



Artículo de investigación científica y tecnológica

Ensayo de biocompatibilidad con *Artemia salina* para cinco materiales de uso endodóntico

Biocompatibility test with *Artemia salina* for five materials for endodontic use

Leidy Johanna Torres-Avirama ¹, Daniela Alexandra Realpe-Urbano ², Tania Lizeth Guevara –Valencia ³, Gilbert Alfonso-Morales ⁴, Ingrid Ximena Zamora-Córdoba ⁵, Carlos Humberto Valencia-Llano ⁶

1. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: leidy.avirama@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0002-4844-3930>
2. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: daniela.realpe@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0002-1360-8504>
3. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: taniaguevara@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0002-5330-5882>
4. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: gilbert.morales@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0003-2704-8365>
5. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: ingrid.zamora@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0002-9287-1414>
6. Universidad del Valle. Cali, Colombia. Correo: carlos.humberto.valencia@correounivalle.edu.co - <https://orcid.org/0000-0003-4892-9786>

Para citar este artículo: Torres-Avirama LJ, Realpe-Urbano DA, Guevara-Valencia TL, Alfonso- Morales G, Zamora -Córdoba IX, Valencia- Llano CH. Ensayo de biocompatibilidad con *Artemia salina* para cinco materiales de uso endodóntico. Duazary. 2023; 20 (2): 105-114. <https://doi.org/10.21676/2389783X.5360>

Recibido en octubre 22 de 2022
Aceptado en junio 22 de 2023
Publicado en línea en junio 30 de 2023

RESUMEN

Palabras

clave: *Artemia salina*; biocompatibilidad; citotoxicidad; protocolos.

Introducción: la biocompatibilidad es un factor decisivo para el éxito de una terapia endodóntica. **Objetivo:** evaluar la citotoxicidad de cinco materiales de uso endodóntico mediante la prueba de *Artemia Salina*. **Método:** se diseñó un estudio experimental *in vitro*, empleando *Artemia salina*, para evaluar la biocompatibilidad de los cementos Grossman, CaOH, AH-Plus, MTA y TheraCal-LC con observaciones a 24 y 48 horas. **Resultados:** el cemento Grossman presentó 100% de toxicidad a las 24 horas, mientras que los demás materiales mostraron valores menores al 30%, lo que indicó un comportamiento biocompatible; sin embargo, a las 48 horas, CaOH y TheraCal-LC presentan una toxicidad mayor al 30%, mientras que AH-Plus y MTA continúan con valores -menores del 30%. Los datos fueron analizados con un Modelo lineal generalizado con distribución de errores binomial, un análisis de devianza, y la prueba de comparación múltiple de Fisher con corrección Bonferroni. Se hizo un análisis independiente para las 24 y 48 horas, bajo un nivel de significancia $\alpha=5\%$, se encontraron diferencias significativas a las 48 horas entre TheraCal-LC y AH-Plus y MTA. **Conclusiones:** el cemento Grossman presentó un alto grado de toxicidad, mientras que AH-Plus y MTA mostraron la mayor biocompatibilidad.

ABSTRACT

Keywords:

Artemia salina; Biocompatibility; Cytotoxicity; Protocols.

Introduction: Biocompatibility is a decisive factor in the success of endodontic therapy. **Objective:** To assess the cytotoxicity of five endodontic materials using the *Artemia salina* test. **Method:** An *in vitro* experimental study was designed, using *Artemia salina*, to evaluate the biocompatibility of Grossman, CaOH, AH-Plus, MTA, and TheraCal-LC cements, with observations at 24 and 48 hours. **Results:** Grossman cement presented 100% toxicity at 24 hours, while the other materials show values lower than 30%, reflecting a biocompatible behavior; however, at 48 hours, CaOH and TheraCal-LC present toxicity higher than 30%, while AH-Plus and MTA continue with values lower than 30%. The data were analyzed with a Generalized Linear Model with binomial error distribution, a deviancy analysis, and Fisher's multiple comparison test with Bonferroni correction. An independent analysis was performed for 24 and 48 hours, under a significance level $\alpha=5\%$; significant differences were found at 48 hours between

TheraCal-LC and AH-Plus, and MTA. **Conclusions:** Grossman cement presented a high degree of toxicity, while AH-Plus and MTA showed the highest biocompatibility.

INTRODUCCIÓN

La Endodoncia como área de conocimiento, tiene un objetivo primordial: la eliminación o reducción del número de microorganismos dentro del espacio del conducto radicular y la prevención de una posible infección o reinfección, por lo que, en los últimos años, se ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías, que lleguen a este fin, y que, a su vez, permitan romper los paradigmas terapéuticos, en pro de la innovación y el análisis crítico del entorno y los recursos. Es así como desde este enfoque, se ha dirigido la atención hacia cada una de las fases de ejecución en la endodoncia, y uno de esos aspectos consiste en el selle definitivo del conducto radicular, un proceso que brinda una estabilidad biológica y un control sobre los portales que puedan generar algún tipo de desequilibrio. Este blindaje hermético, se obtiene gracias al uso de un tipo de agentes denominados: cementos selladores, cuya característica es adherir un material inerte a un tejido biológico, limitando la excursión microbiológica, capaz de inducir o incluso provocar persistencia de una lesión periapical¹.

