



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**Evaluación in vitro de la citotoxicidad de dos medicaciones intraconducto,  
UltraCal™ XS y Bio-C® Temp sobre la línea celular L929**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A

M.E CONSTANZA ROMO SILVA

**TUTORA:** Dra. EILEEN URIBE QUEROL  
**ASESORES:** Dr. MARIANO GARCÍA MARTÍNEZ  
CDEE. CARLOS TINAJERO MORALES

MÉXICO, Cd. Mx.

SEPTIEMBRE, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Evaluación in vitro de la citotoxicidad de dos medicaciones intraconducto, UltraCal™ XS y Bio-C® Temp sobre la línea celular L929

Constanza Romo Silva<sup>1</sup>, Mariano García Martínez<sup>2</sup>, Carlos Tinajero Morales<sup>1</sup> y Eileen Uribe-Querol<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Endodoncia. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Preclínica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología del Desarrollo. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México

### Resumen

**Introducción:** Los materiales usados en endodoncia deben tener un alto grado de biocompatibilidad para evitar complicaciones en el tratamiento y daño a los tejidos periapicales. Uno de estos materiales son las medicaciones intraconducto. **Objetivo:** Comparar la citotoxicidad de dos medicaciones intraconducto, el UltraCal™ XS y el Bio-C® Temp. **Materiales y Métodos:** Para evaluar cambios morfológicos se usó microscopía del luz. La citotoxicidad se evaluó usando la técnica de sulforrodamina B en cultivos de fibroblastos de la línea celular L929. Los medios condicionados se obtuvieron de cada medicación en medio DMEM incubados por 1, 24, 46 y 72 horas. **Resultados:** El Bio-C® Temp y el UltraCal™ XS no alteran la sobrevivencia de los fibroblastos. El Bio-C® Temp promueve la proliferación de fibroblastos. La viabilidad celular de ambas medicaciones fue muy similar al control de medio de cultivo. Las alteraciones morfológicas se relacionan con proliferación celular y diferenciación, mas no de muerte celular. **Conclusiones:** El Bio-C® Temp y el UltraCal™ XS promueven la proliferación de fibroblastos. El UltraCal™ XS promueve la diferenciación de fibroblastos. Ambas medicaciones son materiales biocompatibles

**Palabras clave:** medicación intraconducto, hidróxido de calcio, biocerámicos, citotoxicidad, sulforrodamina B, morfología celular.

### Abstract

**Introduction:** Materials used in root canal treatments must have a high degree of biocompatibility. These treatments avoid complications and damage to periapical tissues. Intracanal medications are some of these materials. **Objective:** Compare the cytotoxicity of two intracanal medications, UltraCal™ XS and Bio-C® Temp. **Materials and Methods:** Morphological changes were evaluated using light microscopy. Cytotoxicity was evaluated using the sulforhodamine B technique in fibroblast cultures of the L929 cell line. Conditioned media from each medication in DMEM media was incubated for 1, 24, 46, and 72 hours. **Results:** Bio-C® Temp and UltraCal™ XS do not alter the survival of fibroblasts. Bio-C® Temp promotes the destruction of fibroblasts. The cell viability of both medications was very similar to the culture medium control. Morphological alterations are related to cell destruction and differentiation but not cell death. **Conclusions:** Bio-C® Temp and UltraCal™ XS promote the destruction of fibroblasts. The UltraCal™ XS tests for fibroblast differentiation. Both medications are biocompatible materials.

**Keywords:** intracanal medication, calcium hydroxide, bioceramics, cytotoxicity, sulforhodamine B, cell morphology.

## Introducción

El tratamiento de endodoncia o de conductos es un procedimiento que se realiza para eliminar el tejido orgánico, la pulpa dental infectada y las bacterias del sistema de conductos radiculares. Este tratamiento requiere de una instrumentación mecánica asociada a una abundante irrigación antiséptica, que, después de secar el conducto, se obtura tridimensionalmente (1). El tratamiento de conductos se puede realizar en una sesión clínica (1–3). Sin embargo, cuando esto no es posible, ya que exista exudado o una lesión periapical con o sin sintomatología, se puede emplear una medicación intraconducto entre sesiones. Las medicaciones tienen el objetivo de complementar los efectos antibacterianos de la instrumentación mecánica y de la irrigación antiséptica (2,4–8), con el propósito de destruir los microorganismos restantes y prevenir una reinfección (1,9,10). La medicación requiere tiempo para que su efecto antibacteriano destruya a las bacterias ubicadas en complejidades anatómicas de los conductos radiculares lo que no puede lograrse en una sesión clínica (10). A pesar de la eficacia de las medicaciones intraconducto, su uso es un tema muy controversial en el área de endodoncia.

El hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) es la medicación intraconducto más utilizada (9). Presenta un pH alcalino aproximadamente de 12.8 (11). En una disolución acuosa se disocia en iones calcio e hidroxilo, mismos que son responsables de muchas de sus propiedades biológicas, tales como su acción antimicrobiana, su capacidad de inactivar endotoxinas bacterianas y su promoción en la deposición de tejido mineralizado (9,11,12). A pesar de estas propiedades, el  $\text{Ca(OH)}_2$  no cuenta con características físicas satisfactorias como radiopacidad para visualizarse radiográficamente y una adecuada fluidez para facilitar su inserción dentro de los conductos radiculares, por estos motivos es necesaria la incorporación de un agente radiopacificador y un vehículo que mejore su inserción. Aunque el  $\text{Ca(OH)}_2$  presenta una excelente biocompatibilidad, la adición de otras sustancias pueden afectar sus propiedades biológicas (5). Debido a su pH alto, el  $\text{Ca(OH)}_2$  es potencialmente tóxico y puede causar destrucción de tejidos blandos en dosis elevadas. Este problema puede provocar inflamación crónica y necrosis (2). Blomlof y colaboradores observaron que el  $\text{Ca(OH)}_2$  tiene un efecto perjudicial sobre los tejidos periodontales cuando se usa como medicación intraconducto, retrasando la cicatrización de los tejidos (12). Además, Breault y colaboradores demostraron que el uso de  $\text{Ca(OH)}_2$  promueve una inhibición en la adhesión de los fibroblastos gingivales humanos, por lo que propone que el  $\text{Ca(OH)}_2$  debería evitarse como medicación intraconducto (13). Contrariamente, Hammarstrom y colaboradores demostraron que el hidróxido de calcio no afectó la curación en dientes reimplantados de monos y perros (14).

El UltraCal™ XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA.) (15) es una medicación intraconducto a base de hidróxido de calcio al 35% con un pH de 12.5, con sulfato bórico y una matriz acuosa de metilcelulosa. Libera iones calcio e hidroxilo, posee actividad antimicrobiana, inactiva lipopolisacáridos bacterianos e induce mineralización (16). Existe poca evidencia de que el UltraCal™ XS no es tóxico. En un estudio *in vitro* se analizó el efecto directo del UltraCal™ XS, en células troncales de la papila apical y se observó que el material no presentó

efectos perjudiciales sobre las células en ninguna concentración analizada y, por el contrario, promovió la supervivencia celular (5). Resultados similares se encontraron en un estudio realizado en tejido subcutáneo de rata a los 30 días (17).

Recientemente, los materiales biocerámicos también se usan como medicaciones intraconducto. Los biocerámicos son compuestos cerámicos que poseen alúmina, zirconia, vitrocerámica, hidroxiapatita, fosfatos de calcio reabsorbibles, entre otros (18,19). En varios estudios se han mostrado propiedades de biocompatibilidad debido a su similitud con la hidroxiapatita, con actividad osteoconductora intrínseca, capacidad de inducir respuestas regenerativas en contacto con el hueso y estimular la regeneración de tejidos naturales y no son citotóxicos. Además, presentan estabilidad dimensional, sellado hermético, enlaces químicos con la estructura dental, buena radiopacidad y propiedades antibacterianas (18,19). Los biocerámicos se han utilizado en odontología en defectos óseos, obturación apical, sellado de perforaciones, cementos en endodoncia y como auxiliares en la regeneración (20,21).

