrat et al. 2014) estudiaron la bioactividad de BD incorporado en la superficie del canal radicular inmerso en SBF. Se removió la capa de barro dentinario con EDTA e hipoclorito previo a la aplicación de BD y se evaluó después de 4 semanas de inmersión en SBF. Similar a los resultados del presente trabajo, se observó la presencia de una capa distinguible entre el material y la dentina, de alrededor de 4.8  $\mu\text{m}$ . Aunque la superficie de BD no estaba en contacto con SBF, se detectaron fases

de fosfato de calcio amorfo (ACP) mediante análisis DRX, lo cual se le atribuye al proceso de intercambio iónico en la interfase. (Kim, Nosrat et al. 2014). Otro estudio realizado, demuestra también la formación de una capa en la interfase entre dentina y BD (Han and Okiji 2011), en este se evaluó la bioactividad de BD versus MTA midiendo la cantidad de iones incorporados del material a la dentina adyacente en presencia de PBS. Se evaluó la interfase entre BD y dentina radicular en dientes bovinos, que involucró la remoción de barro dentinario previo a aplicación de material con ácido e hipoclorito. Se observó la formación de una capa en la interfase luego de 90 días de inmersión en solución fosfatada, la cual se extendía con estructuras tipo tarugo dentro de los túbulos dentinarios. La absorción de Ca y Si fue significativamente mayor en BD y al evaluar la composición de dentina adyacente al material se observaron mayores concentraciones de Ca y Si que en dentina sin tratar. En ambos estudios mencionados se realiza grabado de la dentina previo a aplicación de BD, lo cual genera resultados similares a los encontrados en el presente estudio, a pesar de que en ellos se utilizó como sustrato dentina radicular.

En relación a la interacción que se genera entre BD y dentina coronaria, situación que se produce en tratamientos de recubrimiento pulpar directo, indirecto y en uso como base cavitaria, existe un escaso número de estudios al respecto y no hay claridad sobre la realización de acondicionamiento de dentina previo a la aplicación de BD. Un estudio realizado por Atmeh et al., analizó la interfase dentina/ BD y dentina/vidrio ionómero al MEB, luego de la inmersión de discos de dentina con ambos materiales en agua destilada por 4 días, sin embargo no menciona si se hizo acondicionamiento previo de dentina. Los resultados obtenidos mostraron la formación de prolongaciones intratubulares, aparición de una zona de infiltración mineral adyacente a la interfase (de 10 a 20  $\mu\text{m}$ ) y de una banda de dentina alterada estructuralmente bajo la interfase solo en las muestras con BD y no así en las con vidrio ionómero (Atmeh, Chong et al. 2012). En el presente estudio, las muestras fueron grabadas con ácido ortofosfórico y mantenidas en SBF, lo cual representa una ventaja, ya que este simula la

concentración de fosfato del plasma sanguíneo (1 Mm) (Kokubo and Takadama 2006), proporcionando mayor similitud con el medio ambiente corporal, a diferencia del agua destilada utilizada por el estudio de Atmeh et al. A pesar de esto, el resultado fue similar, se observó una banda de dentina estructuralmente alterada de 2-7  $\mu\text{m}$  adyacente a BD y bloqueo de la entrada de túbulos dentinarios, sin embargo, esto sólo se observó en la muestra sin barro dentinario. De manera similar, otro estudio realizado por Camilleri et al (Camilleri, Sorrentino et al. 2013) verificó la formación de cristales de hidroxiapatita en la superficie de muestras de dentina/BD inmersas en HBSS, en que la dentina fue previamente grabada con ácido. Estos estudios si bien muestran la presencia de una capa de dentina alterada estructuralmente, no establecen el efecto del grabado de la dentina previo a la aplicación de BD, lo cual si bien no es parte de las indicaciones del fabricante, en muchos de los estudios que evalúan la relación del material con dentina se ha realizado previamente. Es por esto la importancia de los resultados obtenidos en este estudio, ya que permiten esclarecer el efecto del grabado ácido previo.