A lo largo de la historia, se ha generado un gran interés sobre los sistemas de obturación, y el comportamiento de los cementos selladores en la terapia endodóntica convencional. La búsqueda de un agente cementante que cumpla con los requisitos ideales, establecidos por Grossman en 1963, y que además, evite la aparición de algún evento mutagénico, carcinogénico, o un tipo de reacción inmunitaria sobre los tejidos periapicales ha dado como resultado el desarrollo de diversos materiales que van desde elementos simples como el óxido de zinc, hasta compuestos más complejos como las resinas epóxicas y los cementos bioactivos².

Esta variedad de agentes cementantes, se diferencian en su composición, y es una característica que incide sobre sus propiedades físicas y mecánicas, así como también, en el tipo de interacción con la dentina. Los selladores a base de óxido de zinc, que son los más utilizados, presentan una baja resistencia a las fuerzas compresivas y poca capacidad de penetración en los túbulos dentinarios. Por el contrario, los selladores a base de resinas epóxicas tienen una mayor capacidad de penetración y una mayor adhesión a la dentina radicular³.

Hoy en día, se dispone de una amplia oferta comercial de materiales selladores los cuales pueden ser clasificados de acuerdo con su naturaleza química en 7 grupos: a) Sistema óxido de zinc – eugenol; b) Basados en resina epóxica; c) Basados en Siliconas; d) Sistema MTA (*Mineral trioxide aggregate*); e) Selladores biocerámicos basados en el sistema calcio – silicato – fosfato; f) Basados en resina de metacrilato; y g) Selladores basados en fosfato de calcio⁴.

El éxito de una terapia endodóntica convencional, se encuentra influenciada por la capacidad que tenga el agente cementante de proporcionar un selle hermético y tridimensional del sistema de conductos radiculares, y está ligado al tipo de combinación que logre establecer con la dentina radicular y un material obturador⁵.

El material obturador más utilizado es la gutapercha, un polímero de alto peso molecular con dos formas cristalográficas: alfa y beta, que ocupa la mayor parte del espacio del conducto, mientras que el sellador llena la interfaz entre el material obturador y la pared del conducto. Estos materiales deben ser biocompatibles, no reabsorbibles y estimular la cicatrización en la zona periapical^{4,6}.

Por otro lado, se ha desarrollado una línea terapéutica, que se aleja de la terapia endodóntica convencional, y cuyo objetivo es promover la permanencia del tejido pulpar y propender su recuperación, y reparación, llamada: terapia pulpar vital. Su enfoque está dirigido a la interacción de la pulpa y la dentina con un tipo de agentes cementantes, llamados cementos bioactivos, cuya composición se basa en agregados minerales, y poseen la capacidad de formar capas de hidroxiapatita en una superficie *in vivo*, dando como resultado un fenómeno denominado: biomineralización.

Los cementos bioactivos, están compuestos principalmente de Silicato de calcio y aluminato de calcio, y se diferencian de los vidrios bioactivos, porque requieren agua para su fraguado y así adoptar una consistencia firme, dura, dimensionalmente estable, lo que representa una gran ventaja, dado que la falta de expansión o contracción ayuda a sellar el

área donde se encuentra expuesto el tejido vivo. Otra de sus características es el alto pH, el cual imparte una acción antimicrobiana sobre bacterias planctónicas y levaduras, sin embargo, resulta insuficiente para destruir biopelículas instauradas. Otro beneficio *in vivo* de estos agentes bioactivos es la liberación de iones de Silicato, que beneficia la osteogénesis, un fenómeno clave para la curación del tejido pulpar o periapical lesionado y la reparación del tejido óseo circundante⁷.

Con la aparición de la terapia pulpar vital, descrita también como endodoncia regenerativa, hubo un cambio de paradigma hacia nuevos conceptos en endodoncia y se planteó que algunos materiales podrían estimular la maduración en dientes con ápice abierto, la revitalización y la recuperación del tejido pulpar afectado mediante la promoción de la revascularización y la angiogénesis⁸.

La endodoncia regenerativa definida como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería de tejidos buscando promover la recuperación de los tejidos pulpares y periapicales afectados⁹, involucra el concepto transversal de biocompatibilidad, puesto que la interacción con estos tejidos biológicos debe establecerse bajo una atmósfera no citotóxica e inmunológicamente compatible⁴.

El cambio en el paradigma que implicó la endodoncia regenerativa llevó a investigar sobre el efecto en la solidez estructural y a reevaluar el grado de biocompatibilidad de los agentes cementantes tradicionalmente usados, lo que generó la necesidad de realizar más estudios a los nuevos materiales. Dentro de los resultados registrados de algunas investigaciones se han encontrado que la exposición prolongada al hidróxido de calcio aumenta la posibilidad de fractura radicular^{8,10}, las concentraciones altas de pasta antibiótica tienen un efecto citotóxico sobre las células madres remanentes de la papila apical^{8,11}; y que las pastas a base de óxido de zinc-eugenol pueden liberar Eugenol, un componente altamente citotóxico.

Teniendo en cuenta que la biocompatibilidad es un factor decisivo para el éxito de una terapia endodóncica bien sea convencional o como terapia pulpar vital, esta investigación tiene como objetivo evaluar la citotoxicidad *in vitro* de cinco de los materiales selladores más comúnmente utilizando en

tratamientos de endodoncia, mediante la prueba de *Artemia salina*.