El Bio-C® Temp (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brazil) (22) es una nueva pasta biocerámica indicada como medicación intraconducto en el tratamiento endodóncico de dientes con lesiones periapicales, retratamientos, perforaciones, reabsorciones externas e internas, rizogénesis incompleta y en pulpotomías (23). Presenta un pH alcalino y sus componentes son: silicato de calcio, aluminato de calcio, óxido de calcio y tungstato de calcio, en una mezcla de salicilato de éster glicol y polietilenglicol, óxido de titanio como radiopacificante y otros agentes suplementarios (23). Existen pocos estudios *in vitro* donde se ha evaluado la viabilidad celular del Bio-C® Temp, utilizando diversos cultivos celulares y el ensayo de viabilidad por MTT (11,16,23,24). La viabilidad celular del Bio-C® Temp fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Es decir, a mayor concentración, mayor citotoxicidad y en todos los estudios presentó una viabilidad celular mayor al 60% cuando se encontraba en diluciones más altas (11,16,23,24).

Idealmente, las medicaciones intraconducto deben poseer baja toxicidad y alta biocompatibilidad porque pueden atravesar fácilmente el ápice y entrar en contacto con los tejidos periapicales. En caso de toxicidad, pueden causar inflamación y retrasar la cicatrización del tejido (2). La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para funcionar en una aplicación específica en ausencia de reacciones alérgicas o inmunitarias del hospedero (18). Para conocer el grado de biocompatibilidad de materiales y dispositivos médicos se usa la norma ISO 10993-5:2009 para su uso clínico (25). Esta norma se basa en la guía para evaluación biológica preclínica de materiales y dispositivos médicos (25). Por lo tanto, es fundamental evaluar la biocompatibilidad de estos productos (2,18,26).

En este estudio, decidimos analizar la citotoxicidad del UltraCal™ XS y el Bio-C® Temp por medio de la técnica *in vitro* de sulforrodamina (anexo C de la norma ISO 10993-5:2009) (25). La sulforrodamina B determina la densidad celular con base en la cantidad de proteína celular.

## Materiales y Métodos

### 1.- Materiales utilizados como medicación intraconducto.

Las medicaciones intraconducto, UltraCal™ XS, pasta a base de hidróxido de calcio y Bio-C® Temp, pasta a base de silicatos cálcicos, fueron utilizadas para evaluar y comparar su citotoxicidad. Ambas medicaciones intraconducto se manejan en presentaciones de jeringas (Tabla 1). En una balanza analítica, se pesaron 0.125 gramos de cada medicación intraconducto que se utilizó, para cada elución de medio. El medio de cultivo DMEM fue utilizado como medio de elución y como control negativo y el Accocit (cisplatino) como control positivo de citotoxicidad.

Tabla 1. Medicación intraconducto, composición y fabricante

Medicación Intraconducto	Composición	Fabricante
<b>Bio-C® Temp</b>	El Bio-C® Temp es una pasta biocerámica usada como medicación intraconducto. Sus componentes son: silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de calcio, tungstato de calcio, óxido de titanio, base resinosa y polietilenglicol. Presentación en jeringa lista para su uso.	Angelus Industria de Productos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brazil.
<b>UltraCal™ XS</b>	UltraCal™ XS es una pasta usada como medicación intraconducto. Sus componentes son: hidróxido de calcio al 35%, sulfato bórico y una matriz acuosa de metilcelulosa. Es radiopaca y tiene un pH de 12.5. Presentación en jeringa lista para su uso	Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo. Suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio.	GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY, USA
<b>Accocit</b>	Solución inyectable 50 mg/mL: Inhibe la síntesis del DNA produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de DNA. La síntesis de proteínas y RNA es inhibida en menor grado	ACCORD Farma, S.A. de C.V.

### 2.- Preparación de las medicaciones.

Las medicaciones intraconducto se prepararon con base en las instrucciones de cada fabricante. Ambas medicaciones se empacan listas para su uso.

### 3.- Medios condicionados de los materiales.

Los medios condicionados se obtuvieron siguiendo la norma ISO 10993-5:2009 (Organización Internacional de Estandarización 2009). Breve descripción de la preparación de los medios: Las medicaciones fueron manejadas bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar, todos los materiales fueron esterilizados utilizando luz ultravioleta por 15 minutos. En tubos Eppendorf, se colocaron 0.125 g

de las medicaciones intraconducto en medio de cultivo DMEM y se colocaron en una incubadora (Nuair<sup>TM</sup>, Plymouth, USA) a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Los medios de retiraron a los tiempos establecidos de 1, 24, 48 y 72 horas. Los medios condicionados se centrifugaron a 10,000 rpm durante dos minutos y el sobrenadante se usó inmediatamente. Los medios condicionados para el UltraCal<sup>TM</sup> XS y el Bio-C<sup>®</sup> Temp fueron recolectados a las 1, 24, 48 y 72 horas. El DMEM (control negativo) fue recolectado a las 24, 48 y 72 horas (Tabla 2).

**Tabla 2. Medios condicionados**

Condición	Tiempos			
	1 h	24 h	48 h	72 h
Bio-C <sup>®</sup> Temp	1 h	24 h	48 h	72 h
DMEM (Control para Bio-C <sup>®</sup> Temp)	Medio fresco	24 h	48 h	72 h
UltraCal <sup>TM</sup> XS	1 h	24 h	48 h	72 h
DMEM (Control para UltraCal <sup>TM</sup> XS)	Medio fresco	24 h	48 h	72 h

#### 4.- Línea celular

En este ensayo se utilizaron fibroblastos de ratón de la línea celular L929 (ATCC: CCL-1).

#### 5.- Cultivo celular

La proliferación celular se realizó bajo las condiciones estándares de cultivo (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) en la incubadora (INCC-UNIPREC-01) hasta que el cultivo celular alcanzó un 80-90% de confluencia en la superficie de cultivo. El medio de cultivo fue DMEM suplementado.

#### 6.- Ensayo de citotoxicidad

En una placa de cultivo de 96 pozos (Corning Inc., Corning, NY), 20,000 fibroblastos por pozo fueron sembrados de medio DMEM suplementado. Los cultivos se mantuvieron en un incubador durante 24 h a 37 °C, 95 % de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. Este tiempo es el necesario para permitir que los fibroblastos se adhirieran a los pozos. Pasado este tiempo, se removieron 10 µL del medio de cultivo y se agregaron 10 µL del sobrenadante de los medios condicionados. (dilución 1:10 del sobrenadante de los medios condicionados) a cada pozo previamente etiquetado con las medicaciones y los tiempos correspondientes (Figura 1). Cada medicación y tiempo fue preparado por triplicado y realizado dos veces. Como control positivo de citotoxicidad se empleó Accocit en varias concentraciones desde 0.1 µg/mL hasta 100 µg/mL. Como control negativo se utilizó DMEM suplementado (Figura 1). Una vez adicionados los medios condicionados, la placa se incubó por 24 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM 0h	DMEM 0h	DMEM 0h	Accocit 0.1 µg/mL	Accocit 0.1 µg/mL	Accocit 0.1 µg/mL	DMEM 0h	DMEM 0h	DMEM 0h	Accocit 0.1 µg/mL	Accocit 0.1 µg/mL	Accocit 0.1 µg/mL
B	DMEM 24h	DMEM 24h	DMEM 24h	Accocit 1 µg/mL	Accocit 1 µg/mL	Accocit 1 µg/mL	DMEM 24h	DMEM 24h	DMEM 24h	Accocit 1 µg/mL	Accocit 1 µg/mL	Accocit 1 µg/mL
C	DMEM 48h	DMEM 48h	DMEM 48h	Accocit 10 µg/mL	Accocit 10 µg/mL	Accocit 10 µg/mL	DMEM 48h	DMEM 48h	DMEM 48h	Accocit 10 µg/mL	Accocit 10 µg/mL	Accocit 10 µg/mL
D	DMEM 72h	DMEM 72h	DMEM 72h	Accocit 100 µg/mL	Accocit 100 µg/mL	Accocit 100 µg/mL	DMEM 72h	DMEM 72h	DMEM 72h	Accocit 100 µg/mL	Accocit 100 µg/mL	Accocit 100 µg/mL
E	UltraCal XS 1h	UltraCal XS 1h	UltraCal XS 1h	Bio-C Temp 1h	Bio-C Temp 1h	Bio-C Temp 1h	UltraCal XS 1h	UltraCal XS 1h	UltraCal XS 1h	Bio-C Temp 1h	Bio-C Temp 1h	Bio-C Temp 1h
F	UltraCal XS 24h	UltraCal XS 24h	UltraCal XS 24h	Bio-C Temp 24h	Bio-C Temp 24h	Bio-C Temp 24h	UltraCal XS 24h	UltraCal XS 24h	UltraCal XS 24h	Bio-C Temp 24h	Bio-C Temp 24h	Bio-C Temp 24h
G	UltraCal XS 48h	UltraCal XS 48h	UltraCal XS 48h	Bio-C Temp 48h	Bio-C Temp 48h	Bio-C Temp 48h	UltraCal XS 48h	UltraCal XS 48h	UltraCal XS 48h	Bio-C Temp 48h	Bio-C Temp 48h	Bio-C Temp 48h
H	UltraCal XS 72h	UltraCal XS 72h	UltraCal XS 72h	Bio-C Temp 72h	Bio-C Temp 72h	Bio-C Temp 72h	UltraCal XS 72h	UltraCal XS 72h	UltraCal XS 72h	Bio-C Temp 72h	Bio-C Temp 72h	Bio-C Temp 72h

