



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGIA RESTAURADORA

**EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DEL CEMENTO BIODENTINE™ MODIFICADO
CON NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO.**

Gabriela Sepúlveda Rebaudo

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Camila Corral Núñez

Dr. Eduardo Fernández Godoy

Adscrito a PRI ODO 14/011

Santiago - Chile

2015

*Al mundo
por darme tierra para pisar,
aire para volar, ríos que cruzar
y rocas que escalar.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre por darme un apoyo incondicional y cariño durante toda mi vida, gracias por siempre estar ahí en cada aprendizaje y alegría.

A mi abuela “Guly” por cada velita prendida, si bien no compartimos las mismas creencias, su Fe y apoyo fue un pilar fundamental en este proceso.

A mi Padre por darme el regalo y la oportunidad de estudiar, sus infaltables palabras para encontrar claridad en momentos confusos y su cariño.

A Francisco Peña, compañero de vida y de aventuras, sin él nada hubiese sido tan entretenido. Gracias por tanto amor y paciencia.

A mis amigos de la Universidad quienes me han acompañado en todas las locuras que han ido y venido en este andar, sólo decirles que son lo mejor que ha tenido este proceso.

A Dra. Camila Corral por ser la mejor guía en este proceso, sin ella las cosas hubiesen sido aburridas, gracias por sembrar la semilla de la investigación y por toda la paciencia que me tuvo.

Y a todo quien sienta que fue parte de esto le doy las gracias, siempre una sonrisa o una palabra ayudó a ser todo más feliz

Al PRI-ODO 14/011 por darme la oportunidad de ser parte de esta investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	<i>pág.1</i>
MARCO TEÓRICO	<i>pág.4</i>
HIPÓTESIS	<i>pág.12</i>
OBJETIVO GENERAL	<i>pág.12</i>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<i>pág.13</i>
METODOLOGÍA	<i>pág.13</i>
RESULTADOS	<i>pág.19</i>
DISCUSIÓN	<i>pág.27</i>
CONCLUSIONES	<i>pág.31</i>
REFERENCIAS	<i>pág.32</i>

INTRODUCCIÓN

La obtención de un adecuado sellado marginal diente/restauración, es una de las condiciones más relevantes para predecir éxito al reemplazar tejido dentario con un material dental (Masih y cols. 2011). Las brechas en la interfaz material-dentina son responsables de la sensibilidad post operatoria y caries secundarias que pueden llevar al fracaso de una restauración (Pashley y cols. 2002) (Mjor y Toffenetti 2000). Por años se ha estado en búsqueda de un material que enfrente el desafío de reemplazar dentina, logrando a su vez un buen sellado marginal, por lo que se han desarrollado diferentes tipos y estrategias, por ejemplo: los cementos de vidrio ionómero y su unión química con el tejido dentario, los sistemas adhesivos de las resinas compuestas que forman una capa híbrida con tejidos dentarios (Camilleri 2013) (Raju y cols. 2014) (Auschill y cols. 2009). Sin embargo, ninguno de estos materiales permite obtener un sellado adecuado en situaciones donde no es posible controlar la humedad.

Dentro de las propiedades de los materiales la bioactividad permite generar una respuesta biológica específica en la interfase del material, formando una unión entre el tejido y el material de restauración (Cao y Hench 1996). Algunos materiales bioactivos permiten el depósito de apatita en su superficie cuando están en contacto con fluidos fisiológicos. De esta manera se espera que estos depósitos minerales puedan contribuir a reducir la filtración llenando los espacios entre material/dentina, al estar expuestos a fluido dentinario en los túbulos (Han y Okiji 2013). Dicha cualidad hace suponer que un material que desarrolle este tipo de respuesta generará una unión más íntima en la interface diente/restauración.

Recientemente, se ha introducido un nuevo tipo de material para reemplazar tejido dentario perdido, los silicatos de calcio. Este tipo de materiales en un comienzo se recomendó solo para aplicaciones endodónticas como el cemento de Portland o MTA (Mineral Trioxide Aggregate) debido a sus excelentes propiedades bioactivas, pero bajas propiedades mecánicas (Kaup y cols. 2015). Sin embargo, en el 2011, aparece Biodentine™ (Septodont), el cual posee propiedades mecánicas mejoradas y se indica

para restaurar de manera temporal y permanente la dentina (Septodont ;Septodont.). Este es un cemento en base a silicato de calcio, el cual posee propiedades mecánicas mejoradas debido a la eliminación del aluminio en la estructura del cemento y la incorporación de un relleno de carbonato de calcio. Este material corresponde a un compuesto inorgánico, no metálico de presentación comercial en cápsulas y ampollas (Septodont). El polvo, contenido en la cápsula, está compuesto principalmente por silicato tricálcico, carbonato de calcio y dióxido de zirconio. Mientras que el líquido, contenido en la ampolla, de base acuosa contiene cloruro de calcio como acelerador y un agente reductor de agua (Bachoo y cols. 2013).

Dentro de las indicaciones de uso del material, se describe su uso en recubrimiento pulpar, reparación de perforaciones en canal radicular, material de relleno endodóntico y como base en sustitución de la dentina (Priyalakshmi y Manish 2014). En estas situaciones el material estará en contacto directo con tejido pulpar/periodontal y/o dentina profunda, por lo tanto, se aplicará en condiciones de un sustrato húmedo. Se ha estudiado la interfase que genera con dentina, este tipo de cementos poseen un pH fuertemente alcalino lo que produce un efecto de desnaturalización, esto permite formar una zona de infiltración mineral por un proceso de difusión de carbonatos desde el cemento de silicato a la dentina.(Atmeh y cols. 2012). Esta capa se forma en un grosor considerable y es rica en Si y Ca (Bachoo y cols. 2013). Se ha evidenciado la formación de prolongaciones minerales intratubulares compuestas frecuentemente por Ca, P y Si, sugiriendo una precipitación intratubular en dentina (Han y Okiji 2013). Sin embargo, al evaluar la capacidad de esta interfase para impedir la microfiltración se observan resultados diversos.. Si bien no existe diferencia significativa en la integridad marginal y microfiltración entre Biodentine comparándolo con cementos de ionómero modificado con resina, se cree que la formación de cristales de apatita en la interfase podría contribuir a un mejor sellado marginal en la restauración con Biodentine (Koubi y cols. 2012).

Por otro lado, el vidrio bioactivo (VB), es un material conocido por su alta capacidad de producir una capa de hidroxiapatita carbonatada en su superficie cuando está en contacto con fluidos fisiológicos (Hench 1988). Este material se ha utilizado en

aplicaciones relativas a la odontología con anterioridad, como por ejemplo, Se ha incorporado a pastas dentales para disminuir la sensibilidad dental (Wang y cols. 2011). Además, existe un estudio en donde se ha evaluado su uso como material restaurador, y aplicado directamente en la forma de polvo (Gjorgievska y cols. 2013). Los resultados de este estudio, muestran que el VB en contacto con dentina forma una capa de intercambio iónico en la interfase; sin embargo, las partículas de VB utilizadas eran de tamaño micrométrico, lo que impidió su completa adaptación a la superficie de la dentina, por lo que el trabajo sugiere el uso partículas de menor tamaño en futuros estudios.

En la actualidad, existe la posibilidad de sintetizar partículas de VB en tamaños nanométricos y se ha observado que al incorporarse dentro de diversas matrices, mejora su bioactividad significativamente (Hong y cols. 2009;Valenzuela y cols. 2012). Las partículas de tamaño nanométrico tienden a presentar mayor bioactividad que su contraparte micrométrica, debido a su mayor área superficial o de contacto. El presente proyecto busca mejorar la bioactividad del cemento Biodentine, a través de la incorporación de nanopartículas de VB. Se evaluó su bioactividad por si sólo y al estar en contacto con dentina.

MARCO TEÓRICO

1. Estrategias para reemplazar tejido dentinario

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 buen sellado marginal en la evaluación clínica.

Entre los materiales y estrategias utilizadas hoy en odontología se encuentran los sistemas adhesivos, dónde la unión con la superficie dental es a través de micro retenciones. Para esto se utiliza ácido ortofosfórico sobre la superficie del diente, en dentina el grabado ácido expone una red microporosa de colágeno, dónde el adhesivo penetra en los túbulos dentinarios expuestos formando tags de resina los cuales generan una zona denominada capa híbrida entre el material y restauración (Van Meerbeek y cols. 2003) Ferrari y Davidson 1996)(Nakabayashi y cols. 1991). Sin embargo, las resinas contienen moléculas hidrofóbicas que son sensibles a la humedad y contaminación de los fluidos orales durante el procedimiento de restauración lo que puede comprometer la adhesión a la estructura dentinaria (Silverstone y cols. 1985) impidiendo de esta manera lograr un sellado marginal estable en el tiempo.

Los cementos de vidrio ionómero se han utilizado para reemplazar tejido dentinario como base cavitaria y restauraciones temporales y permanentes (Croll y Nicholson 2002). La unión química que genera con la superficie dentinaria es por la combinación de ácidos policarboxílicos con hidroxapatita (Wiegand y cols. 2007). Se ha descrito que estos cementos liberan iones fluoruro que por sí solos, los que tienen la propiedad de ser cariostáticos. Una liberación sostenida de iones fluoruro en la interfase diente/restauración ayuda a prevenir la microfiltración y por ende las caries secundarias (Brook y Hatton 1998). Sin embargo, la saliva puede afectar la calidad de unión del ionomero con la dentina (Yiu y cols. 2004).