Los resultados del presente estudio confirman la bioactividad de BD en SBF y la formación de una capa en la interfase entre dentina y BD. Esta capacidad del material podría ser responsable de los resultados favorables observados por Hashem y et al. en un estudio clínico realizado en él se evaluaron tratamientos de recubrimiento pulpar indirecto con BD y Vidrio ionómero (Fuji IX), en dientes con pulpitis reversible. La remoción de tejido infectado se realizó con Carisolv, el cual no genera la formación de barro dentinario, aplicándose BD o vidrio ionómero directamente sobre la dentina con túbulos expuestos. En el seguimiento a 12 meses, se observó que una mayor cantidad de las lesiones apicales que sanaron fueron en dientes tratados con BD, mientras que hubo una mayor frecuencia de lesiones apicales nuevas o progresión de ellas en dientes tratados con vidrio ionómero (Hashem, Mannocci et al. 2015). La capacidad para formar depósitos de apatita en su superficie al ser expuesto a fluidos fisiológicos y de generar una capa



en la interfase mineralizada con dentina, podría proveer de un mejor sellado y remineralización de dentina afectada, que contribuirían al éxito de estas terapias.

## CONCLUSIONES

- BD es capaz de formar HA cristalina en contacto con SBF.
- BD es capaz de formar una capa mineralizada en dentina adyacente a él solo cuando es aplicado sobre una superficie previamente grabada.
- BD aplicado sobre dentina grabada, favorece la formación de una capa distinguible de dentina alterada estructuralmente y permite el posterior bloqueo de túbulos dentinarios por aposición mineral.
- Futuros estudios clínicos podrían confirmar las propiedades observadas para BD respecto a su capacidad para mejorar el sellado marginal y producir reparación dentinaria, entre otras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramovich, A. (1999). Histología y embriología dentaria. Histología y embriología dentaria, Panamericana: 42-74.

Asgary, S., S. Shahabi, T. Jafarzadeh, S. Amini and S. Kheirieh (2008). "The properties of a new endodontic material." J Endod **34**(8): 990-993.

Atmeh, A. R., E. Z. Chong, G. Richard, F. Festy and T. F. Watson (2012). "Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates." J Dent Res **91**(5): 454-459.

Bachoo, I. K., D. Seymour and P. Brunton (2013). "A biocompatible and bioactive replacement for dentine: is this a reality? The properties and uses of a novel calcium-based cement." Br Dent J **214**(2): E5.

Bader M, A. C., y col (1996). Biomateriales Dentales. Propiedades Generales. Tomo I, Primera Edición U. De. Chile: Cap I, IV, VI 6-15,49-62.

Breschi, L., J. Perdigao, P. Gobbi, G. Mazzotti, M. Falconi and M. Lopes (2003). "Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin." J Biomed Mater Res A **66**(4): 764-769.

Brook, I. M. and P. V. Hatton (1998). "Glass-ionomers: bioactive implant materials." Biomaterials **19**(6): 565-571.

Butt, N., S. Talwar, S. Chaudhry, R. R. Nawal, S. Yadav and A. Bali (2014). "Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine." Indian J Dent Res **25**(6): 692-697.

Camilleri, J. (2013). "Investigation of Biodentine as dentine replacement material." J Dent **41**(7): 600-610.

Camilleri, J., P. Kralj, M. Veber and E. Sinagra (2012). "Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements." Int Endod J **45**(8): 737-743.

Camilleri, J., F. E. Montesin, S. Papaioannou, F. McDonald and T. R. Pitt Ford (2004). "Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate." Int Endod J **37**(10): 699-704.

Camilleri, J., F. Sorrentino and D. Damidot (2013). "Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus." Dent Mater **29**(5): 580-593.

Cao, W. P. and L. L. Hench (1996). "Bioactive materials." Ceramics International **22**(6): 493-507.

Croll, T. P. and J. W. Nicholson (2002). "Glass ionomer cements in pediatric dentistry: review of the literature." Pediatr Dent **24**(5): 423-429.

Eliades G, W. D., Eliades T (2005). Dental hard tissues and bonding, Springer.

Ferrari, M. and C. L. Davidson (1996). "In vivo resin-dentin interdiffusion and tag formation with lateral branches of two adhesive systems." J Prosthet Dent **76**(3): 250-253.