**Figura 1. Diseño de placa de 96 pozos para prueba de citotoxicidad.** Representación de una placa de cultivo de 96 pozos. En cada coordenada de la placa se muestra la medicación, y los controles a las diferentes horas.

## 7.- Morfología celular

Después de permanecer con las medicaciones 24 h, la morfología celular se evaluó con un microscopio de luz IX70 Olympus (Center Valley, PA, USA) y fotografías en las diferentes condiciones fueron tomadas. La revisión microscópica de las monocapas celulares fue evaluada para determinar su grado de citotoxicidad.

De acuerdo con la norma ISO 10933-5:2009 un producto es citotóxico si presenta una disminución de la viabilidad mayor al 30%. El grado de citotoxicidad se evalúa considerando el grado y la reactividad (Tabla 3).



**Tabla 3. Grados de citotoxicidad y reactividad**

Grado	Reactividad	Condiciones del cultivo
0	Ninguna	Discretos gránulos intracitoplasmáticos, no hay lisis celular, no existe reducción del crecimiento celular.
1	Insignificante	No más del 20% de las células son redondas opacas, pérdida de anclaje y sin gránulos intracitoplasmáticos o cambios en la morfología. Ocasionalmente se presenta lisis celular y ligera inhibición del crecimiento celular.
2	Leve	No más del 50% de las células son redondas y no más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
3	Moderada	No más del 70% de las células son redondas o están lisadas y no se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
4	Severa	Casi completa o completa destrucción de las células.

## 8.- Ensayo de sulforrodamina

El ensayo de sulforrodamina B se basa en la capacidad de la sulforrodamina para unirse a los componentes proteicos de las células. En este caso a las proteínas de los fibroblastos que siguen unidos a las placas de cultivo. La sulforrodamina es un colorante de aminoxanteno de color rosa brillante con dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos básicos en condiciones ácidas y se disocian en condiciones básicas. Como la unión de sulforrodamina es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. El colorante puede ser detectado a una longitud de onda de 570 nm lo que permite que se pueda detectar en un lector de placas (27).

Este procedimiento se realizó conforme a la norma de operación para la prueba de actividad citotóxica "PNOAC-UNAM-UNIPREC-01". Después de determinar el grado de citotoxicidad en las observaciones al microscopio, se adicionaron 50 µL de la solución de sulforrodamina al 0.4% a cada uno de los pozos y la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de colorante lavando la placa 5 veces con ácido acético al 1%. La placa se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente. El colorante restante se solubilizó añadiendo Tris base 10 mM (pH 10.5) dejando reposar por 5 minutos. La absorbancia se leyó en un lector de placas (LEIN-UNIPREC-01 o LECC-UNIPREC-01) a una longitud de onda de 570 nm.

## 9.- Estadística

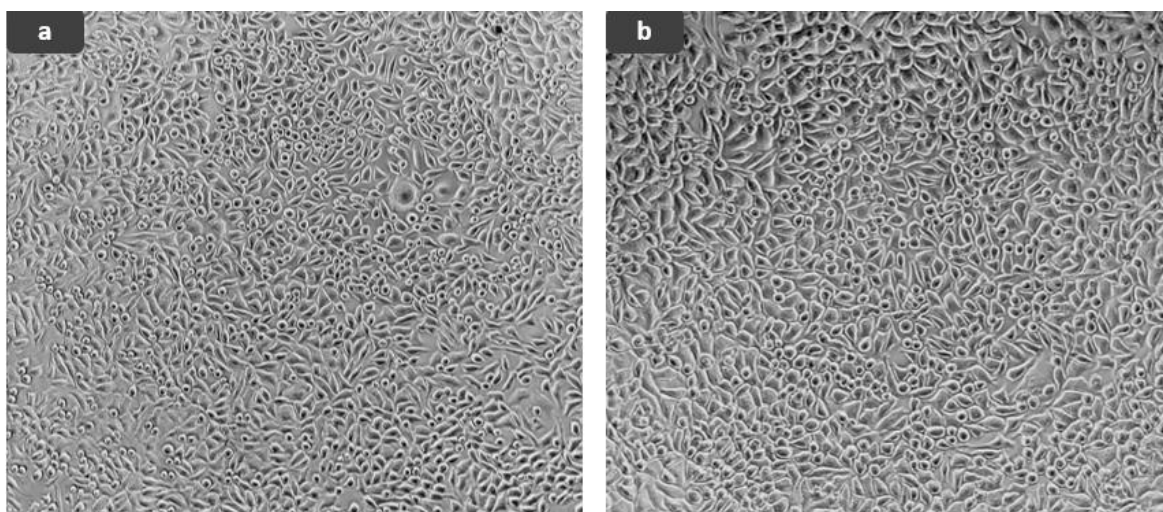
La comparación entre las diferentes condiciones de cada medicación y los controles se realizó haciendo un análisis de varianza ANOVA, con prueba posthoc de Tukey (KaleidaGraph Versión 4.5).

## Resultados

### Morfología celular: Grado de citotoxicidad y reactividad

Control negativo: El cultivo de los fibroblastos se realizó en medio DMEM que no es citotóxico