Los cementos de silicato de calcio dentro de la odontología restauradora se han utilizado como base cavitaria o liner, produciendo una respuesta pulpar (Parirokh y Torabinejad 2010;Parirokh y Torabinejad 2010), ya que se ha visto que en contacto con tejido pulpar

estimula la formación de un puente dentinario (Nowicka y cols. 2013). En estudios se ha observado que estos cementos pueden generar una unión íntima con dentina formando una zona infiltración mineral dónde se ha evidenciado formación de tags minerales y una capa de difusión de calcio y silicio desde el material hacia dentina (Han y Okiji (2011); Han y Okiji 2013). El primer material de este tipo fue el Mineral Trioxide Aggregate (MTA) que presenta una ventaja en su uso como relleno endodóntico principalmente por sus propiedades bioactivas y biocompatibilidad (Han y Okiji 2013). Existen otras marcas en el mercado como MTA Angelus (Angelus Soluções Odontológicas, Brazil) y Endo CPM Sealer (Egeo, Argentina) que poseen las mismas propiedades (Parirokh y Torabinejad 2010). Actualmente se ha introducido al mercado en el año 2011 Biodentine™ que tendría mejores propiedades mecánicas para el reemplazo de dentina tanto como relleno endodóntico y como material de obturación (Septodont.).

2. Biodentine™

Cemento en base a silicato tricálcico, producido por Septodont.

2.1 Composición

Este cemento es un compuesto inorgánico no metálico. Su presentación comercial es una cápsula que contiene el polvo y ampolla que contiene el líquido. El polvo consta principalmente de silicato tricálcico, carbonato de calcio y dióxido de zirconio. El líquido combina cloruro de calcio, agua y un agente reductor de agua (**Tabla 1**) (Bachoo y cols. 2013).

Tabla 1. Composición Biodentine™ (Bachoo y cols. 2013)

Polvo	
Silicato Tricálcico	Principal estructura del material
Silicato Di-Cálcico	Estructura secundaria del material
Carbonato y Oxido de Calcio	Relleno
Óxido ferroso	Color
Óxido de Zirconio	Radio opacificador
Líquido	
Cloruro cálcico	Acelerador
Polímero Hidrosoluble	Agente reductor de agua

Se

propone que la disminución de tiempo de fraguado del material (12 minutos) en comparación a cementos de silicato de calcio como MTA es debido al menor tamaño de las partículas de polvo, ya que permite una mayor área de reacción. También el cloruro de calcio contenido en el líquido funciona como acelerador de la reacción (Kogan y cols. 2006;Wiltbank y cols. 2007). Para mejorar las propiedades mecánicas, se incluye carbonato de calcio al polvo y se eliminan impurezas en su fabricación (Septodont.). El polímero hidrosoluble contenido en el líquido puede permitir lograr una mejor densidad de polvo, ya que con una menor cantidad de agua se logra una consistencia adecuada para un manejo más fácil del material en su aplicación (Septodont). Su radiopacidad está dada por el oxido de zirconio, se ha usado en otros materiales para este efecto, siendo posible su observación en radiografías (Tanomaru-Filho y cols. 2007).

2.2 Reacción de fraguado

La reacción del polvo con el líquido produce un fraguado del cemento y su posterior endurecimiento. La hidratación del silicato tricálcico permite la formación de un gel de silicato de calcio hidratado (CSH) e hidróxido de calcio. Esto se consigue a través de la disolución del silicato tricálcico y la precipitación de silicato de calcio hidratado. La capa de CSH se obtiene posterior a la nucleación y crecimiento sobre la superficie de silicato tricálcico llenando gradualmente los espacios entre los granos de silicato tricálcico que no han reaccionado. La cristalización del gel CSH sucede a través de una continua hidratación formándose también cristales de carbonato de calcio (CaCO₃) en estos espacios. Estos cristales lentamente van llenando los espacios en un periodo de dos semanas aproximadamente (Bachoo y cols. 2013); sin embargo, existe un estudio que sugiere que la completa hidratación de este cemento podría continuar por meses persistiendo un intercambio iónico, disminuyendo la porosidad y aumentando sus propiedades mecánicas (Villat y cols. 2010).

La reacción de hidratación esta resumida en la siguiente formula:



2.3 Propiedades bioactivas

La bioactividad de un material está definida por su capacidad para producir una respuesta biológica (Hench 1988). Dentro de la interpretación contemporánea de la bioactividad aplicada al área de reconstrucción de tejidos, se define como material bioactivo el cual produce una respuesta biológica específica en la interfaz del material, lo que conlleva la formación de una unión íntima entre el tejido y el material (Rahaman y cols. 2011). Una característica particular en este tipo de materiales es que se produce una modificación de su superficie, se forma una capa de apatita carbonatada tiempo después de su contacto con el tejido, que a su vez va aumentando con el tiempo (Niu y cols. 2014).

El comportamiento bioactivo se puede demostrar por la mineralización in vitro, dónde es posible evaluar la bioactividad de un material por su capacidad de generar hidroxiapatita en su superficie cuando es sumergido en fluido corporal simulado (SBF) (Kokubo y Takadama

2006)(Kokubo y cols. 1990). Biodentine™ en estudios in vitro ha demostrado su capacidad para inducir la formación de depósitos de calcio y fósforo sobre la superficie del material cuando está en contacto con fluidos (Han y Okiji 2013). Se ha observado en estudios ex vivo que poco tiempo después de su aplicación como material de recubrimiento pulpar directo genera focos de mineralización, e induce la diferenciación celular odontoblástica en tejido pulpar (Laurent y cols. 2012)(Zanini y cols. 2012). Al evaluar su interface con dentina, se ha observado la formación de prolongaciones minerales en los túbulos dentinarios, formando una zona de infiltración mineral, lo que se ha propuesto que ocurre por su alto pH alcalino, que produciría un grabado cáustico inicial, seguido por infiltración mineral (Camilleri 2013) lo que permitiría obtener un buen sellado marginal de la restauración en condiciones de humedad tanto de la dentina como del medio (Jefferies y cols. 2015). Actualmente, no se ha evidenciado que Biodentine™ genere hidroxiapatita en su superficie al ser sumergido en SBF.

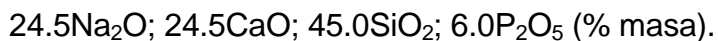
3. Vidrio Bioactivo

El vidrio bioactivo (VB) ha sido ampliamente investigado tanto en el área médica como odontológica. Se ha evidenciado que tiene alta bioactividad por lo que ha sido utilizado para reparación y regeneración ósea (Jones 2013). Este material es reabsorbible y promueve la formación de tejido óseo uniéndose al tejido cuando es implantado en el cuerpo (Hench 2013). Se ha comercializado bajo diferentes nombres y presentaciones siendo algunas de sus marcas conocidas como Bioglass®, Biogran® (Biomet 3i), Novamine® y Perioglas® (Novabone). (Jones 2013).

3.1 Composición

VB es un vidrio silicado basado en la red tridimensional de SiO₂ amorfa, en la cual un átomo de silicio (Si) está coordinado con cuatro átomos de oxígeno (O), y además están

presentes iones de fosfato y calcio (Brauer 2015). La composición de BG 45S5 se puede resumir en la siguiente fórmula química (Hench 1988):



3.2 Bioactividad

En vidrios con altos niveles de bioactividad como BG 45S5 las primeras etapas de la reacción ocurren rápidamente, completándose a las 24 horas. En este proceso se liberan iones solubles desde el vidrio hacia la interfase, formándose sobre la superficie del vidrio una doble capa de sílice hidratado e hidroxiapatita policristalina (HCA) (Clark y cols. 1976; Oonishi y cols. 2000; Hench 2013). VB tiene carga superficial negativa en SBF, debido a deprotonación de grupos tipo $-\text{COOH}$ u $-\text{OH}$ a pH fisiológico (Oliveira y cols. 2003). Esta carga negativa atrae iones de calcio creando una capa rica en Ca^{2+} con potencial de superficie positivo, que atrae a iones negativos en soluciones tipo fosfato, llevando a la deposición de una capa pobre en Ca^{2+} . Este proceso se repite generando la capa de hidroxiapatita en la superficie del material (Figura 1) (Kim y cols. 2005; Landi y cols. 2005).

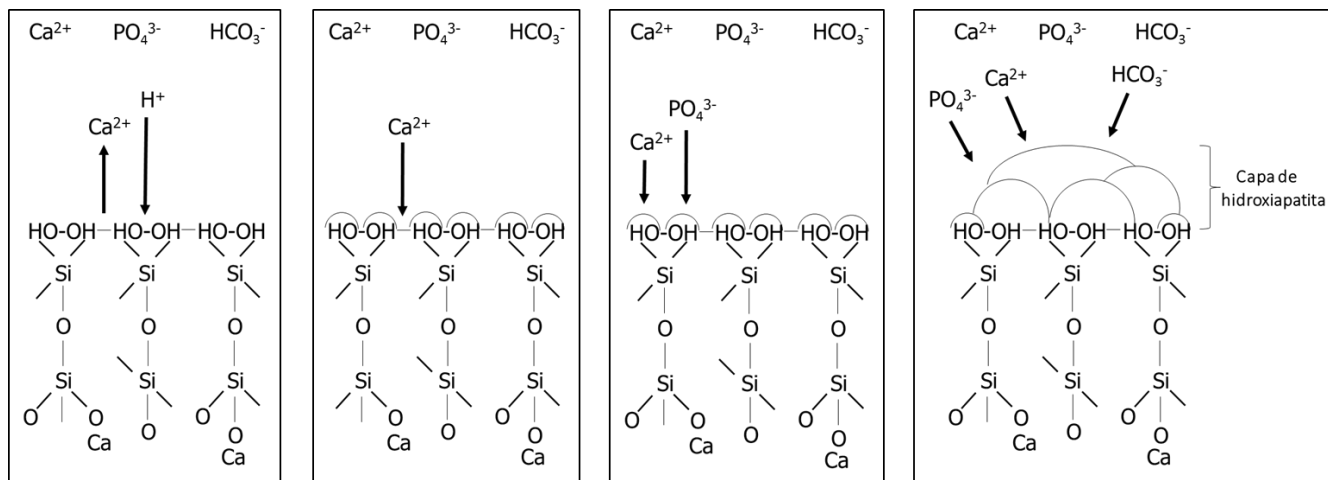


Figura 1. Formación de hidroxiapatita sobre una superficie de vidrio bioactivo.