MÉTODO

Tipo de investigación

Estudio experimental *in vitro*, con modelos animales invertebrados, útiles en los estudios de investigación que pueden inferirse a los vertebrados. Un ensayo preliminar *in vitro* sirve para priorizar sólo las mejores sustancias químicas para su posterior prueba en vertebrados. Para desarrollar esta investigación, se evaluó la toxicidad de 5 materiales con uso en endodoncia, utilizando la prueba de *Artemia salina*, un tipo de crustáceo conocido comúnmente como “mono de mar”. La prueba de *Artemia salina* fue propuesta en el año 1956 como un bioensayo¹², pero solo hasta la década de 1980 el centro de referencia de la Artemia, propuso su estandarización como un ensayo de toxicidad agudo para determinar la dosis letal 50 (DL50) en larvas de *Artemia salina* en estadios 2 y 3 a las 24 horas y 48 horas¹³, desde entonces el método ha sido ampliamente utilizado para estudiar la compatibilidad/toxicidad de diferentes materiales¹².

Instrumentos y procedimientos

Con base en los estudios realizados por Rotini *et al*¹⁴, Abushaala¹⁵, y Pecoraro *et al*¹⁶, para la realización de la prueba, se hidrató un gramo de huevos de *Artemia salina* (*Brine shrimp eggs*, *Brine shrimp direct*, Ogden, UT, USA), en 4 litros de solución artificial de agua de mar a partir de la relación: 30 gramos de sal marina / litro de agua destilada.

Para la eclosión de los huevos, la solución de agua de mar con los huevos fue depositada en un artemisador fabricado de acuerdo al protocolo y a la descripción del equipo usado por Rotini *et al*¹⁴, este equipo está conformado por una serie de anillos concéntricos que actúan como barreras para garantizar que solo nauplios saludables lleguen a un anillo central donde son capturados para el experimento.

Los materiales seleccionados para el estudio fueron: el cemento Grossman / Eugenol (Proquident, Medellín, Colombia), un material utilizado como agente sellador; la pasta de Hidróxido de Calcio (CaOH) (Dycal® Dentsply Sirona, Milford, DE, EE.UU), usada como agente para recubrimiento

pulpar indirecto en terapias vitales; el cemento AH-Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Constanza, Alemania), usado como cemento sellador para la obturación en terapias convencionales; el MTA Angelus Blanco (Angelus, Londrina-PR-Brasil), utilizado como agente de recubrimiento pulpar directo, indirecto en terapias vitales; y el TheraCal-LC (Bisco, Schaumburg, U.S.A), también con aplicación como recubrimiento pulpar directo o indirecto.

Los materiales fueron preparados a 24 °C, siguiendo las indicaciones de cada fabricante para su preparación. Basados en los estudios de Abushaala et al¹⁵, se realizaron cinco muestras de cada material con un peso de 10 mg, empleando una balanza analítica RADWAG WAS 100/X.

Para el experimento se utilizaron cajas para cultivo celular de 6 pozos (Corning, Termo Fischer Waltham, MS, USA) (Figura 1); se depositaron en cada pozo 10 nauplios de 48 horas y una muestra de cada material con un peso de 10 mg; como control positivo se utilizó jabón enzimático (Bonzyme, Laboratorios Eufar, Bogotá, Colombia), con el fin de obtener datos de toxicidad y comprobar la sensibilidad de las larvas¹⁷, antes los residuos tóxicos que deja este material¹⁸, y como control negativo solución de agua de mar con los crustáceos.

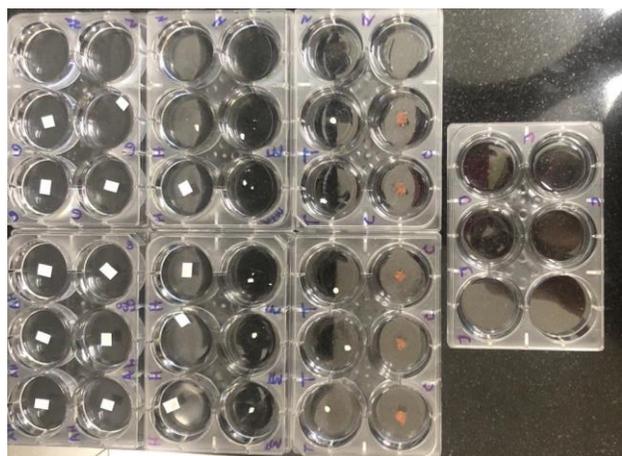


Figura 1. Distribución de los materiales en cajas de cultivo de 6 pozos.

Todas las muestras y controles se replicaron cinco veces; haciendo observaciones a las 24 y 48 horas. Para determinar la toxicidad se utilizó la siguiente fórmula^{19,20}:

$$\text{Mortalidad}\% = \frac{\text{Numero de AS muertas}}{\text{Numero de AS inicial}} \times 100$$

La prueba es realizada con larvas de segundo instar (nauplios), siendo considerado tóxico el extracto que induce la mortalidad mayor o igual a 30%^{21,22}. La *Artemia salina* que se observe inmóvil durante 10 segundos se cuenta como muerta y los nauplios que se observen móviles se consideran vivos¹⁶. La prueba se considera válida si menos del 10% de los nauplios del control negativo se encuentran inmóviles^{14,19}.