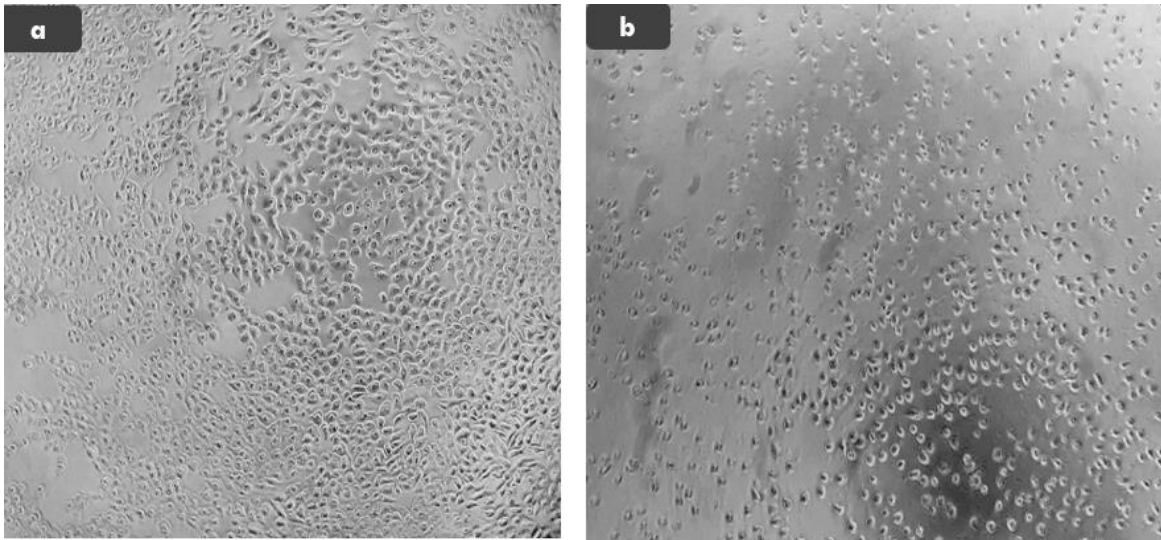
Para evaluar el grado de citotoxicidad se usó la escala de la tabla 3. Los fibroblastos incubados sólo con medio de cultivo DMEM fueron usados como control negativo en cada tiempo. Los fibroblastos incubados en DMEM fresco, por 24, 48 y 72 h no presentaron citotoxicidad. En este estado, las células tienen un grado 0 de citotoxicidad y reactividad ninguna (Figura 2). Los fibroblastos presentan una morfología triangular y mantienen una monocapa de células confluentes en todos los tiempos evaluados (Figura 2). La morfología de los fibroblastos no muestra ninguna alteración en ninguno de los tiempos (Figura 2).



**Figura 2. Morfología celular de fibroblastos de la línea celular L929 incubados medio de cultivo DMEM a las 24 h (a) y a las 72 h (b).**

Control positivo: El Accocit alteró la morfología celular en todas las concentraciones

Los fibroblastos L929 incubados con Accocit en concentraciones desde 0.1  $\mu\text{g/mL}$  hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  presentaron cambios en su morfología celular (Figura 3). Para evaluar el grado de citotoxicidad se usó la escala de la tabla 3. Con la concentración más baja de Accocit, la confluencia de la monocapa se perdió; aproximadamente el 20% se han despegado del pozo. Además, los fibroblastos aunque conservan su morfología, se ven opacos y con gránulos negros. Esto corresponde a un grado 1 y reactividad insignificante (Figura 3). El grado y la severidad aumentan con la concentración de Accocit. En la concentración más alta, más del 70% de los fibroblastos muestran una morfología redonda y se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular, por lo que en estas condiciones, los fibroblastos presentan un grado 4 de citotoxicidad y reactividad severa (Figura 3).



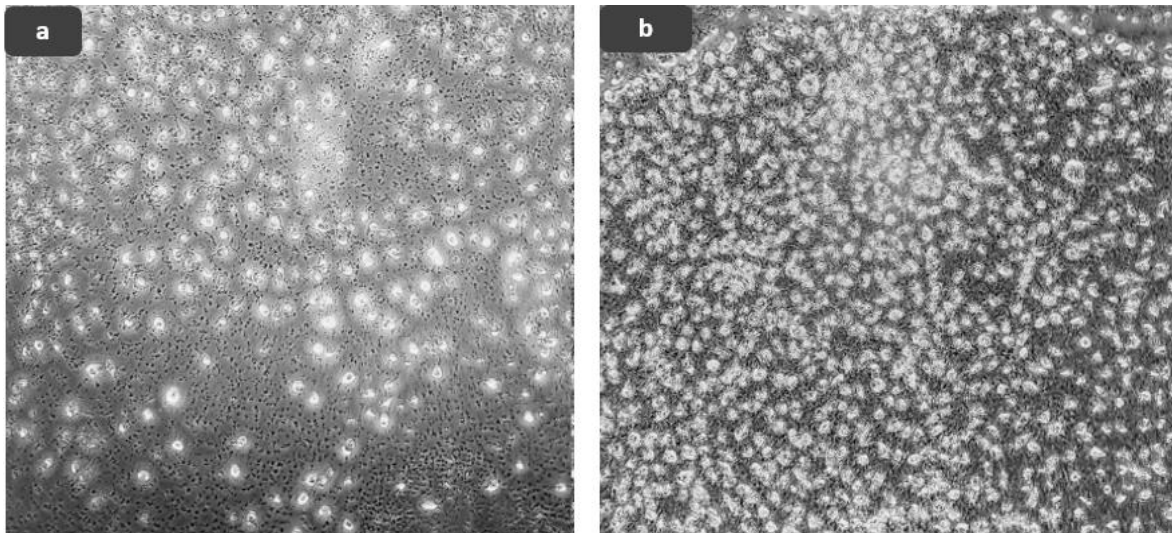
**Figura 3. Morfología celular de fibroblastos de la línea celular L929 incubados con Accocit en distintas concentraciones. 0.1 µg/mL (a) y 100 µg/mL (b).**

#### El UltraCal™ XS promueve la proliferación celular

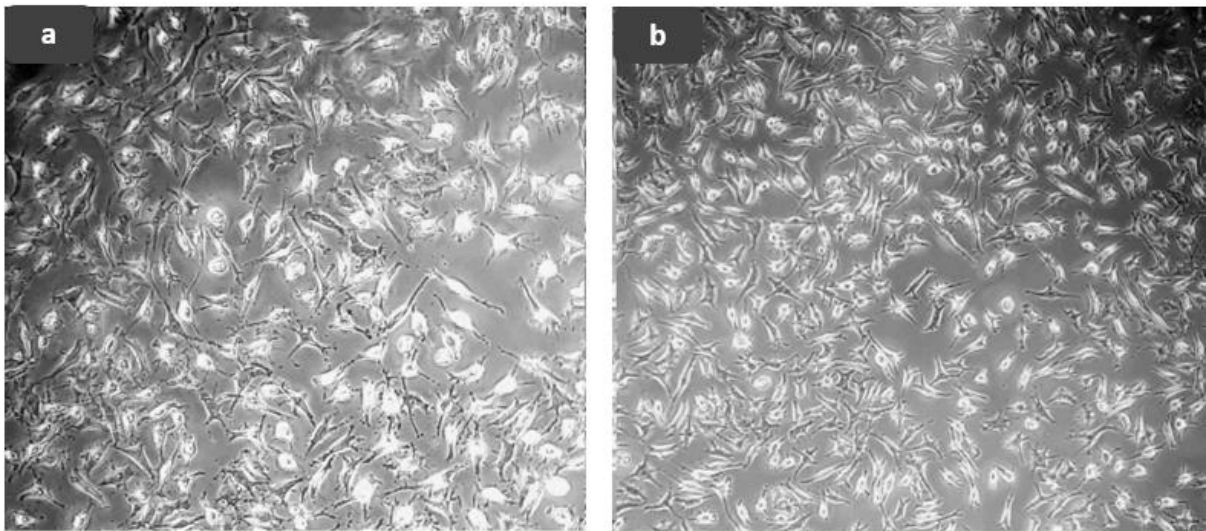
Los fibroblastos incubados con el medio condicionado de UltraCal™ XS presentaron cambios en la morfología en todos los tiempos. Desde la primera hora de incubación se observan mayor cantidad de espacios vacíos, y sobre la monocapa se aprecian fibroblastos redondos pero, a diferencia de con el Accocit, los fibroblastos no se ven opacos sino refringentes. Como el 40% de los fibroblastos tiene este aspecto (Figura 4). Este mismo comportamiento se observa para las 24 horas pero la cantidad de fibroblastos refringentes y redondos aumentó como al 80%. Dado que no cumplen con las características de muerte celular sino con características de proliferación celular pues se observan refringentes y no con gránulos intracitoplásmicos, los fibroblastos expuestos a UltraCal™ XS tienen un grado de citotoxicidad 0 y ninguna reactividad (Figura 4). El mismo comportamiento se muestra en los tiempos posteriores.