3.4 Usos

En el área de la odontología, el VB se ha utilizado como injerto óseo en cirugía bucal de defectos óseos menores, regeneración de hueso alveolar, regeneración ósea guiada, relleno de alveolo post extracción dentaria, relleno en exéresis de quistes y apicectomías, elevación de seno maxilar, aumento de cresta ósea y tratamiento de perimplantitis. (Jones 2013). Este material también se ha utilizado en pastas dentales para disminuir la sensibilidad (Wang y cols. 2011). En estos productos las partículas de VB 45S5 aparecen con el nombre de la tecnología Novamine®. Las partículas Novamin presentan un tamaño micrométrico de 18 μm , y se ha evidenciado que estas partículas se adhieren a la dentina formando HCA, obliterando el túbulo dentinario produciendo alivio del dolor (Gillam y cols. 2002). Como material restaurador pudiese ser beneficioso la formación de una capa de apatita en la interfase con el tejido dentario; y el uso de partículas de menor tamaño podría acelerar o hacer más eficiente la formación de la nueva fase de hidroxiapatita.

4. Nanopartículas

Actualmente, gracias a nuevas técnicas de síntesis que ofrece la nanotecnología es posible crear nanopartículas para el uso y formación de biomateriales. Esto se hace con el fin de explotar fenómenos y propiedades tanto físicas, químicas como biológicas en escala nanométrica. Al disminuir el tamaño de las partículas, aumenta el área superficial, la rugosidad y energía superficial del material, aumentando la velocidad de disolución de las partículas en productos iónicos. Según las propiedades de superficie de un material se facilita la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular para regular el comportamiento celular (Mendonca y cols. 2008).

Para poder producir nanopartículas se recurre a la técnica Sol-gel donde las dispersiones de partículas coloidales (1-100nm de diámetro) en un medio líquido se conoce como “soles” y un gel es una red rígida compuesta de poros interconectados y cadenas de polímeros. La formación de una red 3D interconectada que forma el gel se basa en una constante y simultánea hidrólisis y policondensación graficada en la **figura 2**.

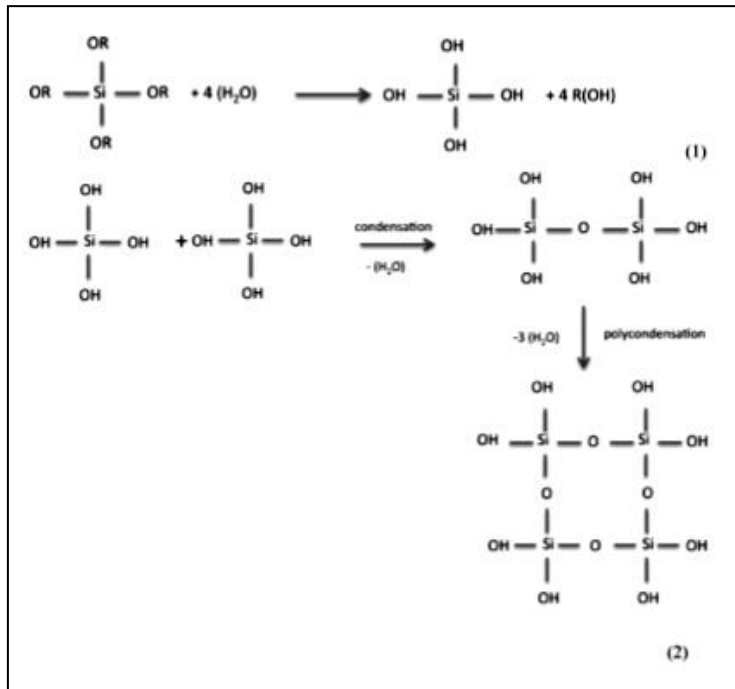


Figura 2. Hidrólisis y condensación en proceso técnica sol-gel

El envejecimiento del gel se produce al reducir la porosidad debido al constante proceso de policondensación y re precipitación de la red. El gel obtenido se seca mediante la eliminación del líquido sometiéndolo a temperatura dónde por consecuencia, se eliminan también los poros formados por la red tridimensional aumentando la densidad de la red (Kaur y cols. 2015).

4.1 Nanopartículas de vidrio bioactivo

El número de átomos influye directamente en el área de superficie aumentando a medida que el tamaño de las partículas disminuye (Sun 1998), lo cual incrementa su área de reacción. Partículas de tamaño nanométrico forman cristales más pequeños que se disuelven más rápido que cristales de mayor tamaño de la misma composición química, gracias a la exposición de mayor área superficial al ambiente biológico y a un mayor número de defectos presentes en la trama cristalina (Daculsi y cols. 1989; Suvorova y cols. 1998). Las partículas VB micrométricas se preparan a altas temperaturas (1300-1450 °C), lo que implica la obtención de una estructura altamente cristalina, la cual es considerada insoluble en medio fisiológico (Kim

y cols. 2000). En contraste, se pueden obtener nanopartículas de VB utilizando temperaturas de procesamiento relativamente bajas, a partir del método de precipitación sol-gel anteriormente descrito (Sanosh y cols. 2009). Controlando el tamaño de las partículas a escala nanométrica, aumenta el área de superficie de contacto por lo que aumenta la disolución de partículas y su bioactividad (Ajita y cols. 2015). De este modo la incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo a la matriz del cemento Biodentine™, podría mejorar su bioactividad, particularmente su capacidad de inducir la formación de hidroxiapatita cristalina tipo dentinaria.

En este estudio se incorporarán nanopartículas de vidrio bioactivo en el cemento Biodentine™ y se evaluará la bioactividad del material resultante mediante ensayos in vitro y utilizando un modelo ex vivo.

HIPÓTESIS.

La incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG) en Biodentine (BD), mejora su capacidad para inducir la formación de hidroxiapatita in vitro y permite la formación de prolongaciones minerales intratubulares en modelo ex vivo.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la bioactividad del cemento Biodentine modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo analizando su capacidad para inducir la formación de hidroxiapatita in vitro y la formación de prolongaciones minerales intratubulares en un modelo ex vivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Objetivo 1: Preparar y caracterizar estructuralmente el nanocompósito nBG/BD.

Objetivo 2: Evaluar la capacidad de formación de apatita de nanocompósito nBG/Bd *in vitro* en fluido fisiológico simulado.

Objetivo 3: Evaluar la capacidad de formar prolongaciones intratubulares de nanocompósito nBG/Bd utilizando un modelo *ex vivo*

METODOLOGÍA.

Estudio Cualitativo descriptivo

Materiales

Se utilizó Biodentine (BD) de la compañía Septodont (Saint Maur de Fossés, France). Se usaron nanopartículas de nBG (40-70nm) previamente sintetizadas por el método sol-gel con la composición molar: $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5$. Se usó también como material de referencia vidrio ionomero GC Fuji IX en cápsulas (GIC; GC Corporation, Tokyo, Japan) para análisis de caracterización y bioactividad *in vitro*.

1. Preparación de cemento nanocompósito.

El nanocompósito fue preparado con un 1% en contenido de la nanopartícula, debido que resultados preliminares indicaron que con este contenido se logran una mayor actividad (Corral 2015). Para este propósito se añadieron 7 mg de nBG, previamente pesados en una balanza de precisión RADWAG WT2000, a una cápsula de Biodentine (BD; Septodont, Saint Maur de Fossés, France,), luego fue mezclado en el amalgamador por 30 segundos. Posteriormente se abrió la cápsula y se vertieron 5 gotas de líquido BD siendo mezclado según instrucciones del fabricante. Posteriormente se prepararon discos de 7 mm de diámetro y 2,5 mm de espesor (n=3; BD y nanocompósito nBG/BD) aplicando el material en

moldes de silicona de las dimensiones indicadas. Los discos se mantuvieron en estufa a 37 °C, 100% de humedad por 24 horas.

2. Caracterización estructural del material nanocompuesto.

2.1 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

La caracterización de la estructura de BD y nBG/BD fueron evaluadas mediante difracción de rayos – X (DRX) Difractómetro D 5000 X-Ray (Siemens, Karlsruhe, Germany) usando radiación $\text{CuK}\alpha$ dentro de un rango 2θ de 5 - 40 ° a una velocidad de escaneo de 1,2 ° / min. Este tipo de análisis permite identificar la estructura cristalina de un material.

2.2 Análisis por Espectroscopía Infrarroja (Attenuated Total Reflectance with Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis)

Para completar la caracterización de utilizó también espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier de reflectancia atenuada total ATR-FTIR Cary 630 Agilent Technologies FTIR-ATR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se consideró un rango de longitud onda de 400-1600 cm^{-1} para el ATR-FTIR. La técnica de Espectroscopía de Infrarrojo permite la identificación de grupos funcionales en un compuesto. Las moléculas al estar expuestas a radiación infrarroja, absorben la radiación produciendo una vibración intramolecular con una frecuencia igual a la de la radiación absorbida pero aumentada en intensidad lo que genera señales con frecuencias específicas que corresponden a la vibración de un enlace en particular (Coates 2000).

3. Ensayos de bioactividad in vitro

Los materiales preparados en la forma de discos, fueron mantenidos en contenedores individuales con 50 mL de solución fisiológica simulada (SBF). La solución de SBF fue preparada 24 horas 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 ₃	0,350 g
KCL	0,224 g
K ₂ HPO ₄	0,179 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,305 g
HCL 1 M	40 mL
CaCl ₂	0,278 g
Na ₂ SO ₄	0,071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ (Buffer Tris)	6,057 G
HCL para ajustar a pH 7,4	_____

Las muestras fueron incubadas por 3 y 7 días en un baño termostático a 37 °C con agitación constante. Posterior a esto fueron secadas en estufa a 37°C por 24 horas.

3.1 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

La identificación de los depósitos de hidroxiapatita que se formaron luego de su inmersión en SBF se analizó con DRX.