Las revisiones a las 24 y 48 horas fueron realizadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico Thomas Scientific (Swedesboro, Nueva Jersey, USA), equipado con una Cámara Motic (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) En el análisis de los datos, los conteos de mortalidad se registraron en proporciones, por lo cual se empleó un Modelo lineal generalizado con distribución binomial. Para evaluar si cada grupo tenía un efecto significativo sobre la tasa de mortalidad, se realizó un análisis de devianza asociado al modelo anterior. Para determinar entre cuales de los grupos se evidenciaron diferencias estadísticas, se realizó la prueba de comparación múltiple de Fisher con corrección por Bonferroni²³. El anterior análisis fue utilizado de manera independiente para los instantes de tiempo 24 horas y 48 horas, bajo un nivel de significancia $\alpha=5\%$. Se empleó el Software Estadístico R, versión 4.1.2.

Declaración sobre aspectos éticos

En esta investigación se utilizaron larvas de *Artemia salina*, un organismo invertebrado; para la realización de los procedimientos se siguieron procedimientos recomendados en la literatura científica¹⁴⁻¹⁹. El estudio fue revisado y autorizado por el Comité de ética en investigaciones con animales de la Universidad del Valle mediante el código CEAS 002-021.

RESULTADOS

A las 24 horas de implantación se realizó una inspección visual de los pozos, mediante microscopía estereoscópica a diferentes magnificaciones (1X, 2X 3X 4X) observando un numero variable de larvas vivas nadando y en contacto con los materiales, así como larvas muertas (Figura 2).

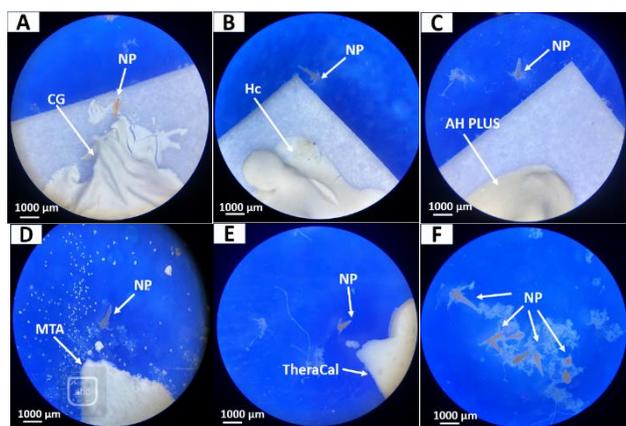


Figura 2. Materiales cultivados con nauplios a 24 horas. Microscopio estereoscópico, imágenes a 4X. A: Cemento

Grossman. B: Hidróxido de Calcio (CaOH). C: AH-Plus. D: MTA. E: TheraCal-LC. F: Control positivo.

La primera observación de los pozos a las 24 h mostró que la mayoría de las larvas se encontraron vivas, con una tasa de mortalidad entre un 10% y 18%, sin embargo, se evidenció una mortalidad del 26% en el grupo de CaOH y del 100% en el grupo control positivo y el grupo del cemento Grossman. Se evidenció a las 48 horas una mortalidad mayor al 30% en el grupo de CaOH y TheraCal-LC. Los grupos de materiales AH-Plus y MTA, tuvieron la tasa de mortalidad más baja a las 48 h de observación (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje (%) de mortalidad de larvas muertas de *Artemia Salina* a las 24 y 48 h.

Material	24 h (%)	48 h (%)	Total
Cemento Grossman	100	100	100
Hidróxido de Calcio (CaOH)	26	40	40
AH-Plus	12	26	26
MTA Angelus blanco	12	28	28
TheraCal LC	18	58	56
Control Negativo	5	23	23
Control Positivo	100	100	100

Los datos de las pruebas fueron registrados en hojas de Excel, y analizados en el Software Estadístico R, versión 4.1.2. Al realizar el análisis de devianza asociado al modelo lineal generalizado con distribución Binomial, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas con relación a la tasa de mortalidad entre los grupos a las 24 horas de observación, (Devianza=9,0853, Grados de libertad

= Df =4, Valor-p=0,059 > 0,05) (Figura 3). Estos resultados fueron corroborados con la prueba de Fisher con corrección por Bonferroni, (p>0,05).

