

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**EFFECTO DE CEMENTOS SELLADORES SOBRE LA VIABILIDAD DE  
OSTEOBLASTOS DEL HUESO ALVEOLAR *IN VITRO***

No. de registro 2015-6

Tesis que como requisito para obtener el grado de  
Especialista en Endodoncia

Presenta:

**CD. MELQUISEDEC RAMOS LÓPEZ**

**Director de Tesis:**

**DRA. GLORIA YOLANDA CASTRO SALAZAR**  
**DR. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA**

**Asesor:**

**DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA**

Culiacán Rosales, Sinaloa. Noviembre 2015

## DEDICATORIA

Gracias, primero Dios por darme la vida

Y después el amor de esta, mi familia.

Que me ha apoyado en momentos difíciles  
y ha sonreído conmigo en los momentos felices

Te doy gracias Dios por dejarme vivir  
y a ustedes padres por enseñarme a llorar y reír.  
Papá, mamá, nombres tan sencillos de pronunciar  
pero que siempre enaltecen de orgullo mi hablar  
por la fortuna de ser hijo suyo  
y con su ayuda mi meta alcanzar.

Con todo mi amor, cariño y el pecho de orgullo  
les doy gracias por su apoyo para mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a:

Al Posgrado en Endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme todos los conocimientos necesarios para lograr esta meta.

A las Dras. Gloria Yolanda Castro Salazar y Maribel Aguilar Medina, por guiarme en la realización de este trabajo de investigación, por su apoyo, por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme cada vez en ser mejor persona tanto en lo educativo como en lo personal.

Al Dr. Alfredo del Rosario Ayala Ham por su entrega en mi aprendizaje, por compartir conmigo sus conocimientos y sabiduría, por impulsarme a ser una persona mejor día a día, no hay palabras para expresar tanta gratitud a su noble trabajo.

A cada uno de mis maestros, Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar, Dr. Alfredo Ayala Ham, Dra. Verena Morales, Dra. Itzel Castro, Dr. Manuel Gómez Ruelas, Dra. Ilsa Inzunza, Dr. Omar Cazares por compartir sus conocimientos y contribuir a mi formación personal.

A la Dra. Margarita Castro por siempre estar dispuesta a ayudar de una manera desinteresada.

A mis amigos y compañeros por el tiempo que compartimos juntos.

## RESUMEN

**Introducción.** El objetivo del tratamiento endodóntico es la limpieza y conformación del sistema de conductos radicular y la obturación total del espacio preparado con un material inerte, estable y compatible. Los cementos selladores son sustancias que facilitan la obtención de un sellado hermético, deben ser tolerados por los tejidos periapicales, no ser mutagénicos, no provocar reacción inmunitaria, entre otros. **Objetivo.** Determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares (Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) sobre osteoblastos humanos. **Metodología.** Se colocaron 40 mg de los selladores en medio de cultivo durante 8 hrs. Se evaluó el efecto de los sobrenadantes sobre la viabilidad, citotoxicidad y proliferación de osteoblastos humanos a las 24, 72 y 96 hrs, empleando azul tripano, "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" y "CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay" (Promega, CA) respectivamente. El análisis estadístico se realizó en IBM SPSS v20 (IL, USA) utilizando ANOVA de un factor con significancia del 95%. **Resultados.** El AH Plus inhibió la proliferación en los tres periodos de evaluación y fue más citotóxico, el Roeko Seal permitió la proliferación en los tres periodos y mostró menor citotoxicidad. El MTA Fillapex y Sealapex mostraron moderada inhibición de la proliferación y ligera citotoxicidad inicial, la cual fue disminuyendo con el tiempo. **Conclusión.** Es importante conocer la biocompatibilidad de los cementos selladores, ya que están en contacto con el periápice y puede desencadenar un dolor post-operatorio y falta de cicatrización así como el fracaso del tratamiento.

**Palabras clave:** cemento sellador, biocompatibilidad, endodoncia.

## **ABSTRACT**

**Introduction.** The aim of the endodontic treatment is the cleaning and shaping of root canals system and the total sealing of the space prepared with an inert, stable and compatible material. The canal sealers cements are substances that facilitate obtaining a hermetic seal must be tolerated by the periapical tissues and not be mutagenic not cause immune response, among others.

**Objective.** Determine the in vitro effect of four root canal sealers cements (Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) on human osteoblasts.