3.2 Análisis por Espectroscopía Infrarroja (Attenuated Total Reflectance with Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis)

Los depósitos de hidroxiapatita formados en SBF se caracterizaron mediante espectroscopia ATR-FTIR

3.3 Microscopia electrónica de barrido y microanálisis elemental.

De acuerdo al análisis de los resultados de ATR-FTIR y de XRD se eligió un tiempo de inmersión en SBF en el cual se observaron mayores diferencias entre Biodentine y nanocompósito nBG/BD para su evaluación con microscopía electrónica y análisis de la composición química mediante espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDX) acoplada al microscopio. Los discos inmersos en SBF fueron deshidratados y montados en aluminio y recubiertos con oro. Las muestras se examinaron usando un equipo Vega 3 SB (Tescan, Kohoutovice, Czech Republic) microscopía electrónica de barrido con energía dispersiva y espectroscopia de rayos X, Vega 3 SB (Tescan, Kohoutovice, Czech Republic).

Las imágenes de la superficie del material fueron captadas a 1000x y 3500x y el EDX de áreas representativas de las muestras a 3500x.

4. Evaluación de bioactividad de nanocompósito ex vivo.

4.1 Recolección de dientes.

Se recolectaron terceros molares humanos y fueron utilizados los que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: Dientes libres de caries, restauraciones y fracturas con indicación de exodoncia. Para la autorización por parte del paciente se le informó verbal y por escrito, mediante un consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Inmediatamente después de la extracción, los molares fueron almacenados y mantenidos en formalina tamponada al 10% por 7 días, posterior a lo cual se mantuvieron en suero fisiológico.

4.2 Preparación de las muestras.

Los dientes fueron inmersos en timol al 0.5% por 24 horas para desinfección. Posteriormente, se procedió a limpiar restos de tejido periodontal mediante curetas (Gracey nº 11-12 y 13-14 American Eagle USA). Los molares fueron conservados en suero fisiológico.

Las raíces de los molares se incluyeron en bloques de acrílico de autocurado. Para esto, se confeccionaron matrices plásticas de dimensiones 1.5 x 1.5 cm y 1 cm de profundidad. Se aislaron los moldes con vaselina líquida y se rellenaron las matrices con acrílico autocurable marca Marché. Luego, se posicionaron los dientes en el acrílico dejando la corona anatómica fuera de la inmersión, se esperó la polimerización, se retiraron y fueron nuevamente almacenados en suero fisiológico.

Para obtener discos de dentina media de 2 mm de grosor, se utilizó la cortadora Isomet Buehler (Ler Lakebuff IL, USA 1000 a 700 rpm, 500 gr de presión). Para esto se calibró el corte a una distancia de 2.3 mm respecto al primer corte (considerando el grosor del disco de diamante de 0.3 mm). Los cortes fueron realizados paralelos a la cara oclusal y durante todo el proceso de corte los discos estuvieron hidratados con agua corriente como refrigeración. Para la estandarización de barro dentinario se utilizó lija de 600 gránulos por cm², sobre una superficie plana, bajo agua corriente por 60 segundos. En la cara del disco en que se realizó la estandarización de barro dentinario, se realizó grabado ácido con ácido

ortofosfórico al 37% por 20 segundos y posterior lavado de la superficie con agua destilada por el doble del tiempo. La superficie fue secada con aire de jeringa triple a distancia de manera de obtener una superficie húmeda, no reseca.

Luego los discos fueron divididos en dos grupos:

Grupo BD: Se aplicó Biodentine en la superficie del disco siguiendo las instrucciones del fabricante para su mezclado (explicadas a continuación).

Grupo nanocompósito nBG/BD: Se aplicó Biodentine con 1% en peso de nanopartículas de vidrio bioactivo en la superficie del disco.

Los discos de dentina modificados con los materiales fueron sometidos al ensayo de bioactividad en SBF de acuerdo a los procedimientos antes descritos por 10 días, posterior a esto, las muestras fueron mantenidas a 100°C por 24 horas y luego fracturadas perpendicular a la interfase. 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.

La formación de las prolongaciones minerales en los túbulos dentinarios fue analizada mediante microscopía SEM-EDX.

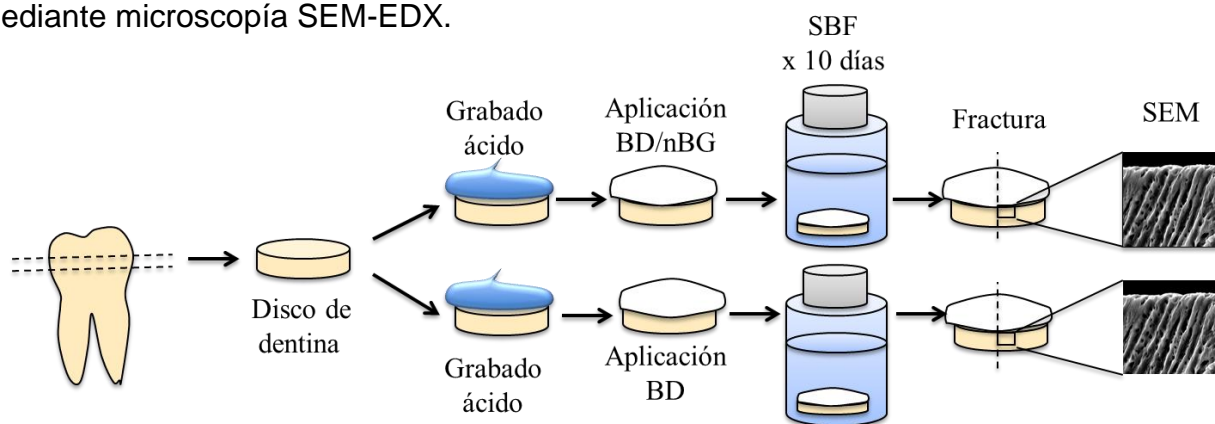


Figura 3. Esquema preparación de muestras ex vivo

RESULTADOS

1. Caracterización de los materiales DRX.

El análisis con DRX de BD, nBG/BD y VI se muestran en la **Figura 4**, la presencia de múltiples peaks muestra que BD y nBG/BD presentan una estructura cristalina a diferencia de VI al ser un material amorfo no muestra ningún peak definido.

En el difractograma de BD se observan peaks definidos para el silicato de calcio, carbonato de calcio, hidróxido de calcio y óxido de zirconio (Camilleri 2013). En el caso del nBG/BD existen peaks similares para los mismos compuestos pero de menor definición. En cuanto a FTIR los análisis se muestran en el rango del espectro de $1200-450\text{ cm}^{-1}$ (**Figura 5**). Se puede observar, tanto para BD como nBG/BD, la existencia de bandas alrededor de $900\text{ y }500\text{ cm}^{-1}$ que se correlacionan a las vibraciones internas de la estructura de silicato de BD (Camilleri 2013). Se identifican bandas a los $700\text{ y }1420\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a enlaces de la estructura del carbonato de calcio.

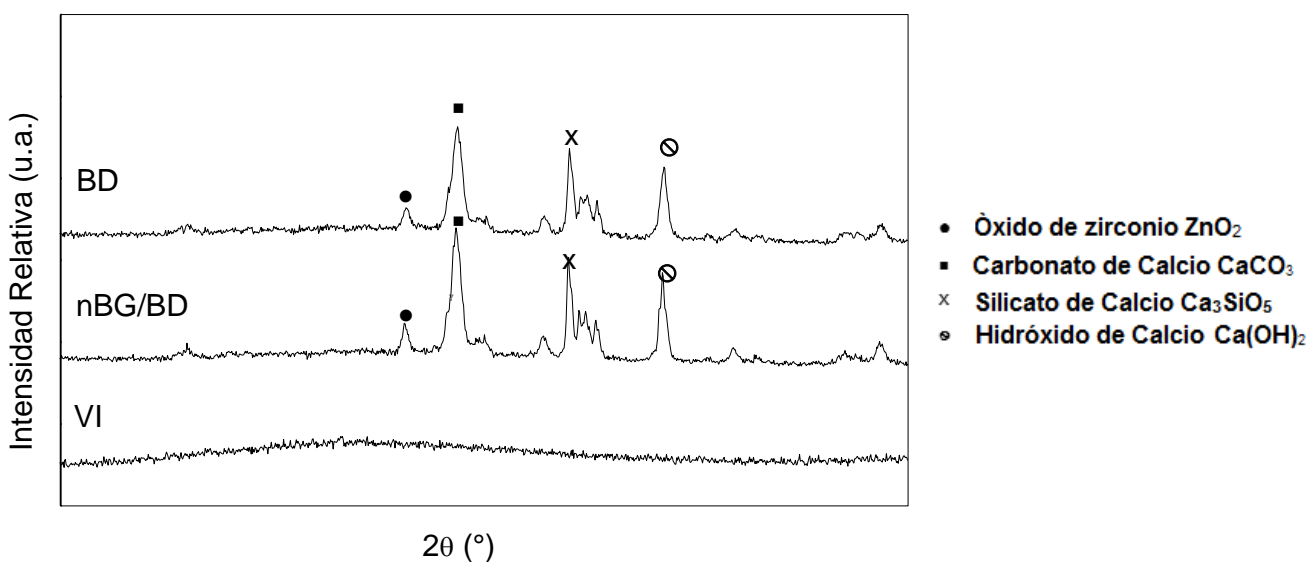


Figura 4. Difractograma de BD, nBG/BD y VI a tiempo 0 (t_0)