#### El Bio-C® Temp promovió la diferenciación de los fibroblastos

Los fibroblastos incubados con el medio condicionado de Bio-C® Temp cambiaron su forma de triángulos pequeños por una forma más ahusada y extendida, típica de los fibroblastos diferenciados. Este cambio en morfología se observó en todas las condiciones. Además, la monocapa no se aprecia confluyente, se encontraron mayor cantidad de espacios vacíos entre los fibroblastos (Figura 5). De forma similar a los fibroblastos refringentes observados con UltraCal™ XS, muchos de los fibroblastos que yacen sobre los fibroblastos diferenciados, también presentaron forma circular que es el reflejo de proliferación celular, mas no de muerte. Los fibroblastos se observan refringentes y no con gránulos intracitoplásmicos por lo que el grado de citotoxicidad es 0 y la reactividad es ninguna.



**Figura 4. Morfología celular de fibroblastos de la línea celular L929 incubados medio condicionado de UltraCal™ XS a la hora (a), a las 24 h (b).**



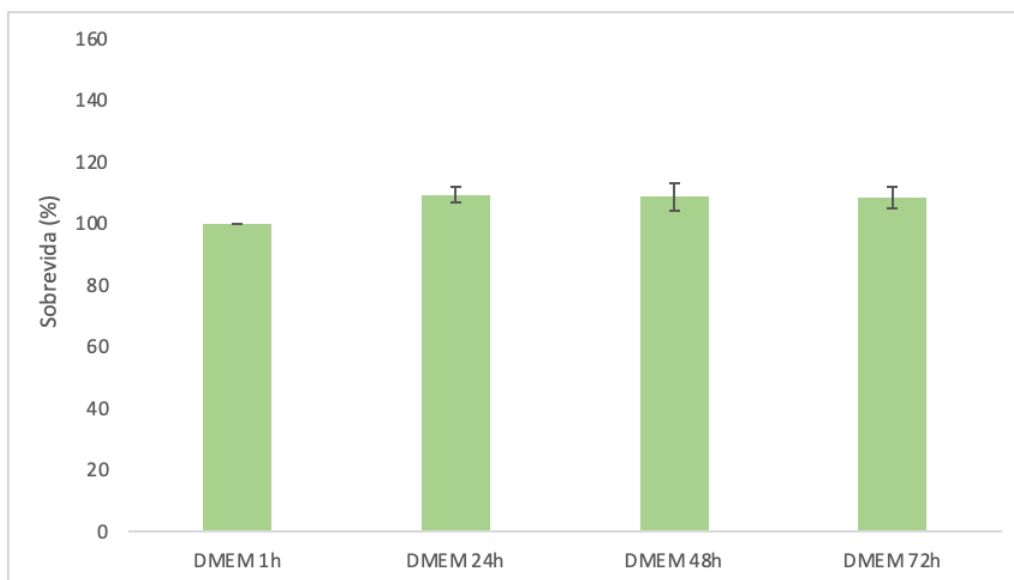
**Figura 5. Morfología celular de fibroblastos de la línea celular L929 incubados medio condicionado de Bio-C® Temp a la hora (a) y a las 24 h (b).**

### **Sobrevida medida con el método de sulforrodamina B**

#### Sobrevida observada sólo con medio DMEM

Para evaluar la sobrevida celular se usó el método de sulforrodamina en el que se determina la cantidad de proteína de los cultivos después de adicionar los medios condicionados. El 100% de sobrevida se consideró con la absorbancia obtenida del medio de cultivo DMEM (control negativo) al tiempo de una hora (Figura 6). El porcentaje de sobrevida se determinó comparando la proliferación celular en los

pozos cultivados con los medios condicionados contra la proliferación celular del pozo con DMEM a una hora (Figura 6). No existe diferencia significativa entre ninguno de los tiempos de incubación con medio DMEM (Figura 6).



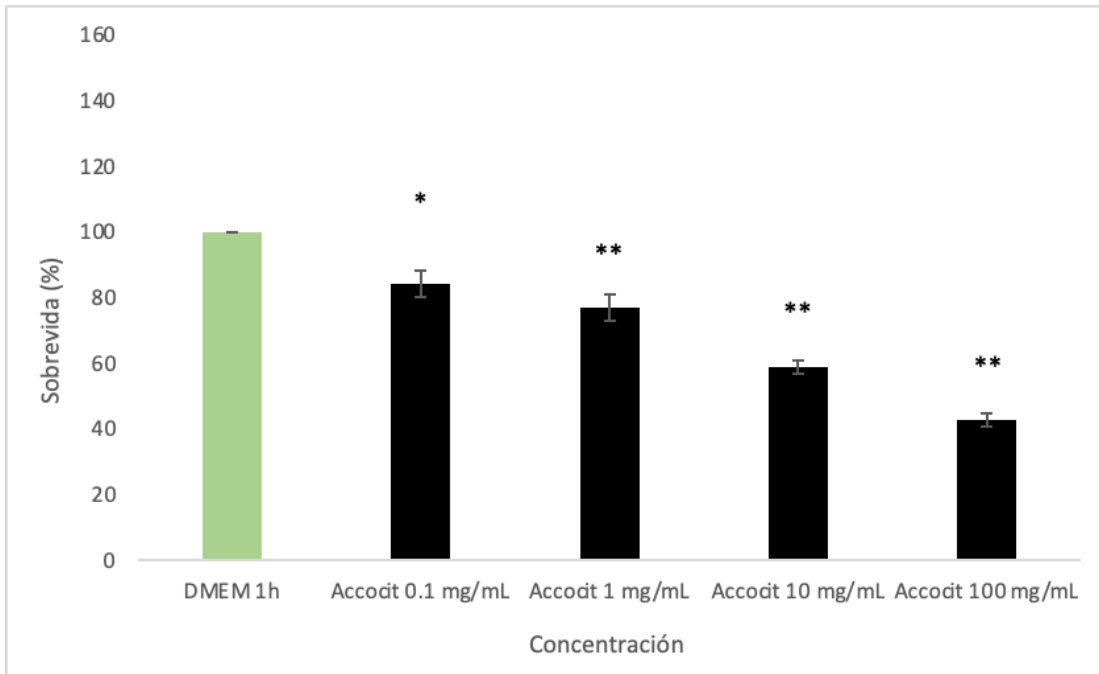
**Figura 6. Porcentaje de sobrevida de los fibroblastos L929 en condiciones control con sólo medio de cultivo DMEM después 24, 48 y 72h analizados con sulforradamina.** Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado  $\pm$  SE. El valor de DMEM 1h es tomado como el 100% de sobrevida.