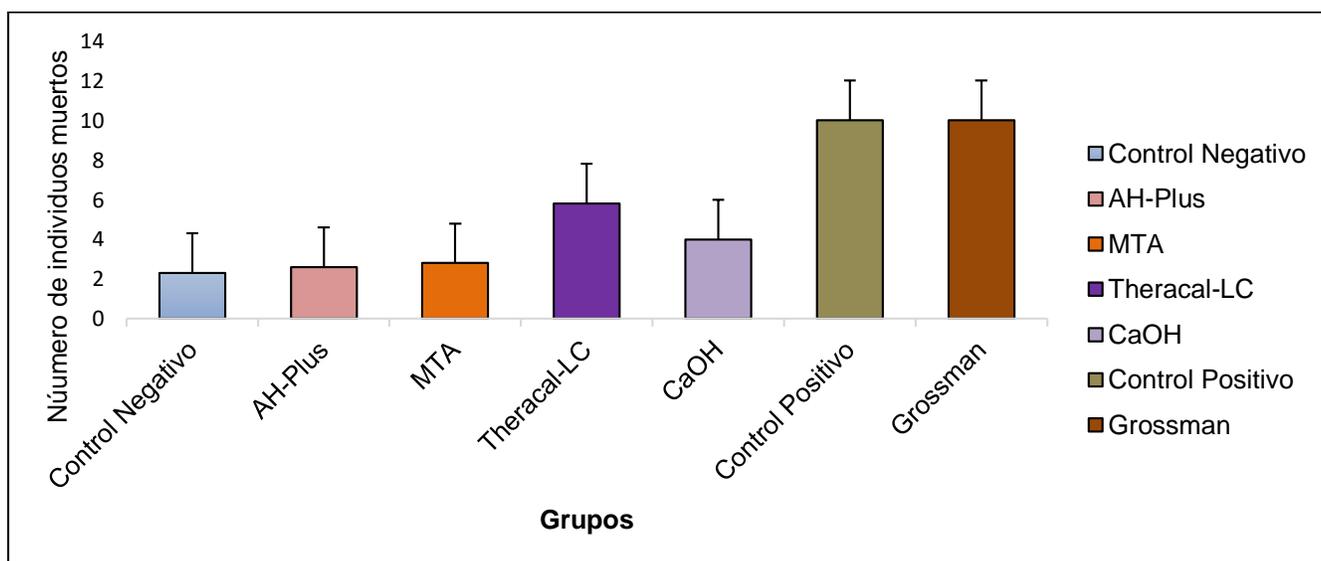


Figura 3. Número de individuos muertos para *Artemia salina* después de 24 h, (Devianza=9,0853, Grados de libertad = Df =4, Valor-p=0,059 > 0,05).

Después de 48 horas de observación, al realizar el análisis de devianza asociado al modelo lineal generalizado con distribución Binomial, se identificaron diferencias estadísticamente significativas con relación a la tasa de mortalidad entre los diferentes grupos (Devianza=17,299, Grados de libertad = Df =4, Valor-p=0,001691 < 0,05), (Figura 4). Los resultados de la prueba de

Fisher con corrección por Bonferroni, sugiere que hay diferencias significativas entre el grupo Theracal-LC con los grupos MTA (valor-p=0,0292), AH-Plus (valor-p=0,0151) y control negativo (valor-p=0,0075). Entre los demás grupos no se presentan diferencias significativas (valor-p > 0,05).

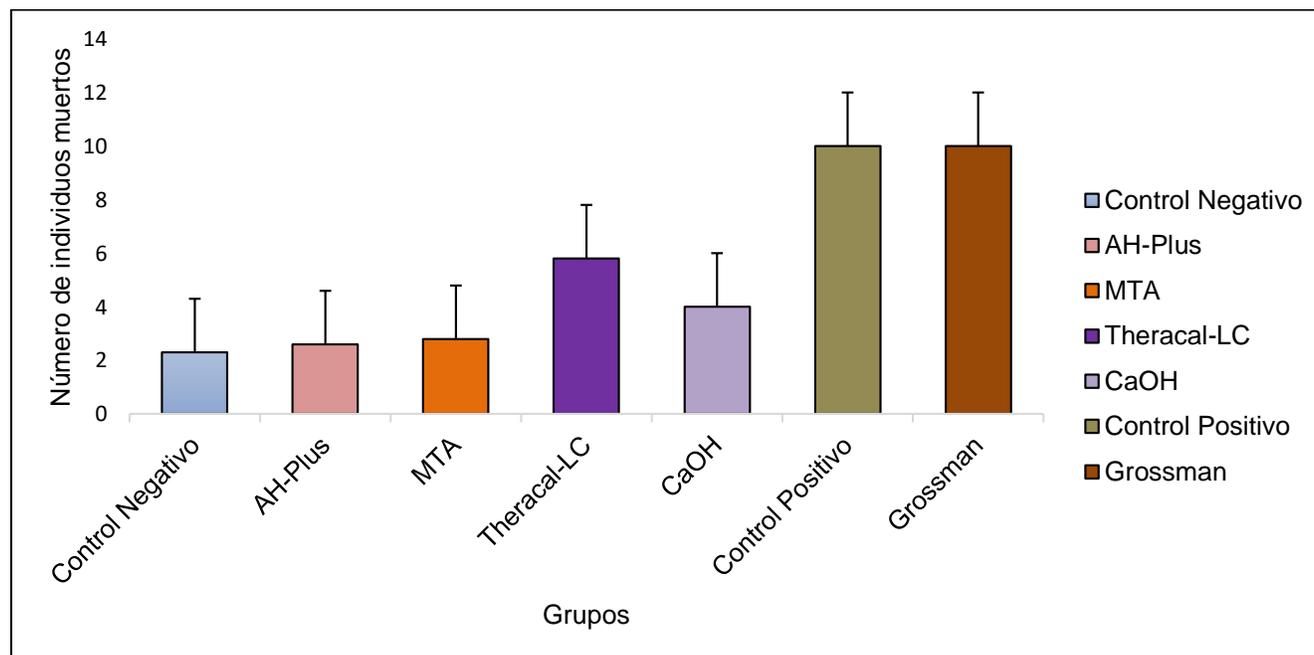


Figura 4. Número de individuos muertos para *Artemia salina* después de 48 h, (Devianza=17,299, Grados de libertad = Df =4, Valor-p=0,001691 < 0.05).