Gandolfi, M. G., P. Taddei, A. Tinti, E. D. Dorigo and C. Prati (2011). "Alpha-TCP improves the apatite-formation ability of calcium-silicate hydraulic cement soaked in phosphate solutions." Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications **31**(7): 1412-1422.

Grech, L., B. Mallia and J. Camilleri (2013). "Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials." Int Endod J **46**(7): 632-641.

Han, L. and T. Okiji (2011). "Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine." Int Endod J **44**(12): 1081-1087.

Han, L. and T. Okiji (2013). "Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials." Int Endod J **46**(9): 808-814.

Hashem, D., F. Mannocci, S. Patel, A. Manoharan, J. E. Brown, T. F. Watson and A. Banerjee (2015). "Clinical and radiographic assessment of the efficacy of calcium silicate indirect pulp capping: a randomized controlled clinical trial." J Dent Res **94**(4): 562-568.

Hashimoto, M., S. Ito, F. R. Tay, N. R. Svizero, H. Sano, M. Kaga and D. H. Pashley (2004). "Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding." J Dent Res **83**(11): 843-848.

Hench, L. L. (1988). "Bioactive ceramics." Ann N Y Acad Sci **523**: 54-71.

Kim, J. R., A. Nosrat and A. F. Fouad (2015). "Interfacial characteristics of Biodentine and MTA with dentine in simulated body fluid." J Dent **43**(2): 241-247.

Kogan, P., J. He, G. N. Glickman and I. Watanabe (2006). "The effects of various additives on setting properties of MTA." J Endod **32**(6): 569-572.

Kokubo, T. and H. Takadama (2006). "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" Biomaterials **27**(15): 2907-2915.

Laurent, P., J. Camps and I. About (2012). "Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization." Int Endod J **45**(5): 439-448.

Lin, Q., Y. Li, X. Lan, C. Lu, Y. Chen and Z. Xu (2009). "The apatite formation ability of CaF<sub>2</sub> doping tricalcium silicates in simulated body fluid." Biomed Mater **4**(4): 045005.

Nakabayashi, N., M. Nakamura and N. Yasuda (1991). "Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism." J Esthet Dent **3**(4): 133-138.

Nowicka, A., M. Lipski, M. Parafiniuk, K. Sporniak-Tutak, D. Lichota, A. Kosierkiewicz, W. Kaczmarek and J. Buczkowska-Radlinska (2013). "Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate." J Endod **39**(6): 743-747.

Oliveira, S. S., M. K. Pugach, J. F. Hilton, L. G. Watanabe, S. J. Marshall and G. W. Marshall, Jr. (2003). "The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system." Dent Mater **19**(8): 758-767.

Pashley, D. H. and R. M. Carvalho (1997). "Dentine permeability and dentine adhesion." J Dent **25**(5): 355-372.

Pashley, D. H., W. G. Matthews, Y. Zhang and M. Johnson (1996). "Fluid shifts across human dentine in vitro in response to hydrodynamic stimuli." Arch Oral Biol **41**(11): 1065-1072.

Peng, Y., P. C. Stark, A. Rich, Jr. and C. Y. Loo (2011). "Marginal microleakage of triage sealant under different moisture contamination." Pediatr Dent **33**(3): 203-206.

Perdigao, J. (2007). "New developments in dental adhesion." Dent Clin North Am **51**(2): 333-357, viii.

Reyes-Gasga, J., E. L. Martinez-Pineiro, G. Rodriguez-Alvarez, G. E. Tiznado-Orozco, R. Garcia-Garcia and E. F. Bres (2013). "XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **33**(8): 4568-4574.

Septodont "Biodentine, Active Biosilicate Technology Package insert."

Septodont. "BiodentineTM Brochure." Retrieved 3/11/2014, 2014, from <http://www.septodontusa.com/products/biodentine>.

Septodont. (2012). "Biodentine Primera y única dentina en una cápsula." Retrieved 2/Marzo/2014, 2014, from <http://www.septodontusa.com/sites/default/files/Biodentine.pdf>.