#### El Accocit disminuyó la sobrevida de los fibroblastos de manera dosis dependiente

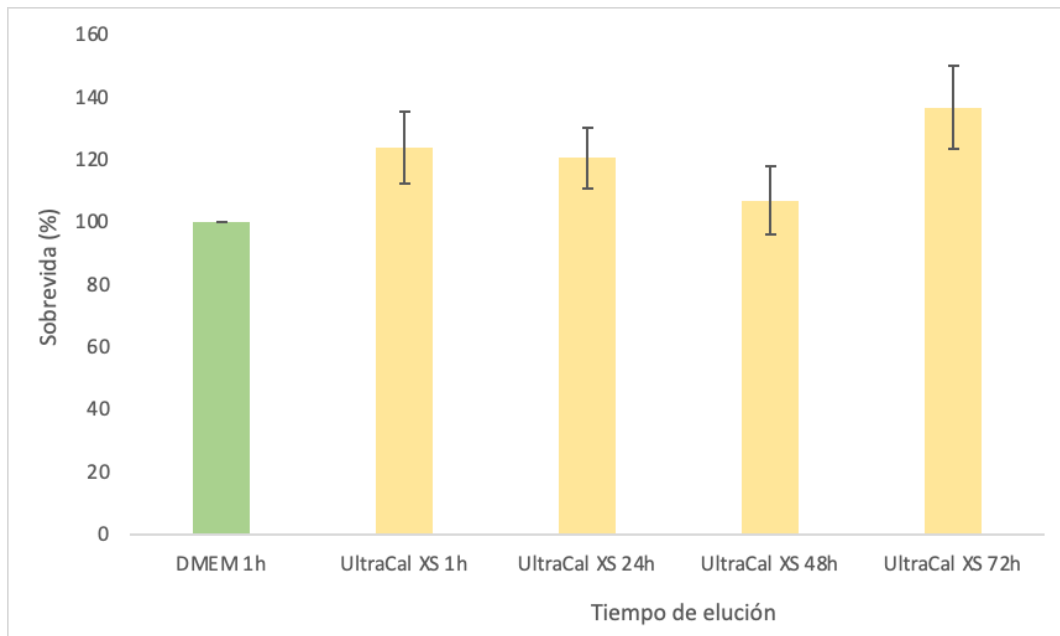
El Accocit es un fármaco usado para tratamientos contra cáncer y en este trabajo fue usado como control positivo. Los fibroblastos fueron expuestos a concentraciones crecientes de Accocit. El porcentaje de sobrevida se reduce en las células de forma dosis dependiente. Siendo el porcentaje de sobrevida celular cerca del 40% en su concentración más alta (100  $\mu$ g/mL; Figura 7). Al comparar el medio DMEM a 1h contra el Accocit se observó una disminución significativa del porcentaje de sobrevida en todas las concentraciones (Accocit 100  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL y 1  $\mu$ g/mL ( $p < .0001$ ) y Accocit 0.01  $\mu$ g/mL ( $p = 0.0047$ ); Figura 7).

#### El UltraCal™ XS no altera la sobrevida de los fibroblastos L929.

Al evaluar la sobrevida celular al ser expuestos los cultivos L929 al UltraCal™ XS, se observó una sobrevida mayor al 100% en todos los tiempos (1, 24, 48 y 72 horas; Figura 8). Sin embargo, no existen diferencias significativas ni entre los tiempos de elución ni con el control de DMEM.



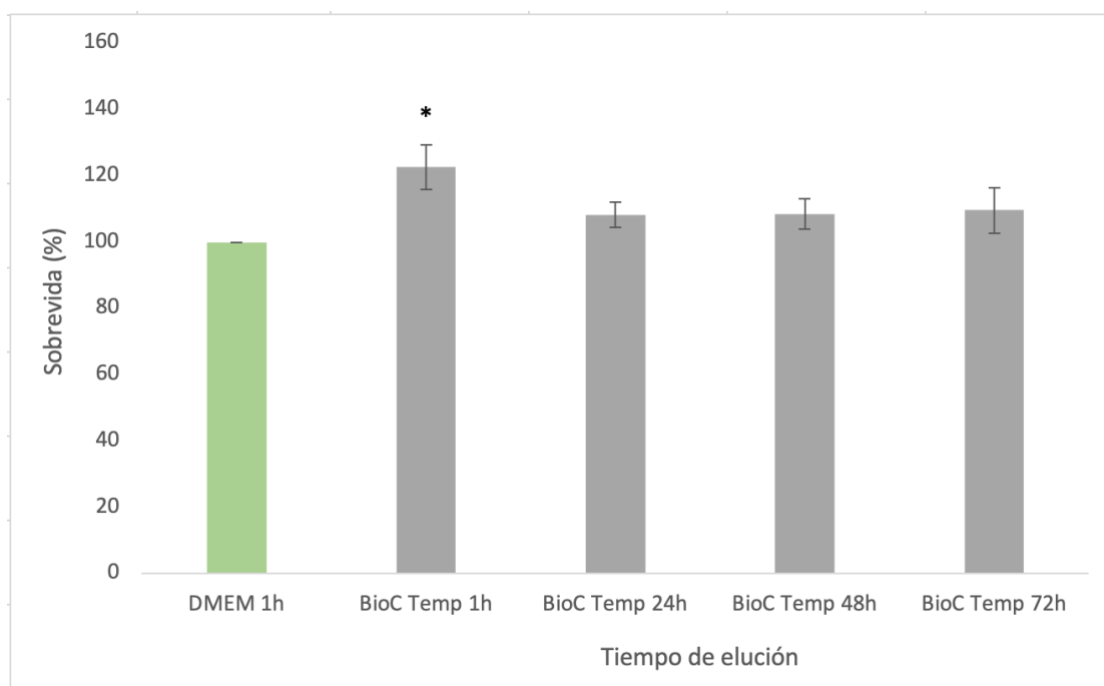
**Figura 7. Porcentaje de sobrevida de los fibroblastos L929 después de la exposición al Accodit en distintas concentraciones, analizados con sulforrodamina.** Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado  $\pm$  SE. Las barras negras indican el control positivo Accodit y la barra verde el valor de medio de cultivo DMEM a 1h, que es tomado como el 100% de sobrevida. \*  $p = 0.0047$  y \*\*  $p < .0001$ .



**Figura 8. Porcentaje de sobrevida celular de los fibroblastos L929 después de la exposición al medio condicionado de UltraCal™ XS a la hora, 24, 48 y 72 horas, analizados con sulforrodamina.** Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado  $\pm$  SE. Las barras amarillas indican medio condicionado de UltraCal™ XS y la barra verde el valor de medio de cultivo DMEM a 1h que es tomado como el 100% de sobrevida.

El Bio-C® Temp no altera la sobrevivencia de los fibroblastos y promueve su proliferación.

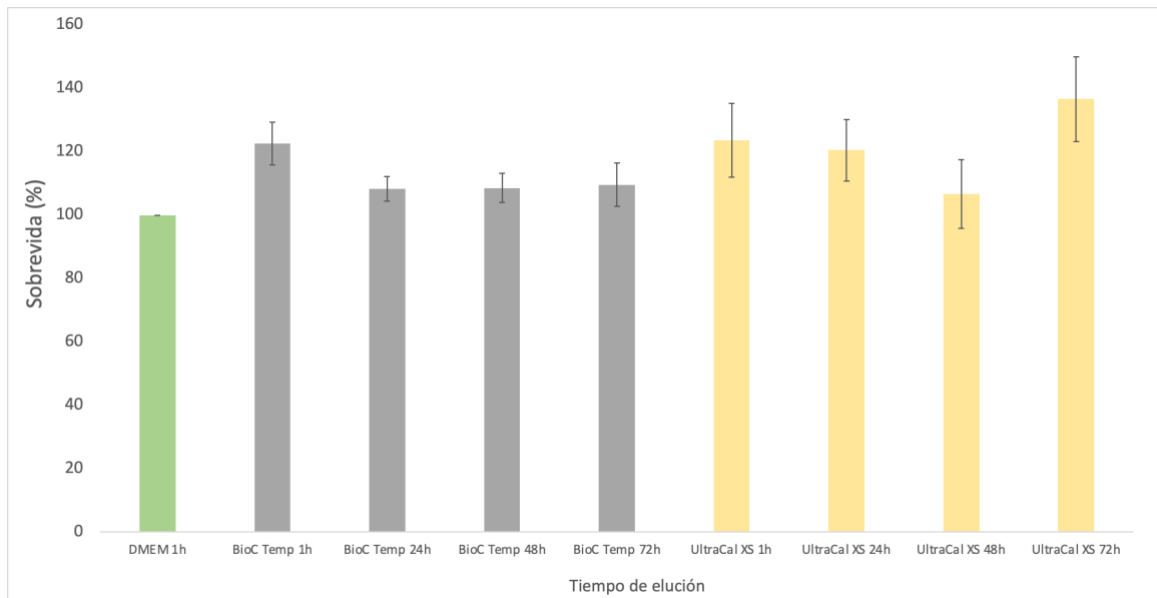
La sobrevivencia de los cultivos de fibroblastos L929, al ser expuestos al Bio-C® Temp en el tiempo de 1h fue mayor que la sobrevivencia de los fibroblastos cultivados solo con DMEM a 1h ( $p = 0.030$ ; Figura 9). Sin embargo, la viabilidad presentada en los otros tiempos (24, 48 y 72h) fue muy cercana al 100%. (Figura 9). Por lo tanto, el efecto proliferativo del Bio-C® Temp sobre los fibroblastos L929 se presenta a la primera hora.