El ensayo con *Artemia Salina* mostró que, con excepción del cemento Grossman, la mayoría de los cementos se comportaron como compatibles al mostrar baja toxicidad a las 24 horas, sin embargo, a las 48 horas tanto el CaOH como el TheraCal-LC presentaron porcentajes de toxicidad por encima del 30% lo que indicaría que dejan de ser compatibles²¹. Los materiales AH-Plus y MTA tuvieron un comportamiento muy similar a las 24 y 48 horas manteniendo un porcentaje de mortalidad inferior al 30%; el grupo control negativo tuvo un incremento en la mortalidad al pasar del 5% a las 24 horas a un 23% a las 48 horas, lo que se explica por el agotamiento de recursos nutritivos de reserva ya que en el experimento las larvas no son alimentadas. En general, a excepción del cemento Grossman, todos los materiales mostraron baja toxicidad a las 24 horas, siendo el AH-Plus y MTA los que mostraron la más alta biocompatibilidad. En la observación a las 48 horas, mientras los cementos AH-Plus y MTA

continuaban con porcentajes de mortalidad por debajo del 30%, comparables al control negativo, el CaOH y el TheraCal-LC tuvieron unos porcentajes de mortalidad muy superiores a los del control negativo y por encima del 30% lo que los hace no biocompatibles para este periodo de observación.

DISCUSIÓN

El estudio tuvo por objetivo evaluar la citotoxicidad de cinco materiales de uso endodóntico mediante la prueba de *Artemia Salina*. En los últimos años, el objetivo de muchos laboratorios relacionados con el estudio de biocompatibilidad ha sido desarrollar y utilizar nuevos procedimientos de bioensayos; tratando de fomentar métodos económicos, fáciles de utilizar, y que generen resultados confiables estadísticamente. Actualmente los ensayos de mortalidad con *Artemia salina* se utilizan ampliamente en pruebas de citotoxicidad en

materiales dentales o materiales bioactivos de tipo endodóntico, ya que brindan un panorama inicial sobre la citotoxicidad de un material sin necesidad de tener mayor inversión en infraestructura, este indicio sobre la citotoxicidad de un material permite al investigador discriminar muestras para pasar a realizar pruebas más específicas como biología molecular o cultivos celulares^{24,25}.

Los resultados indican que el cemento Grossman utilizado en esta investigación presentó un porcentaje de citotoxicidad del 100% a las 24 horas, y concuerda con lo reportado en la literatura, indicando que, a pesar de las modificaciones realizadas, el material continúa presentando problemas de biocompatibilidad.

La literatura indica que el óxido de zinc, es el mayor compuesto del cemento Grossman, seguido del eugenol que actúa como activador. Este sistema óxido de zinc - eugenol presenta un efecto antibacteriano²⁵, pero también se le atribuye un efecto inflamatorio que puede llevar a necrosis, la explicación a este hecho parece estar relacionada con la liberación de residuos del componente Eugenol²⁶, un derivado fenólico obtenido del clavo de olor²⁷. Es importante resaltar, que los cementos a base de óxido de zinc - eugenol son considerados un estándar en la terapia endodóntica convencional, y esto es debido a la gran cantidad de procedimientos reportados en los que fueron utilizados, en la actualidad las fórmulas iniciales del cemento de Grossman han sido modificadas incluyéndoles otros componentes en un intento por disminuir su citotoxicidad^{25,26}.

El hidróxido de calcio también es un material con amplia utilización en odontología, considerado por varias décadas como el material ideal para recubrimiento directo e indirecto en terapias vitales, gracias a la capacidad que tiene para estimular procesos reparativos e inducir mineralización de la dentina, además de tener propiedades antiinflamatorias y antibacterianas²⁸, sin embargo, algunos estudios han mostrado que partículas de hidróxido de calcio tienen efecto citotóxico *in vitro* y que el contacto directo del material con el tejido pulpar genera una respuesta inflamatoria posiblemente por su alta alcalinidad²⁹. Los resultados de esta investigación mostraron que este material tuvo un porcentaje de mortalidad relativamente alto, lo que hace cuestionable su biocompatibilidad.

Respecto al agente sellador AH-Plus, el cual está constituido principalmente por una resina aminoepoxica, mostró una alta biocompatibilidad, a pesar de su naturaleza química la cual es responsable de un potencial efecto citotóxico debido a la liberación de aldehídos³⁰.

En el caso del cemento MTA, un cemento de silicato de calcio derivado del cemento portland, la literatura científica ha reportado propiedades de bioactividad, antimicrobianas y de biocompatibilidad³¹, y se ha registrado en algunos estudios una baja citotoxicidad^{32,33}, a pesar de esto, su potencial citotóxico sigue siendo cuestionado³⁴, debido en gran parte a la presencia de dos componentes considerados altamente tóxicos: la resina de salicilato, y el diluyente de resina y sílice³⁰. Los resultados de esta investigación arrojaron un porcentaje bajo de citotoxicidad, lo que concuerda con lo reportado en la literatura.