Septodont. (2014). "Biodentine™ Active Biosilicate Technology™ " Retrieved 2/Marzo/2014, 2014, from [http://www.plandent.no/images/Marketing/Infosenter/Biodentine%20Scientific%20File\\_web\\_dokumentasjon.pdf](http://www.plandent.no/images/Marketing/Infosenter/Biodentine%20Scientific%20File_web_dokumentasjon.pdf).

Silverstone, L. M., M. J. Hicks and M. J. Featherstone (1985). "Oral fluid contamination of etched enamel surfaces: an SEM study." J Am Dent Assoc **110**(3): 329-332.

Tanomaru-Filho, M., E. G. Jorge, J. M. Guerreiro Tanomaru and M. Goncalves (2007). "Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images." J Endod **33**(3): 249-251.

Tay, F. R. and D. H. Pashley (2001). "Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers." Dent Mater **17**(4): 296-308.

Tay, F. R., D. H. Pashley, F. A. Rueggeberg, R. J. Loushine and R. N. Weller (2007). "Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid." J Endod **33**(11): 1347-1351.

Van Meerbeek, B., J. De Munck, Y. Yoshida, S. Inoue, M. Vargas, P. Vijay, K. Van Landuyt, P. Lambrechts and G. Vanherle (2003). "Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges." Oper Dent **28**(3): 215-235.

Van Meerbeek, B., S. Inokoshi, M. Braem, P. Lambrechts and G. Vanherle (1992). "Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems." J Dent Res **71**(8): 1530-1540.

Villat, C., X. V. Tran, N. Pradelle-Plasse, P. Ponthiaux, F. Wenger, B. Grosgeat and P. Colon (2010). "Impedance methodology: A new way to characterize the setting reaction of dental cements." Dent Mater **26**(12): 1127-1132.

Violich, D. R. and N. P. Chandler (2010). "The smear layer in endodontics - a review." Int Endod J **43**(1): 2-15.

Yiu, C. K., F. R. Tay, N. M. King, D. H. Pashley, S. K. Sidhu, J. C. Neo, M. Toledano and S. L. Wong (2004). "Interaction of glass-ionomer cements with moist dentin." J Dent Res **83**(4): 283-289.

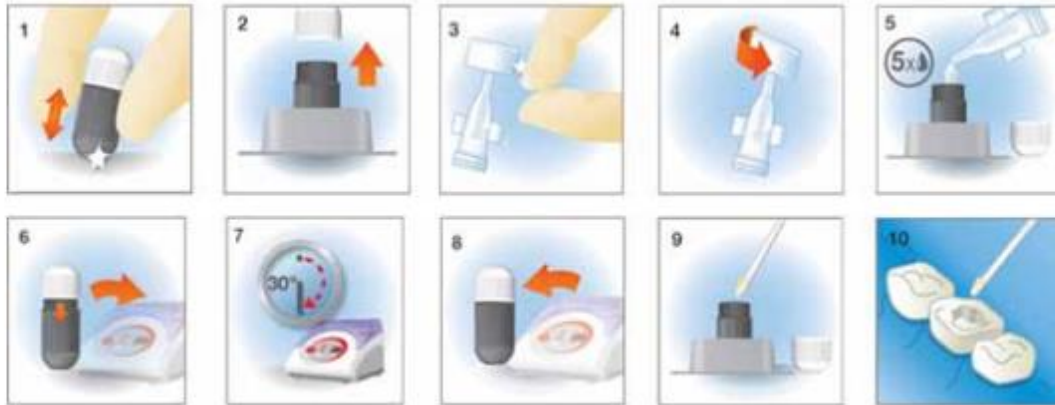
Yoshida, K., N. Yoshida, S. Ejiri, M. Iwaku and H. Ozawa (2002). "Odontoblast processes in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy." Histochem Cell Biol **118**(3): 205-212.

Zanini, M., J. M. Sautier, A. Berdal and S. Simon (2012). "Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization." J Endod **38**(9): 1220-1226.

Zaslansky, P., S. Zabler and P. Fratzl (2010). "3D variations in human crown dentin tubule orientation: a phase-contrast microtomography study." Dent Mater **26**(1): e1-10.

## ANEXOS

### Anexo 1: Instrucciones para manipulación de Biodentine





## Anexo 2: Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE DIENTES PARA EL  
ESTUDIO DE MATERIALES ODONTOLÓGICOS

**Título del Protocolo:**

“Evaluación de la interfase dentina/cemento de silicato de calcio con y sin grabado ácido previo”.