**Figura 9.** Porcentaje de sobrevivencia celular de los fibroblastos L929 después de la exposición al medio condicionado de Bio-C® Temp a la hora, 24, 48 y 72 horas, analizados con sulforrodamina. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado  $\pm$  SE. Las barras grises indican el medio condicionado de Bio-C® Temp y la barra verde, el valor de medio de cultivo DMEM a 1h, que es tomado como el 100% de sobrevivencia. \*  $p = 0.030$ .

Tanto el UltraCaI™ XS como el Bio-C® Temp son biocompatibles y no afectan la sobrevivencia de los fibroblastos.

Al comparar el porcentaje de sobrevivencia del UltraCaI™ XS con el Bio-C® Temp no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos analizados (Figura 10).



**Figura 10.** Porcentaje de supervivencia celular de los fibroblastos L929 después de la exposición al medio condicionado de UltraCal™ XS y Bio-C® Temp a la hora, 24, 48 y 72 horas, analizados con sulforrodamina. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado  $\pm$  SE. Las barras grises indican medio condicionado de Bio-C® Temp, las barras amarillas indican medio condicionado de UltraCal™ XS y la barra verde, el valor de medio de cultivo DMEM a 1h, que es tomado como el 100% de supervivencia.

## Discusión

En el presente estudio se evaluó la citotoxicidad del UltraCal™ XS y del Bio-C® Temp utilizando dos parámetros, la morfología celular y la supervivencia. El Bio-C® Temp es un nuevo material biocerámico compuesto por silicatos cálcicos y no hay estudios que analicen la morfología y la supervivencia evaluada con la técnica sulforrodamina en fibroblastos.

Los fibroblastos de la línea celular L929 y la técnica de sulforrodamina fueron elegidos con base en la norma ISO 10993-5:2009. Los fibroblastos pues poseen una alta sensibilidad a los productos tóxicos (28). La sulforrodamina se une a los componentes proteicos de las células una vez que han sido fijadas con ácido tricloroacético, se unen en condiciones ácidas y se disocia en condiciones básicas. Por lo que con esta técnica podemos sólo evaluar la cantidad de proteínas presentes en el cultivo. Otra técnica que permite evaluar la viabilidad celular es la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) mejor conocida como MTT. La técnica de MTT se basa en la actividad metabólica mitocondrial para convertir el tetrazolio que es amarillo en formazán cuya coloración es púrpura. Por lo tanto si las células tienen actividad metabólica el resultado es que las células son viables (27). En el caso de la técnica de sulforrodamina no distingue entre células viables y muertas. Sabemos que esta diferencia no compromete la capacidad de la sulforrodamina para detectar los efectos de citotoxicidad de las medicaciones. Sin embargo, sería adecuado complementar los resultados de viabilidad observando la actividad metabólica con MTT.



Con base en la norma ISO 10993-5:2009 se deben preparar eluciones de los materiales de los cuales se desea conocer su citotoxicidad. Esto se debe a que al colocar las medicaciones intraconducto directamente sobre las células, las partículas de las medicaciones pueden interferir con la prueba o hacerla inválida (25). Por esta razón, de los medios condicionados, se obtuvieron diluciones 1:10 en los tiempos de una hora, 24, 48 y 72 h. En los medios condicionados se obtiene la liberación de compuestos lixivianos después de que los materiales empiezan su proceso de fraguado. Si pensamos en el diente, al obturar el conducto con una medicación los componentes de éste se eluyen al entrar en contacto con el fluido proveniente de los tejidos periapicales. Estos componentes son progresivamente eliminados por los fluidos extracelulares, debido a esto, se utilizaron diferentes tiempos de elución (29).

Los fibroblastos al ser incubados con el medio condicionado de UltraCal™ XS presentaron cambios en su morfología. Los fibroblastos perdieron la forma ahusada tomando una forma redondeada. Este cambio de forma se observó en todos los tiempos analizados. Esto podría deberse a que los fibroblastos activaron su ciclo celular y se encontraban en una etapa de división. Cuando las células activan el ciclo celular y están por dividirse deben despegarse del sustrato, tomar una forma esférica, dividirse y luego volver a adherirse a la superficie (30). Al presentar un mayor número de fibroblastos en el cultivo es de esperar que el resultado de la prueba de sulforrodamina sea un mayor porcentaje de sobrevivencia celular, que se observó en todos los tiempos. Este resultado concuerda con otros trabajos donde se observó un incremento significativo en la viabilidad celular en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana, usando el ensayo de MTT y en cultivos de células troncales de la papila apical, usando el ensayo de luminiscencia de CellTiter-Glo (31,32). El UltraCal™ XS contiene  $\text{Ca(OH)}_2$ . Algunos estudios se han enfocado en revisar la biocompatibilidad del  $\text{Ca(OH)}_2$ . En uno de ellos se utilizaron implantes de tubos de polietileno con  $\text{Ca(OH)}_2$  colocados en tejido subcutáneo dorsal de ratas por 7 y 30 días, haciendo análisis morfológicos y morfométricos de los tejidos concluyeron que el  $\text{Ca(OH)}_2$  es biocompatible (5,33). También se usaron células similares a preosteoblastos y se determinó la citotoxicidad del  $\text{Ca(OH)}_2$  con medios condicionados a las 24, 48, 72 h y por 7 días, usando el ensayo de MTT (33). Estos reportes corroboran la biocompatibilidad del  $\text{Ca(OH)}_2$  tanto in vitro como in vivo. Nuestro estudio aporta que el UltraCal™ XS es biocompatible.

Los fibroblastos L929 al ser incubados con el medio condicionado de Bio-C® Temp presentaron cambios en su morfología en todos de los tiempos. Algunos fibroblastos pasaron de una forma triangular compacta a una forma más ahusada, típica de los fibroblastos diferenciados. Otros, mostraron una forma esférica, de células en división celular. Además, se encontraron mayor cantidad de espacios vacíos entre las células. Esto podría deberse a una mayor diferenciación y proliferación celular. Al presentar una morfología más ahusada y mayor proliferación fue de esperarse que en el ensayo de sulforrodamina el porcentaje de sobrevivencia aumentara. Nos sorprendió el hecho de que a la hora esta diferencia fuera significativa, lo que implicaría que los efectos proliferativos y de diferenciación son más prominentes en cuanto se aplica la medicación. Sin embargo, este resultado debe ser verificado aumentando el número de repeticiones de los experimentos.

En nuestros resultados obtuvimos que los fibroblastos al ser expuestos a medios condicionados del Bio-C® Temp presentan un porcentaje de sobrevivencia muy parecido al control de medio de cultivo DMEM, por lo que concluimos que es biocompatible. Pocas investigaciones *in vitro* han evaluado la citotoxicidad del Bio-C® Temp y del UltraCal™ XS (11,16,23). O han evaluado solo al Bio-C® Temp junto con otros silicatos cálcicos utilizando la técnica MTT (24), encontrando resultados distintos a los obtenidos en este estudio con respecto al Bio-C® Temp. En un estudio realizado con células troncales de la papila apical estimuladas con lipopolisacáridos, se analizó la viabilidad celular del Bio-C® y UltraCal™ XS, usando como control medio de cultivo DMEM, en diluciones de 1:1 hasta 1:32 durante 24 h. El Bio-C® Temp a menores diluciones (1:1 y 1:2) presentó una viabilidad celular disminuida en un 60%. Por otro lado el UltraCal™ XS en todas las diluciones presentó una viabilidad similar al DMEM (23). En estudio realizado con las mismas células y técnica, pero en distintas concentraciones analizando silicatos cálcicos, se encontró que el Bio-C® Temp fue el más citotóxico de los biocerámicos probados, presentando un porcentaje de viabilidad celular cerca del 50% en la dilución 1:1 (24). Estos resultados concuerdan con estudio realizado en células similares a odontoblastos (Saos-2), donde se analizó al UltraCal™ XS, Bio-C® Temp y DMEM, utilizando 100 mg de cada medicación y diluida en 1:2, 1:4 1:12 y 1:24, después de 24 h. Los resultados mostraron que el Bio-C® Temp en la dilución de 1:2 presentó un porcentaje de viabilidad celular cerca del 40% y a mayores diluciones una viabilidad similar al UltraCal™ XS y al control (16). En estos estudios se esperaban un incremento en la viabilidad celular por parte del Bio-C® Temp debido a su composición, la cual incluye silicatos cálcicos, una posible hipótesis de la disminución en la viabilidad podría estar relacionada con la presencia en su composición del óxido de titanio como radiopacificador (23). Otras investigaciones han demostrado que el óxido de titanio induce apoptosis en diferentes tipos celulares incluyendo monocitos, fibroblastos de ratón, células troncales mesenquimales (16,31,34). Por lo que estos estudios asocian la citotoxicidad del Bio-C® Temp en mayores concentraciones a su componente radiopacificador, el óxido de titanio (16,23).