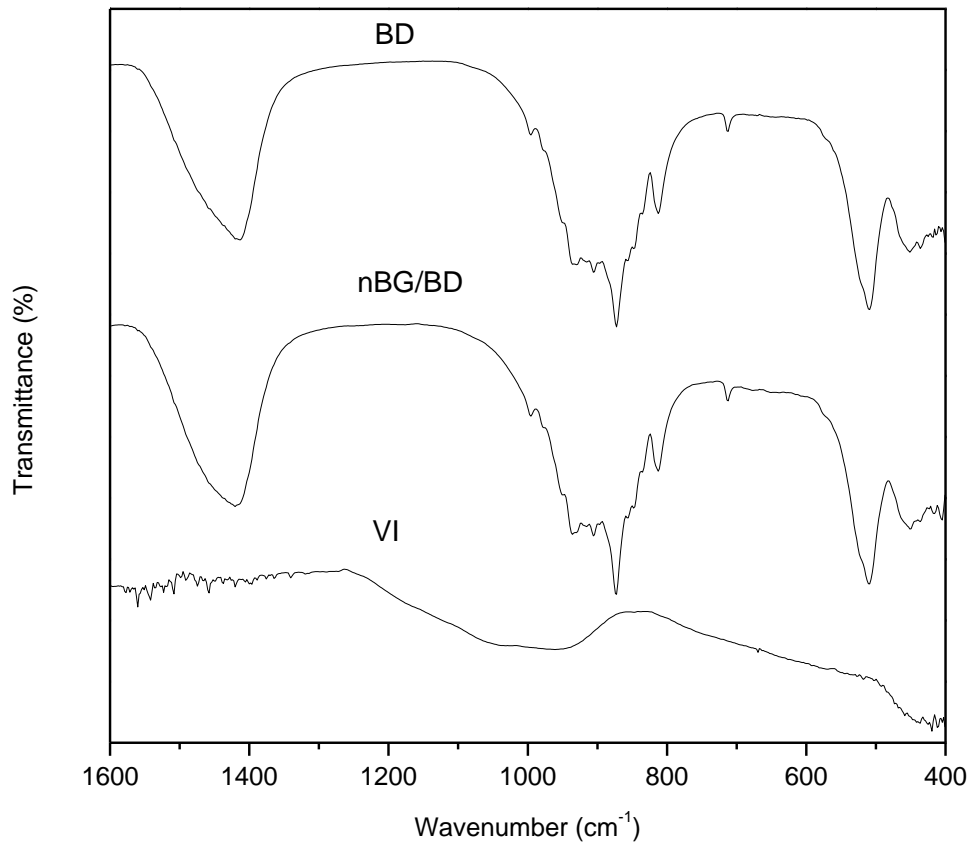


Figura 5. Espectros FTIR de BD, nBG/BD y VI a tiempo 0 (t_0)

2. Bioactividad de nanocompósito.

En la **Figura 6 y 7** se observa el difractograma del análisis de las muestras sumergidas en SBF por 3 y 7 días. Se muestra una disminución en la intensidad de los peaks en las muestras de BD y de nBG/BD, sin embargo a los 7 días para BD se observa un peak a los 25.9 correspondiente al plano 002 de la estructura cristalina de hidroxiapatita (Martínez y Esparza 2008). En el caso de nBG/BD este peak de apatita se hace más evidente a los 3 días de inmersión en SBF. Para VI no se observa la aparición de nuevos peaks.

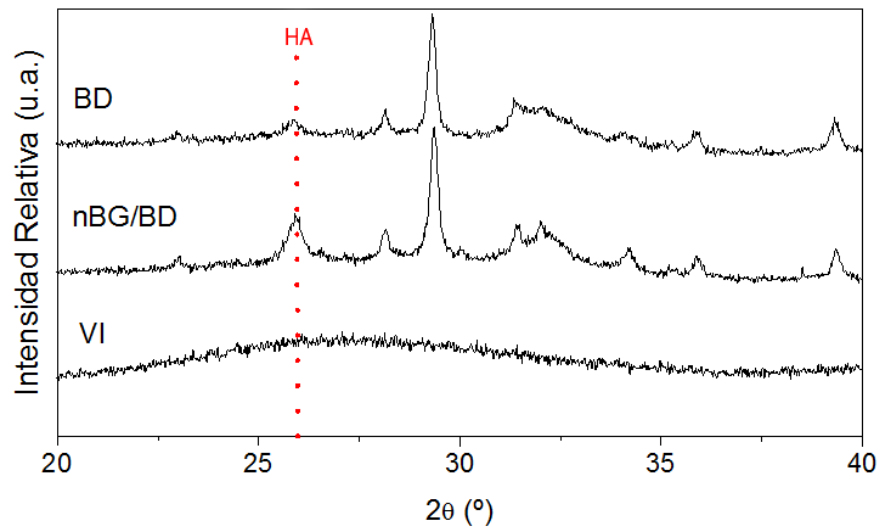


Figura 6. Difractograma de BD, nBG/BD y VI a 3 días de inmersión en SBF (t_3)

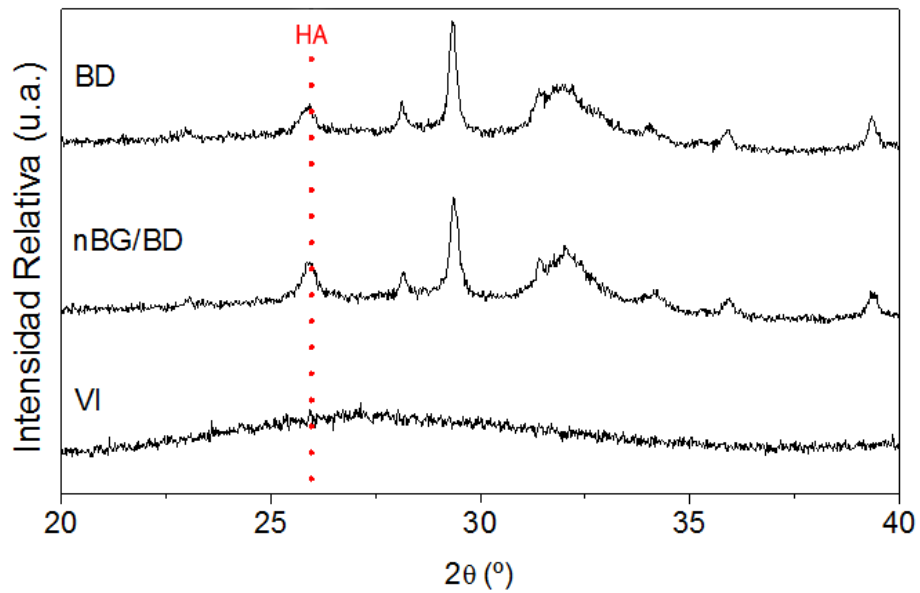


Figura 7. Difractograma de BD, nBG/BD y VI a 7 días de inmersión en SBF (t_7)

En el análisis de FTIR en la **Figura 8 y 9**, se detecta la formación de apatita por los tipos vibracionales de los grupos PO_4 lo que se ve reflejado en bandas características alrededor de 560 , 600 y 1040 cm^{-1} . Después de 3 días de inmersión en SBF no existen cambios significativos para BD, sin embargo, ya existen peaks definidos para nBG/BD entre 560 y 600 cm^{-1} . Después de 7 días hay una desaparición progresiva de los componentes de la matriz de nBG/BD y BD junto con un aumento en la intensidad de las bandas de apatita alrededor de 560 , 600 y 1040 cm^{-1} . (Martínez y Esparza 2008)

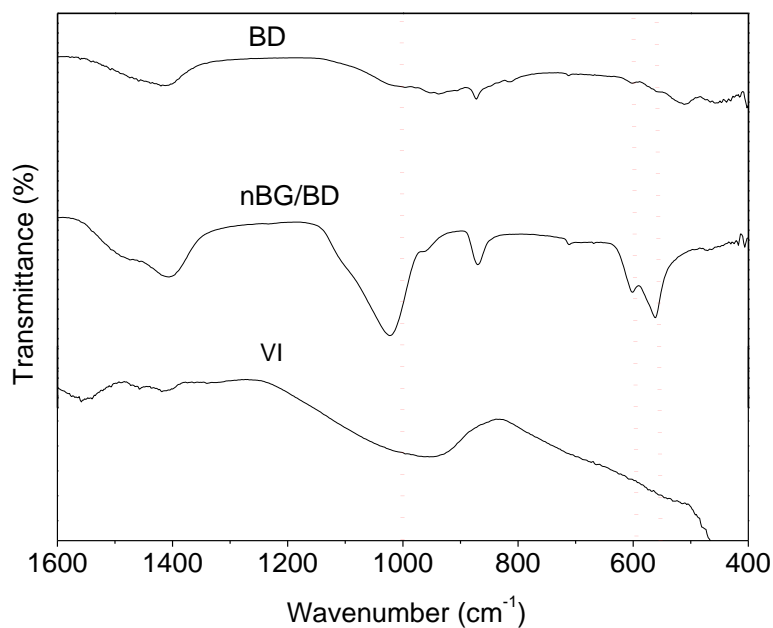


Figura 8. Espectros FTIR de BD, nBG/BD y VI a 3 días de inmersión en SBF (t_3)

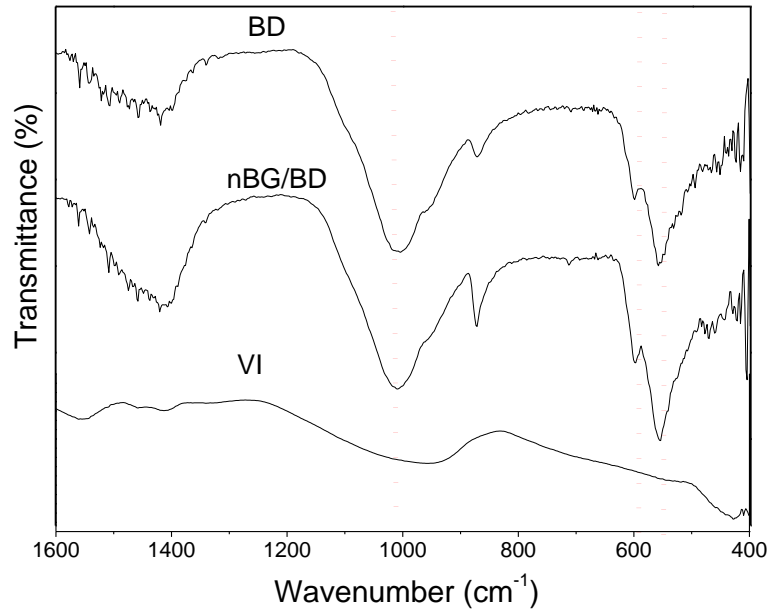


Figura 8. Espectros FTIR BD, nBG/BD y VI luego de 7 días de inmersión en SBF (t_7)

Para verificar la formación de apatita sobre la superficie se utilizó SEM/EDX. Se seleccionó para el análisis la muestra de 3 días de inmersión en SBF en base a los análisis de DRX y FTIR donde se observó mayor diferencia entre nBG/BD y BD. En la figura 10 se observa los depósitos formados sobre la superficie nBG/BD (fig. 10.c fig 10.d) y BD (fig. 10.a; fig.10.b), los que presentan morfología globulares. En el caso de nBG/BD la capa formada sobre la superficie se observa más compacta o densa, características de apatita inducida a partir de vidrio bioactivo. A diferencia en BD los depósitos se encuentran distribuidos de forma dispersa y con menor tamaño. El análisis de la superficie con EDX muestra que la composición de los depósitos minerales son en su mayoría calcio y fósforo junto a otros elementos en pequeñas cantidades. La capa mineral formada en nBG/BD muestra una relación molar Ca/P=1,94 cercana al valor estequiométrico teórico de la hidroxiapatita (Ca/P=1,67) en comparación con BD cuyo valor fue de Ca/P=2,39.