**Investigador Principal:** Dra. Camila Corral

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile - Sergio  
Livingston 943 - Independencia, Santiago.

**Nombre del Donante** .....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes mayores de 18 años, con indicación de extracción de terceros molares, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Camila Corral Núñez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

### **Justificación de la investigación**

Existe un nuevo tipo de material dental para realizar restauraciones, el cual es necesario evaluar en sus propiedades físicas y químicas para poder otorgar al dentista información que le permita seleccionarlo como buen material en indicaciones clínicas. Estas evaluaciones se realizan generalmente en dientes extraídos (*ex vivo*), es la razón por la que lo hemos contactado pues sabemos que usted será intervenido para hacerse la exodoncia de sus terceros molares y quisiéramos solicitarle contribuir a esta investigación donándonos sus piezas dentarias.

### **Objetivos**

La presente investigación tiene por objetivo evaluar los cambios químicos y morfológicos que se generan en los tejidos que conforman el diente (esmalte y dentina) al estar en contacto con un material dental en base a silicato de calcio.

### **Beneficios**

Usted ayudará a aportar información no disponible sobre el efecto de los silicatos de calcio en tejidos dentarios. De esta manera usted ayudará en el progreso de la ciencia, tanto a nivel nacional como internacional y a un mejor entendimiento de los efectos del uso de estos materiales.

### **Tipo de intervención y Procedimiento**

Si usted decide participar y donarnos sus dientes, ellos le serán extraídos mediante un procedimiento quirúrgico habitual realizado en los pabellones de nuestra facultad por el cirujano de su elección, quien le dará las indicaciones del protocolo quirúrgico. Una vez extraídos los dientes, ellos serán almacenados en soluciones antisépticas para ser posteriormente utilizados en el presente estudio.

Sin embargo, debe usted saber que en la pulpa de los dientes se han descubierto múltiples tipos de células madres que pueden ser conservadas bajo un protocolo específico y permitirle potencialmente en el futuro, regenerar alguno de sus tejidos. Actualmente, este procedimiento **no** se realiza en Chile, pero si en el extranjero, procedimiento por el cual se debe pagar. Al donar su diente usted no podrá guardar células madres.

### **Riesgos y efectos adversos**

Usted debe estar atento a las indicaciones del cirujano, pues los posibles efectos adversos corresponden únicamente al procedimiento de extracción y son los mismos que podrían ocurrir si usted no donara sus dientes a alguna investigación. No se efectuará ninguna maniobra adicional destinada sólo al estudio, por lo tanto no existe un riesgo adicional para usted al donar su o sus molares.

### **Criterios para selección de los participantes en el estudio**

Los criterios de inclusión serán: pacientes con indicación de extracción de terceros molares, cuyos terceros molares estén sanos. Los criterios de exclusión serán: pacientes con indicación de extracción de terceros molares, cuyos terceros molares estén con caries, restaurados o fracturados.

### **Confidencialidad y difusión de datos**

Toda su información personal y datos sensibles serán desvinculados de su pieza dentaria. Los dientes serán manejados con los datos completamente anonimizados y jamás se realizarán análisis genéticos sobre las células de estos órganos. Ellos serán usados exclusivamente para esta investigación en los tejidos duros del diente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones:

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar donar sus dientes.
- Si usted decide puede arrepentirse de la donación
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio pero tampoco recibirá pago por su donación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.



### Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Dra. Camila Corral Núñez, Olivos 943 los días lunes y miércoles de 8:00 ± 17:00 o vía telefónica al 29781742 o dirigirse a la Dra. María Angélica Torres, Presidente del Comité Ético Científico, Facultad de Odontología, Universidad de Chile al correo electrónico [cec.fouch@odontologia.uchile.cl](mailto:cec.fouch@odontologia.uchile.cl), fono: 229781703.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

Nombre y Firma del Donante

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

Nombre y firma del Investigador que toma el C.I

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

Nombre y Firma del investigador Principal

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

Nombre Director Centro donde se realiza la Investigación o de su representante