El TheraCal-LC, es una resina de silicato de calcio modificado, en estudios *in vitro* se ha encontrado un posible efecto citotóxico dependiente de la dosis y atribuible a liberación de monómeros³⁵; en un estudio *in vivo* en modelo canino este producto mostró una baja biocompatibilidad³⁵; en el estudio realizado con *Artemia salina* este material presentó un porcentaje de mortalidad relativamente alto, pero por debajo del 30% a las 24 horas.

La revisión de literatura realizada muestra que los 5 materiales evaluados, presentan algún grado de potencial citotóxico al ser estudiados mediante pruebas *in vitro* especializadas como el ensayo de actividad metabólica (MTT). Los resultados de esta investigación utilizando la prueba de *Artemia salina* permite confirmar estos hallazgos.

Se puede concluir que, de los 5 materiales estudiados, el cemento Grossman tuvo el peor desempeño con un 100% de mortalidad a las 24 horas, mientras el MTA *Angelus* blanco tuvo el porcentaje más bajo siendo cercano al del grupo control negativo. El Hidróxido de Calcio y el TheraCal-LC, mostraron biocompatibilidad a las 24 horas, pero el porcentaje de mortalidad aumento notablemente a las 48 horas. La prueba de biocompatibilidad con *Artemia salina* es válida para el estudio *in vivo* de biomateriales para uso endodóntico

Con esta investigación se espera ofrecer a la comunidad científica, a corto plazo, un protocolo

estandarizado de la prueba de biocompatibilidad con *Artemia salina*, a mediano y largo plazo se esperaría que esta investigación sea acogida por diferentes investigadores contribuyendo así a los estudios de biocompatibilidad de nuevos biomateriales. Las investigaciones con *Artemia salina* no tienen restricciones de tipo ambiental o legal ya que no son especies protegidas, ni invasoras, normalmente se utilizan para alimentar peces de acuario; las soluciones que se utilizan son a base de cloruro de sodio, en concentraciones que permitan la supervivencia de estos organismos. No tiene impacto contra el medio ambiente, puesto que los residuos generados, no son contaminantes, y los protocolos indican un manejo estricto y coordinado para la recolección de residuos durante los experimentos.

El estudio presenta algunas limitaciones, la prueba de *Artemia salina* se realiza con invertebrados, por lo tanto, debe ser considerada como una prueba preliminar de biocompatibilidad, a futuro se recomienda realizar pruebas de citotoxicidad con células.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectora de Investigaciones de la Universidad del Valle, Cali, por la financiación de este proyecto con Código CI 1844

DECLARACIÓN SOBRE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Primer, segundo y tercer autor: trabajo de campo y Corrección del manuscrito

Cuarto autor: redacción del manuscrito, análisis estadístico y corrección del manuscrito

Quinto autor: redacción del manuscrito

Sexto autor: redacción, seguimiento y aprobación

REFERENCIAS

1. Machado R, Silva Neto UX, Carneiro E, Fariniuk LF, Westphalen VP, Cunha RS. Lack of correlation between tubular dentine cement penetration, adhesiveness and leakage in roots filled with gutta percha and an endodontic cement based on epoxy amine resin. *J. Appl. Oral Sci.* 2014; 22(1):22–28. <https://doi.org/10.1590/1678-775720130247>
2. Koch KA, Brave DG. Bioceramics, part I: the clinician's viewpoint. *Dent Today.* 2012; 31(1):130-135.
3. Tedesco M, Chain MC, Felipe WT, Alves AMH, Garcia LDFR, Bortoluzzi EA, Cordeiro MR, Teixeira CS. Correlation between bond strength to dentin and sealers penetration by push-out test and CLSM analysis. *Braz Dent J.* 2019; 30(6):555–562. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902766>.
4. Singh H, Markan S, Kaur M, Gupta G. “Endodontic Sealers”: Current concepts and comparative analysis. *Dent Open J.* 2015; 2(1): 32-37. <https://doi.org/10.17140/doj-2-107>.
5. Öter B, Topçuoğlu N, Tank M. K, Çehreli S. B. Evaluation of Antibacterial Efficiency of Different Root Canal Disinfection Techniques in Primary Teeth. *Photomed Laser Surg.* 2018; 36(4): 179–184. <https://doi.org/10.1089/pho.2017.4324>
6. Kikly A, Jaâfoura S, Kammoun D, Sahtout S. Sealing Ability of Endodontic Cements: An In Vitro Study. *Int J Dent.* 2020; 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5862598>.
7. Primus C, Gutmann JL, Tay FR, Fuks AB. Calcium silicate and calcium aluminate cements for dentistry reviewed. *J Am Ceram Soc.* 2022; 105(3): 1841–1863. <https://doi.org/10.1111/jace.18051>.
8. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J.* 2018; 51(12): 1367-1388. <https://doi.org/10.1111/iej.12954>
9. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007; 33(4): 377-390. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>