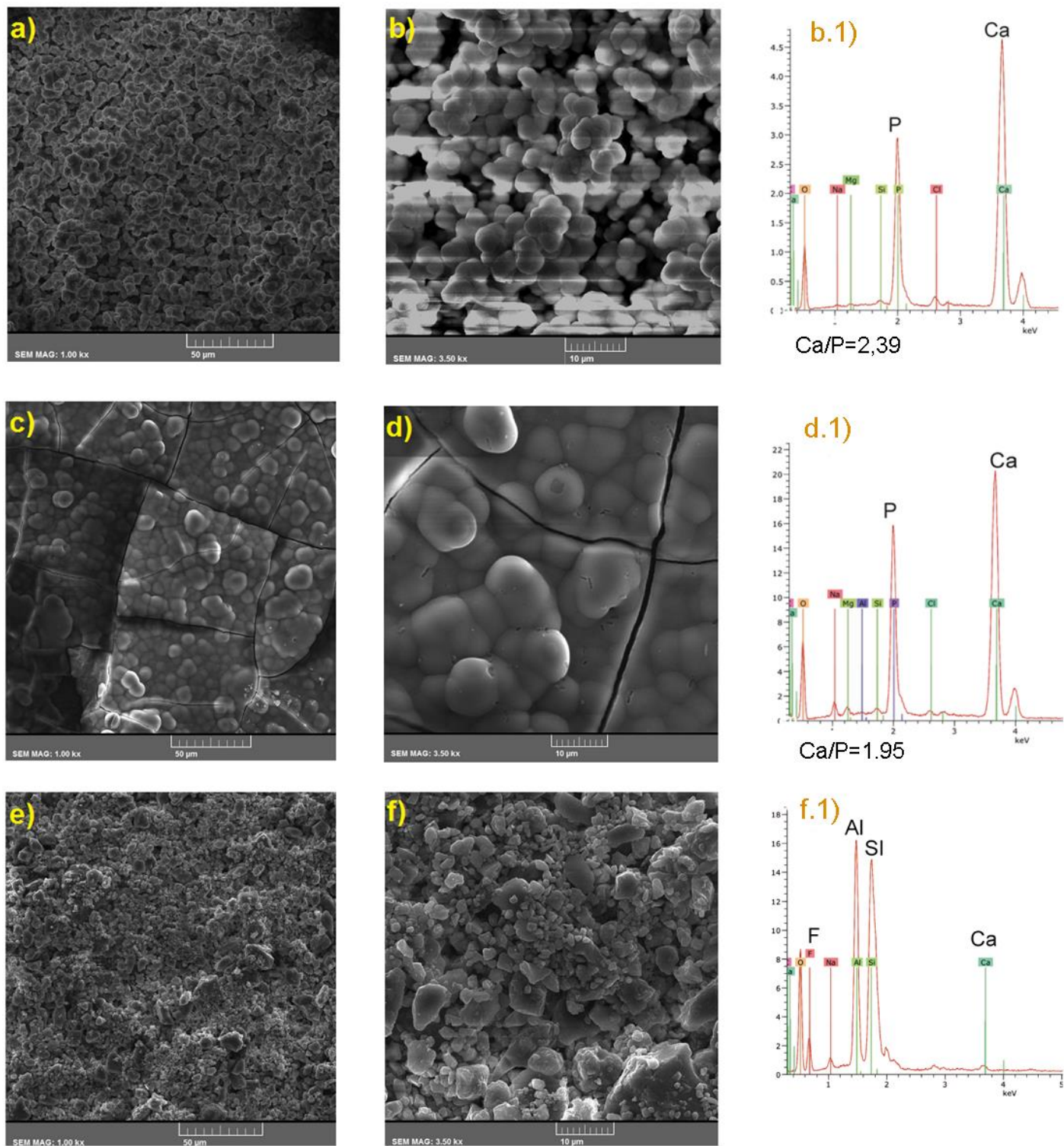


Figura 10. Imágenes SEM de BD (a y b), nBG/BD (c y d) y VI (e y f) a 3 días de inmersión en SBF. EDX de BD (b.1), EDX nBG/BD (d.1) y EDX VI (f.1).

3. Formación de prolongaciones intratubulares ex vivo.

En la **figura 11** se observan imágenes SEM de los discos de dentina fracturados expuestos a BD y nBG/BD. En el disco de dentina expuesto a BD (fig. 11a y 11c), en la interfase con el material se observa la presencia de una fase mineral principalmente en la interface expuesta al material. Para el disco expuesto a nBG/BD (fig. 11b y fig. 11d) se observa una abundante formación mineral tanto en la interfase como hacia el interior, con prolongaciones minerales intratubulares bien definidas. En la figura 12 se muestra el análisis EDX de las prolongaciones minerales dónde se observa importantes contenidos de calcio, fósforo y sílice.

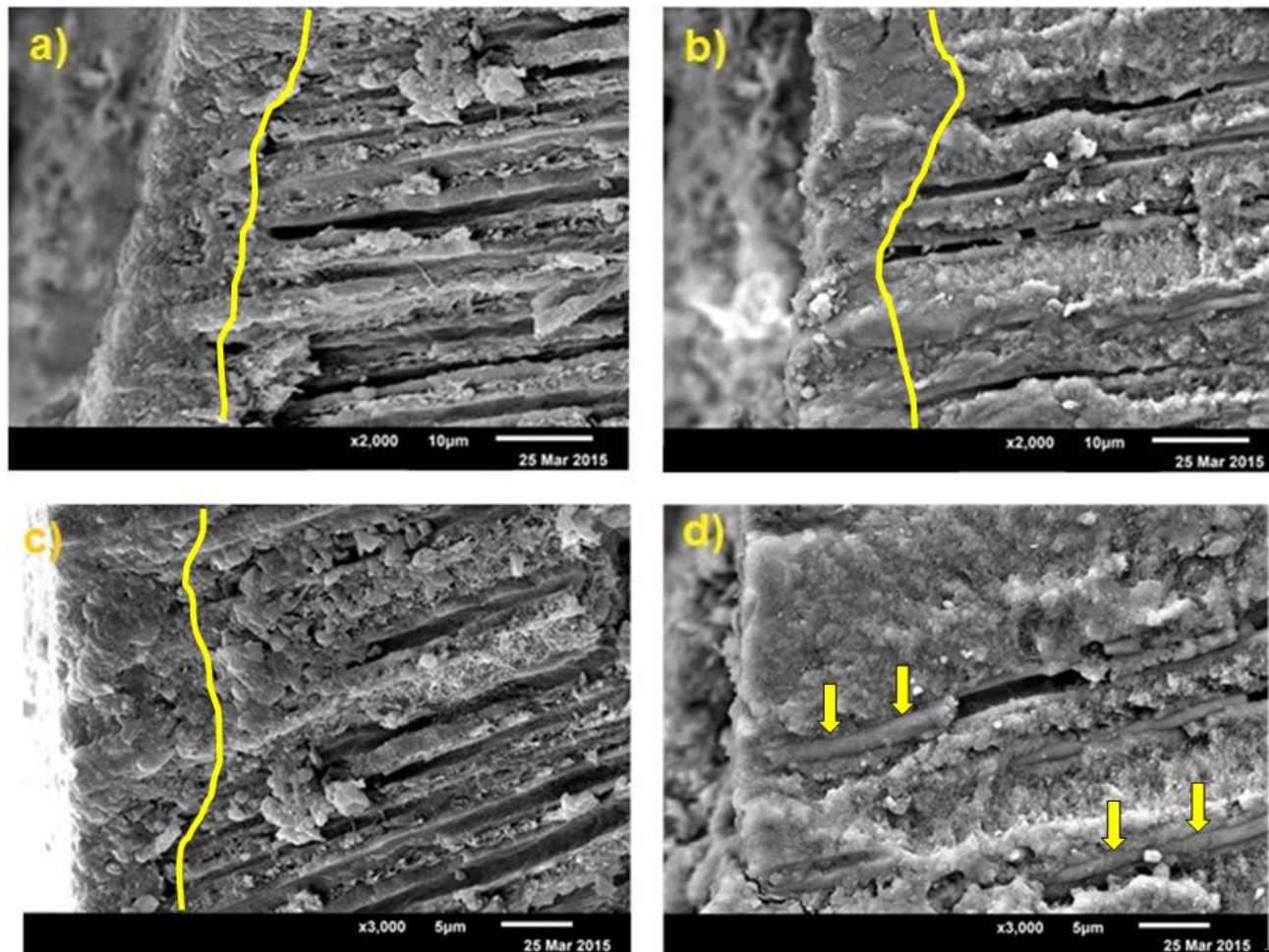


Figura 11. Imágenes SEM BD (a y c) y nBG/BD (b y d) a aumento de 2000x y 3000x en modelos ex vivo después de 10 días de inmersión en SBF.