Asimismo, un estudio realizado en células VERO analizó al UltraCal™ XS y al Bio-C® Temp, utilizando 100 mg de cada medicación y diluida en concentraciones desde 50 mg/mL hasta 1.5625 mg/mL por 8 y 24 horas. En el tiempo de 100 mg/mL y 50 mg/mL tuvo un efecto moderadamente citotóxico con un porcentaje de viabilidad celular del 30-59%. A las 8 y 24 h en las concentraciones de 25 mg/mL y 12.5 mg/mL presentó un efecto ligeramente citotóxico con 60-90% de viabilidad celular y a las 24 h a las concentraciones de 100 mg/mL, 50 mg/mL y 25 mg/mL, tuvo un efecto fuertemente citotóxico con una viabilidad menor al 30%. Encontrando que el Bio-C® Temp tuvo un efecto citotóxico dependiente de la dosis y el tiempo, es decir, a mayor concentraciones, mayor citotoxicidad y ligeramente citotóxico a menores concentraciones (11). Estos reportes muestran que existe toxicidad del Bio-C® Temp a diferentes concentraciones. Nuestro estudio aporta que el Bio-C® Temp en dilución 1:10 en diferentes tiempos de elución es biocompatible.

## Conclusiones

- El nuevo material biocerámico como medicación intraconducto, Bio-C® Temp, promueve la proliferación y diferenciación de fibroblastos
- El UltraCal™ XS promueve la proliferación de fibroblastos
- El Bio-C® Temp no altera la sobrevida de los fibroblastos L929
- El UltraCal™ XS no altera la sobrevida de los fibroblastos L929
- Tanto el Bio-C® Temp como el UltraCal™ XS son materiales biocompatibles

## Agradecimientos

Agradecemos a la M.C. Isabel Gracia Mora y al M.C. Francisco Sánchez Bartéz su apoyo para la realización de este trabajo. El proyecto se realizó con el apoyo de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC). La medicación Bio-C® Temp fue provista por el Dr. Carlos Tinajero.

## Bibliografía

1. F. Siqueira Jr J, Rôças IN. Microbiology of Endodontic Infections. Pathw Pulp, 11th Ed. 2016;2(5):599–629.
2. Dianat O, Azadnia S, Mozayeni MA. Toxicity of calcium hydroxide nanoparticles on murine fibroblast cell line. Iran Endod J. 2015;10(1):49–54.
3. Fonzar F, Mollo A, Venturi M, Pini P, Fonzar RF, Trullenque-Eriksson A, et al. Single versus two visits with 1-week intracanal calcium hydroxide medication for endodontic treatment: One-year post-treatment results from a multicentre randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol. 2017;10(1):29–41.
4. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRDA. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: A critical review. J Appl Oral Sci. 2009;17(1):1–7.
5. Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio ALG, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, et al. Biocompatibility of Intracanal Medications Based on Calcium Hydroxide. ISRN Dent. 2012;2012:1–6.
6. Siqueira JF, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of Chemomechanical Preparation With 2.5% Sodium Hypochlorite and Intracanal Medication With Calcium Hydroxide on Cultivable Bacteria in Infected Root Canals. J Endod. 2007;33(7):800–5.
7. SJOGREN U. FD. 1991-JOE-The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term.pdf. 1985;119–25.
8. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)<sub>2</sub>. J Endod. 2005;31(5):359–63.
9. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011;44(8):697–730.
10. Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One-

- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: A histobacteriologic study. *J Endod.* 2012;38(8):1040–52.
11. Villa N, Dos Santos VV, da Costa UM, Mendes AT, Duarte PHM, da Rosa RA, et al. A new calcium silicat e-bas ed root canal dressing: Physical and chemical properties, cytotoxicity and dentinal tubule penetration. *Braz Dent J.* 2020;31(6):598–604.
  12. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Influence of Pulpal Treatments on Cell and Tissue Reactions in the Marginal Periodontium. *J Periodontol.* 1988;59(9):577–83.
  13. Breault LG, Schuster GS, Billman MA, Hanson BS, Kudryk VL, Pashley DH, et al. The Effects of Intracanal Medicaments, Fillers, and Sealers on the Attachment of Human Gingival Fibroblasts to an Exposed Dentin Surface Free of a Smear Layer. *J Periodontol.* 1995;66(7):545–51.
  14. Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Lindskog S. Effect of calcium hydroxide treatment on periodontal repair and root resorption. *Dent Traumatol.* 1986;2(5):184–9.
  15. Paste CH. UltraCal™ XS. :9–10.
  16. Guerreiro JCM, Ochoa-Rodríguez VM, Rodrigues EM, Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. *Int Endod J.* 2021;54(7):1155–65.
  17. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod* [Internet]. 2012;38(10):1372–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.018>
  18. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: A review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003;36(2):75–85.
  19. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials.* 1993;14(5):359–64.
  20. Jitaru S, Hodisan I, Timis L, Lucian A, Bud M. The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med.* 2016;89(4):470–3.
  21. Surya Raghavendra S, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in Endodontics – a Review. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2017;51(0):128–37.
  22. Temp B, Las AUSODE, Aplicadoras P. Bio-C ® Temp English. 2021 [Internet]. Available from: [www.angelus.ind.br](http://www.angelus.ind.br).
  23. Oliveira L V., da Silva GR, Souza GL, Magalhães TEA, Barbosa GLR, Turrioni AP, et al. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *Int Endod J.* 2020;53(8):1140–52.
  24. Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR, Magalhães TEA, Freitas GAN, Turrioni AP, et al. Biological parameters, discoloration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *Int Endod J.* 2021;54(11):2133–44.
  25. Mardashev SR, Nikolaev Ya. A, Sokolov NN. ISO-10993-5 Third edition. 2009. *Biokhimiya.* 1975;40(5):984–9.
  26. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM.

- Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells. *J Endod* [Internet]. 2009;35(10):1387–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.022>
27. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6.
  28. Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J*. 2012;45(1):49–56.
  29. Barros J, Costa-Rodrigues J, Lopes MA, Pina-Vaz I, Fernandes MH. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod*. 2014;40(8):1149–55.
  30. Freshney RI. Biology of Cultured Cells. *Cult Anim Cells*. 2011;(1):11–23.
  31. Pires CW, Botton G, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, da Cruz IBM, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J*. 2016;49(8):737–45.
  32. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod* [Internet]. 2014;40(4):521–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.008>
  33. da Silva GF, Cesário F, Garcia AMR, Weckwerth PH, Duarte MAH, de Oliveira RC, et al. Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):757–63.
  34. Yu S, Mu Y, Zhang X, Li J, Lee C, Wang H. Molecular mechanisms underlying titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>NP) induced autophagy in mesenchymal stem cells (MSC). *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* [Internet]. 2019;82(18):997–1008. Available from: <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1688482>