10. Santiago DE, LaO Salas NO, Castellanos CI, Marzo SR. Algunos fundamentos de la endodoncia regenerativa con células madre en el diente permanente inmaduro no vital. *MEDISAN*. 2021; 25(2): 470–488.
11. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod*. 2015 Feb;41(2):146-154. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.003>
12. Muhammad W, Ullah N, Khans M, Ahmad W, Khan MQ, Abbasi BH. Why Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae is used as a screening system for nanomaterials? The science of procedure and nano-toxicology: A review. *Int J Biosci*. 2019; 14(5): 156-176.
13. Vanhaecke P, Persoone G. The ARC-test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*: methodology and evaluation. *Ecotoxicological Test Mar Environ*. 1984; 2:143-157.
14. Rotini A, Manfra L, Canepa S, Tornambè A, Migliore L. Can *Artemia* Hatching Assay Be a (Sensitive) Alternative Tool to Acute Toxicity Test? *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015; 95(6): 745-751. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1626-1>
15. Abushaala NM. Effects of tributyltin chloride on cell structures of epithelial layer in different stages of *Artemia salina*. *Open Vet J*. 2019; 9(4), 366-374. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i4.15>.
16. Pecoraro R, Scalisi EM, Messina G, Fragalà G, Ignoto S, Salvaggio A, et al. *Artemia salina*: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. *Microsc Res Tech*. 2020;84(3):531–536. <https://doi.org/10.1002/jemt.23609>
17. Libralato G. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Mar Environ Res*. 2014;101(1):38–43. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.08.002>
18. Strathmann RR. Culturing larvae of marine invertebrates. *Methods Mol Biol*. 2014; 1128:1-25. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-974-1_1
19. Demarchi CA, da Silva LM, Niedźwiecka A, Ślawska-Waniewska A, Lewińska S, Dal Magro J, et al. Nanoecotoxicology study of the response of magnetic O-Carboxymethylchitosan loaded silver nanoparticles on *Artemia salina*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020; 74. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103298>
20. Kamal IM, Abdeltawab NF, Ragab YM, Farag MA, Ramadan MA. Biodegradation, Decolorization, and Detoxification of Di-Azo Dye Direct Red 81 by Halotolerant, Alkali-Thermo-Tolerant Bacterial Mixed Cultures. *Microorganisms*. 2022; 10(5); 994. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050994>
21. Sarmiento PA, Ataíde TR, Fernandez BAP, Junio JXA, Leite LIM, Bastos MLA. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2014; 22(1): 165-172 <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3143.2385>.
22. Albuquerque P, Rocha T, Fernandes A, Araújo J, Leite I, Assis M. Evaluación del extracto de la *Zeyheria tuberculosa* en la perspectiva de un producto para cicatrización de heridas. *Rev Latino Am. Enfermagem*, 2014; 22(1). <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3143.2385%20>
23. Bender R, Lange S. Multiple test procedures other than Bonferroni's deserve wider use. *BMJ*. 1999;318(7183):600-601. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7183.600a>
24. Islam SU, Ahmed MB, Shehzad A, Lee YS. Methanolic Extract of *Artemia salina* Eggs and Various Fractions in Different Solvents Contain Potent Compounds That Decrease Cell Viability of Colon and Skin Cancer Cell Lines and Show Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 6(2019). <https://doi.org/10.1155/2019/9528256>

25. Omidi S, Javidi M, Zarei M, Mushakhian S, Jafarian A. Subcutaneous Connective Tissue Reaction to a New Nano Zinc-Oxide Eugenol Sealer in Rat Model. *Iran Endod J.* 2017;12(1): 64-69. <https://doi.org/10.22037/iej.2017.13>.
26. Vinola SMJ, Karthikeyan K, Mahalaxmi S. A novel petasin-modified zinc oxide eugenol sealer. *J Conserv Dent.* 2019; 22(5): 490-494. https://doi.org/10.4103/jcd.jcd_475_19
27. Raimara, GE. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol.* 2002; 39(2): 139-156.
28. Muñoz CJP, Arteaga ESX, Alvarado SAM. Observaciones acerca del uso del hidróxido de calcio en la endodoncia. *Dom Cien.* 2018; 4(1): 352-361. <https://doi.org/10.23857/dc.v4i1.747>
29. Farias MD, Matos FD, Carvalho NC, Almeida RP, Mendonça AA, Junior RA, et al. Assessment of intracanal medications cytotoxicity on I929 fibroblast cells. *Bioscience.* 2016; 32(2):566-573. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n2a2016-30974>
30. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Davut Capar I. In Vitro Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J.* 2017; 12(3): 354-359. <https://doi.org/10.22037/iej.v12i3.15415>.
31. Bu Hasna A, de Paula Ramos L, Campos TMB, de Castro Lopes SLP, Rachi MA, de Oliveira LD, et al. Biological and chemical properties of five mineral oxides and of mineral trioxide aggregate repair high plasticity: an in vitro study. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 14123. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17854-0>.
32. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008; 50(4): 397-402. <https://doi.org/10.2334/josnurd.50.397>
33. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(S2):63-72. <https://doi.org/10.1111/iej.12859>
34. Almeida MM, Rodrigues CT, Matos AA, Carvalho KK, Silva EJ, Duarte MA, et al. Analysis of the physicochemical properties, cytotoxicity and volumetric changes of AH Plus, MTA Fillapex and TotalFill BC Sealer. *J Clin Exp Dent.* 2020; 12(11): e1058-e1065 <https://doi.org/10.4317/jced.57527>
35. Alazrag MA, Abu-Seida AM, El-Batouty KM, El Ashry SH. Marginal adaptation, solubility and biocompatibility of TheraCal LC compared with MTA-angelus and biodentine as a furcation perforation repair material. *BMC Oral Health.* 2020;20(1): 298. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01289-y>