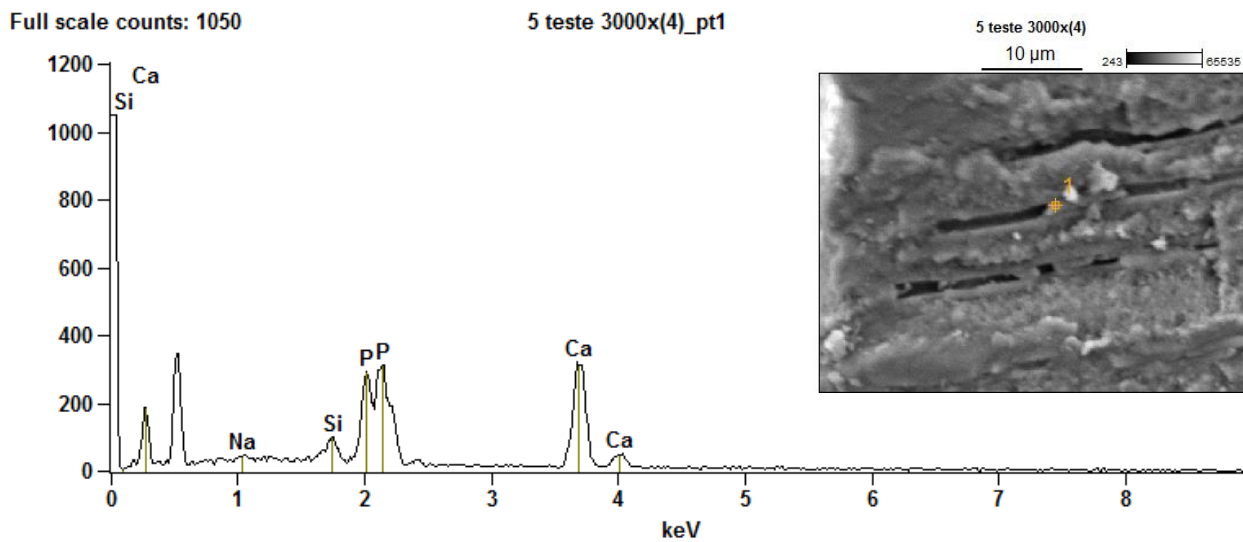


Figura 12. Espectro EDX de tag mineral formado en muestra nBG/BD en modelo ex vivo luego de 10 días de inmersión en SBF

DISCUSIÓN

Al modificar BD con partículas de vidrio bioactivo, estas aceleran la formación de hidroxiapatita *in vitro* y al aplicar el nanocompósito a un modelo *ex vivo* promueve la formación de tags intratubulares en dentina.

La caracterización del nanocompósito se realizó en base al análisis de DRX y FTIR. DRX permite el análisis de materiales con estructura cristalina, esta técnica se basa en identificar el patrón de difracción de rayos X de cada fase cristalina caracterizado por un set de peaks característicos con un ángulo e intensidad específicos (Güven y cols. 2014). En el caso de BD al ser un cemento en base a silicato tricálcico, tiene una estructura cristalina definida que determina un patrón específico en el análisis DRX en contraste a lo que sucede con VI que al poseer estructura amorfa no evidencia ningún peak (Camilleri 2013). En el caso de nBG/BD en contraste a BD existe una disminución en la intensidad de los peaks, ya que el BG tiene una estructura amorfa que no produce reflexión de los rayos X por lo que al agregar nanopartículas a BD modifica su composición cristalina. En cuanto a FTIR nBG/BD exhibe un patrón de bandas similares a BD alrededor de 900 y 500 cm^{-1} que se correlacionan a las vibraciones internas de la estructura de silicato de BD (Camilleri 2013), lo que muestra que al agregar nanopartículas de vidrio bioactivo, no altera la composición química BD.

En las pruebas de bioactividad, los análisis muestran que nBG/BD produce depósitos de apatita sobre su superficie más rápido que BD. Mediante los análisis DRX y FTIR se observó que el material nBG/BD forma hidroxiapatita cristalina a los 3 días de inmersión SBF, lo cual no fue detectado para el cemento BD, ya que este material requirió 7 días para formar una apatita de similar cristalinidad. Al observar las imágenes SEM, la morfología de los depósitos minerales formados en nBG/BD está de acuerdo con la morfología característica reportada para hidroxiapatita inducida por vidrio bioactivo (Brauer 2015). Adicionalmente, la capa mineral formada en nBG/BD muestra una relación molar Ca/P=1,95 más cercana a la razón estequiométrica de la hidroxiapatita cristalina $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (1.67) (Martínez y Esparza 2008) que la observada en los depósitos minerales formados por BD Ca/P=2,39. Tomando en

consideración el análisis estructural, químico y de composición, el nanocompósito nBD/BD posee mejoradas propiedades bioactivas en comparación con BD, considerando que es capaz de inducir en menor tiempo la formación de apatita cristalina.

La mejorada bioactividad de nBG/BD se explica por la incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo a la matriz de BD. Se ha demostrado que los productos de disolución del VB en el SBF generan un pH y composición química en el medio propicio para la formación de hidroxiapatita (Jones 2013). Se provoca un rápido intercambio de Na^+ y/o Ca^{2+} con H^+ desde la solución creando enlaces de silanol (Si-OH) en la superficie del VB, el pH de la solución aumenta y se forman zonas ricas en sílice en relación a la superficie del VB. El aumento del pH permite el ataque de grupos OH^- a la red de sílice propia de VB dejando Si-OH en la interfase VB-SBF. Estos grupos se condensan en la superficie de VB, generando una capa rica en sílice. La migración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} desde la solución hacia la superficie de sílice forma una capa amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ la cual, luego de la incorporación de hidroxilos y carbonatos, se cristaliza permitiendo la formación de hidroxiapatita (Jones 2013). Las nanopartículas de vidrio bioactivo al ser sintetizadas a través de la técnica sol-gel, la red de sílice de VB es modificada por H^+ , reduciendo la conectividad, disminuyendo el tiempo de disolución y bioactividad (Lin 2009). La red de sílice es menos compacta por lo que la liberación de grupos Si-OH es más rápida para la formación de HCA. Al tener partículas de tamaño nanométrico, aumenta el área de superficie de contacto, aumentando también la disolución de partículas y la biomineralización (Ajita y cols. 2015). Esto podría explicar que al ser las partículas de tamaño nanométrico en la matriz de BD la reacción de biomineralización es más rápida al tener mayor superficie de contacto con SBF y por las características propias de las nanopartículas al ser sintetizadas por la técnica sol-gel.

Estudios previos muestran una zona de “infiltración mineral” en la interfase de Biodentine y dentina, la cual es rica en calcio, fosfato y sílice, aumenta al pasar de los días (Han y Okiji 2011). Biodentine al estar en contacto con la superficie dentinaria forma precipitados intratubulares en dentina ricos en fosfato, sílice y calcio lo que genera la formación de estructuras similares a tags intratubulares (Han y Okiji 2013). Estos tags se forman en consecuencia de un efecto caustico alcalino de la hidratación de los silicatos de calcio lo que

degrada el componente colagenoso y facilita la formación de una estructura porosa que facilita la permeabilidad a altas concentraciones de Ca, OH y CO₃ lo que conlleva la mineralización de esta zona (Atmeh y cols. 2012). En el presente estudio se evidencia la formación de una amplia zona de infiltración mineral en el caso del modelo *ex vivo* con BD, sin embargo, al analizar nBG/BD se evidencia la formación de tags intratubulares en dentina lo que no se observa en el caso de BD. Al analizar la composición del tag podemos encontrar principalmente calcio y fósforo lo que coincide con los elementos estructurales de la hidroxiapatita.

Una de las pruebas ampliamente utilizada para probar bioactividad de un material es exponerlo a fluido fisiológico simulado (SBF), el cual corresponde a una solución con concentraciones iónicas similares a las del plasma de la sangre humana. Para que un material sea bioactivo, debe generar una respuesta, formando hidroxiapatita. Se propuso que la formación *in vivo* de apatita puede ser reproducida en un medio acelular con concentraciones de iones similares a las del plasma humano (Kokubo y cols. 1990). Luego se llegó a la conclusión de que un requerimiento esencial para que un material se una a un tejido mineralizado (diente o hueso) en un organismo vivo es que este forme apatita en la superficie y que *in vivo* la formación de apatita pueda ser reproducida en SBF (Kokubo y Takadama 2006). El material a probar, al estar sumergido en este medio, genera un intercambio iónico precipitando hidroxiapatita en su superficie. La bioactividad de un material se puede predecir examinando la formación de apatita en su superficie (Kokubo 1991), no solo cualitativamente sino que cuantitativamente también. Este tipo de prueba contribuye directamente a la disminución de experimentación con animales lo que aporta positivamente y facilita el desarrollo e investigación de los nuevos materiales bioactivos.

Por otro lado, el VI es un cemento en base a agua que se utiliza como material restaurador. Su reacción es de ácido-base que involucra la formación de sales polialquenoato como resultado del ataque ácido al relleno de vidrio fluoroaluminosilicato (Atmeh y cols. 2012). Este material se caracteriza por una constante liberación de iones fluoruro al medio incluso por largos periodos de tiempo lo que se asocia a una disminución de la solubilidad en la estructura del diente, y una disrupción de la actividad bacteriana (Croll y Nicholson 2002). Partiendo de la

base que es un material que tiene una naturaleza acida, es considerado un cemento “autograbante” y que en dentina húmeda genera un intercambio iónico en la interfase. En esta zona de intercambio mineral se forman enlaces entre los grupos carboxilo del ácido polialquenoico y el calcio de la hidroxiapatita del diente, junto a una difusión de iones fluoruro (Farmer y cols. 2014) generando zonas de mineralización en la dentina peritubular (Atmeh y cols. 2012). VI no forma hidroxiapatita, esto se explica por su mecanismo de acción previamente descrito, al no ser un material bioactivo, no reacciona con el medio, por lo que es esperable que no induzca la formación de hidroxiapatita. Distinto a lo que ocurre con BD y nBG/BD que generan una zona de infiltración mineral por una reacción de bioactividad con el fluido dentinario formando tags minerales en la dentina intratubular y provocando una difusión de calcio y silicio desde el material a la dentina.

BD al ser modificado con nanopartículas de vidrio bioactivo demostró que no afecta su composición química inicial, sin embargo, al evaluar su bioactividad se evidencia que genera hidroxiapatita en su superficie con mayor rapidez que BD, esto podría implicar que su uso como protector pulpodentinario de manera directa o indirecta, generaría cambios en la dentina en menor tiempo que BD convencional. La formación de tags intratubulares que se adjudica a nBG/BD podría contribuir de manera directa en el sellado marginal si se decide utilizar como restauración temporal o permanente, ya que genera un contacto íntimo con la dentina incluso en situaciones dónde el control de humedad no es posible, otorgando mayor tiempo de vida útil a la restauración, esto podría probarse en futuros estudios. Las nanopartículas de vidrio bioactivo por si solas, estimulan la diferenciación odontogénica y por ende la formación de dentina, por lo que a futuro podría utilizarse como reparador dentino-pulpar (Wang y cols. 2014). El presente estudio entrega conocimientos preliminares y básicos para el posterior desarrollo de cementos nanocompuestos basados en nBG, considerando sus mejoradas propiedades bioactivas *in vitro* en comparación al actual material comercial.

CONCLUSIONES

- La modificación de Biodentine con nBG no modifica su estructura química, conservando la estructura cristalina característica del cemento comercial.
- La incorporación de nanopartículas de vidrio bioactivo a Biodentine mejora la bioactividad del cemento, permitiendo la formación de una capa de hidroxiapatita sobre la superficie a menor tiempo de inmersión en SBF.
- nBG/BD forma tags intratubulares en dentina lo que podría mejorar el sellado marginal en restauraciones temporales/permanentes y permitir la remineralización de dentina en recubrimientos indirectos.
- Los resultados de este estudio podrían ser la base de futuras modificaciones del material BD para mejorar sus propiedades bioactivas y por ende su rendimiento clínico como material restaurador temporal/permanente, recubrimiento pulpar directo/indirecto y como relleno endodóntico.

REFERENCIAS

Ajita, J., S. Saravanan and N. Selvamurugan (2015). "Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 53: 142-149.

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.

Auschill, T. M., C. A. Koch, M. Wolkewitz, E. Hellwig and N. B. Arweiler (2009). "Occurrence and causing stimuli of postoperative sensitivity in composite restorations." *Oper Dent* 34(1): 3-10.

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.

Brauer, D. S. (2015). "Bioactive glasses-structure and properties." *Angew Chem Int Ed Engl* 54(14): 4160-4181.

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

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

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

Clark, A. E., L. L. Hench and H. A. Paschall (1976). "The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection." *J Biomed Mater Res* 10(2): 161-174.

Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry R. A. Meyers: 10815–10837

Corral, C. M. (2015). Bioactivity of Dentine Substitute Modified With Nanoparticles of Bioactive Glass. IADR General Sessions. Session Senior-Basic Science IADR, International Association for Dental Research (IADR).

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

Daculsi, G., R. Z. LeGeros and D. Mitre (1989). "Crystal dissolution of biological and ceramic apatites." *Calcif Tissue Int* 45(2): 95-103.

Farmer, S. N., S. W. Ludlow, M. E. Donaldson, D. Tantbirojn and A. Versluis (2014). "Microleakage of composite and two types of glass ionomer restorations with saliva contamination at different steps." *Pediatr Dent* 36(1): 14-17.

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.

Gillam, D. G., J. Y. Tang, N. J. Mordan and H. N. Newman (2002). "The effects of a novel Bioglass dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation." *J Oral Rehabil* 29(4): 305-313.

Gjorgievska, E. S., J. W. Nicholson, S. M. Apostolska, N. J. Coleman, S. E. Booth, I. J. Slipper and M. I. Mladenov (2013). "Interfacial properties of three different bioactive dentine substitutes." *Microsc Microanal* 19(6): 1450-1457.

Guyen, Y., E. B. Tuna, M. E. Dincol and O. Aktoren (2014). "X-ray diffraction analysis of MTA-Plus, MTA-Angelus and DiaRoot BioAggregate." *Eur J Dent* 8(2): 211-215.

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.

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

Hench, L. L. (2013). "Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications." *New Journal of Glass and Ceramics* 03(02): 67.

Hong, Z., R. L. Reis and J. F. Mano (2009). "Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 88A(2): 304-313.

Jefferies, S. R., A. E. Fuller and D. W. Boston (2015). "Preliminary Evidence That Bioactive Cements Occlude Artificial Marginal Gaps." *J Esthet Restor Dent* 27(3): 155-166.

Jones, J. R. (2013). "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids." *Acta Biomaterialia* 9(1): 4457-4486.

Kaup, M., E. Schafer and T. Dammaschke (2015). "An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA." *Head Face Med* 11: 16.

Kaur, G., G. Pickrell, N. Sriranganathan, V. Kumar and D. Homa (2015). "Review and the state of the art: Sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.

Kim, H. M., T. Himeno, T. Kokubo and T. Nakamura (2005). "Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid." *Biomaterials* 26(21): 4366-4373.

Kim, H. M., Y. Kim, S. J. Park, C. Rey, H. M. Lee, M. J. Glimcher and J. S. Ko (2000). "Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature." *Biomaterials* 21(11): 1129-1134.

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. (1991). "Bioactive glass ceramics: properties and application." *Biomaterials* 12: 155-163.

Kokubo, T., H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro (1990). "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W." *J Biomed Mater Res* 24(6): 721-734.

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

Koubi, S., H. Elmerini, G. Koubi, H. Tassery and J. Camps (2012). "Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations." *Int J Dent* 2012: 105863.

Landi, E., A. Tampieri, G. Celotti, R. Langenati, M. Sandri and S. Sprio (2005). "Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: dense and porous scaffold development." *Biomaterials* 26(16): 2835-2845.

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, S. (2009). "Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass." *J. Mater. Chem.*

Martínez, A. and H. Esparza (2008). "Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. ." *Superficies y Vacío* 21(4): 18-21.

Masih, S., A. M. Thomas, G. Koshy and J. L. Joshi (2011). "Comparative evaluation of the microleakage of two modified glass ionomer cements on primary molars. An in vivo study." *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 29(2): 135-139.

Mendonca, G., D. B. Mendonca, F. J. Aragao and L. F. Cooper (2008). "Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography." *Biomaterials* 29(28): 3822-3835.

Mjor, I. A. and F. Toffenetti (2000). "Secondary caries: a literature review with case reports." *Quintessence Int* 31(3): 165-179.

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

Niu, L. N., K. Jiao, T. D. Wang, W. Zhang, J. Camilleri, B. E. Bergeron, H. L. Feng, J. Mao, J. H. Chen, D. H. Pashley and F. R. Tay (2014). "A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements." *J Dent* 42(5): 517-533.

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, A. L., J. F. Mano and R. L. Reis (2003). "Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry." *7(Issues 4–5): 309–318.*

Oonishi, H., L. L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, M. Matsuura, S. Kin, T. Yamamoto and S. Mizokawa (2000). "Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite." *J Biomed Mater Res* 51(1): 37-46.

Parirokh, M. and M. Torabinejad (2010). "Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties." *J Endod* 36(1): 16-27.

Parirokh, M. and M. Torabinejad (2010). "Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action." *J Endod* 36(3): 400-413.

Pashley, D. H., E. L. Pashley, R. M. Carvalho and F. R. Tay (2002). "The effects of dentin permeability in restorative dentistry." *Dental Clinics of North America* 46(2): 211-245.

Priyalakshmi, S. and R. Manish (2014). "Review on Biodentine-A Bioactive Dentin Substitute." *Journal of Dental American Science* 13(1): 13-17.

Rahaman, M. N., D. E. Day, B. S. Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald and A. P. Tomsia (2011). "Bioactive glass in tissue engineering." *Acta Biomater* 7(6): 2355-2373.

Raju, V. G., N. R. Venumbaka, J. Mungara, P. Vijayakumar, S. Rajendran and A. Elangovan (2014). "Comparative evaluation of shear bond strength and microleakage of tricalcium silicate-based restorative material and radioopaque posterior glass ionomer restorative cement in primary and permanent teeth: an in vitro study." *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 32(4): 304-310.

Sanosh, K. P., A. Min-Cheol Chu, Balakrishnan, T. N. Yong-Jin Lee and S.-J. C. Kim (2009). "Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle." *Current Applied Physics* 9(6).

Septodont "Biodentine, Active Biosilicate Technology Package insert.

Septodont. "Biodentine™ Active Biosilicate Technology™." Retrieved 2/Marzo/2014, 2014, from <http://www.septodontusa.com/sites/default/files/Biodentine.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.

Sun, J. (1998). "Structure Control of SiO₂ Sol-Gels via Addition of PEG." 118: 617–624.

Suvorova, E. I., F. Christensson, H. E. Lundager Madsen and A. A. Chernov (1998). "Terrestrial and space-grown HAP and OCP crystals: effect of growth conditions on perfection and morphology." *J Cryst Growth* 186(1-2): 262-274.

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.

Valenzuela, F., C. Covarrubias, C. Martinez, P. Smith, M. Diaz-Dosque and M. Yazdani-Pedram (2012). "Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles." *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 100B(6): 1672-1682.

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.

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

Wang, S., X. Gao, W. Gong, Z. Zhang, X. Chen and Y. Dong (2014). "Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction." *Acta Biomater* 10(6): 2792-2803.

Wang, Z., T. Jiang, S. Sauro, D. H. Pashley, M. Toledano, R. Osorio, S. Liang, W. Xing, Y. Sa and Y. Wang (2011). "The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: an in vitro study." *Aust Dent J* 56(4): 372-381.

Wiegand, A., W. Buchalla and T. Attin (2007). "Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation." *Dent Mater* 23(3): 343-362.

Wiltbank, K. B., S. A. Schwartz and W. G. Schindler (2007). "Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement." *J Endod* 33(10): 1235-1238.

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.

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.