**METHODOLOGY.** 40 mg of sealants were placed in culture medium for 8h. The effect of supernatants on viability, cytotoxicity and proliferation of human osteoblasts to 24, 72 and 96 h was assessed using trypan blue, "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" and "CellTiter 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay" ( Promega, CA) respectively. The statistical analysis was performed on IBM SPSS v20 (IL, USA) using one-way ANOVA with 95% significance. **Results.** The AH Plus inhibited proliferation in the three evaluation periods and was more cytotoxic, the RoekoSeal allowed the proliferation in all three periods and showed less cytotoxicity. The MTA Fillapex and Sealapex showed moderate inhibition of proliferation and slight initial cytotoxicity, which was decreasing with time. **Conclusion.** It is important to know the biocompatibility of the sealing cements, as they are in contact with the periapex and can trigger post-operative pain and scarring and lack of treatment failure.

**Keywords:** canal sealer, biocompatibility, endodontics.

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	8
II.	MARCO TEÓRICO .....	10
2.1.	Materiales de obturación .....	10
2.1.1.	Gutapercha .....	11
2.1.2.	Cementos selladores .....	12
2.1.2.1.	Roeko Seal .....	14
2.1.2.2	AH Plus .....	15
2.1.2.2	MTA Fillapex .....	17
2.1.2.2	Sealapex .....	17
2.2.	Compatibilidad biológica .....	18
2.3.	Células de osteoblastos .....	19
2.4.	ANTECEDENTES .....	21
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
IV.	JUSTIFICACIÓN .....	35
V.	OBJETIVOS .....	36
5.1.	OBJETIVO GENERAL .....	36
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
6.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
6.2.	MUESTRA DE ESTUDIO.....	37
6.3.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	38
6.4	LUGAR DE REALIZACIÓN .....	39
6.5	PROCEDIMIENTO.....	39
6.5.1	ENSAYOS DE VIABILIDAD .....	41

6.5.2	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN .....	41
6.6	ENSAYOS DE DAÑO CELULAR .....	42
6.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
VII.	RESULTADOS .....	44
7.1.	VIABILIDAD .....	44
7.2.	CITOTOXICIDAD .....	45
7.3.	PROLIFERACIÓN.....	53
VIII.	DISCUSIÓN.....	62
IX.	CONCLUSIONES.....	64
X.	BIBLIOGRAFÍA .....	65

# I. INTRODUCCIÓN

Los objetivos principales de un tratamiento endodóntico exitoso son la limpieza, conformación adecuada del conducto radicular así como la obturación total del espacio preparado con un material inerte, dimensionalmente estable y biológicamente compatible.

El órgano dental puede infectarse internamente y provocar un proceso inflamatorio en ocasiones crónico y algunas veces se producen reacciones clínicas que pueden provocar lesiones en órganos dentales distantes.

Para dar solución a este tipo de problema se realiza el tratamiento de conductos de los órganos dentales involucrados. Dicho tratamiento endodóntico consta de cinco pasos: realizar el acceso al órgano dental, longitud de trabajo, preparación biomecánica, obturación del sistema de conductos y sellado de la cavidad. Una vez logrado el desbridamiento del sistema, así como la limpieza y desinfección del mismo se obtura de forma tridimensional, permanente e impermeable con un material inerte, estable y biocompatible.

La obturación de los conductos radiculares es una de las etapas más difíciles dentro de un tratamiento endodóntico y frecuentemente constituyen la mayor preocupación del endodoncista por una razón predominante: la compleja y variable anatomía macroscópica y microscópica de los conductos radiculares.

En la actualidad se cree que el trasudado periapical se filtra hacia el conducto parcialmente obturado, este trasudado proviene indirectamente del plasma

sanguíneo y está compuesto de proteínas hidrosolubles, enzimas y sales, se menciona que el plasma es atrapado en el fondo del conducto mal obturado.

Este trasudado lejos del torrente sanguíneo experimenta degradación en ese lugar. Posteriormente el trasudado se difunde con lentitud hacia los tejidos periapicales y actúa como irritante ocasionando inflamación.

Se requiere de un cemento sellador para rellenar las irregularidades entre el material de obturación y las paredes del conducto principal, conductos laterales, accesorios y los espacios que quedan entre las puntas de gutapercha usadas en la condensación lateral. Éste se deposita en la zona más profunda del ápice en contacto directo con las células, permitiendo su destrucción, desencadenando inflamación, procesos inmunológicos, dolor postoperatorio lo que conlleva a evitar la reparación posterior al tratamiento, haciendo necesario realizar nuevas intervenciones quirúrgicas.

Por lo tanto, el propósito del presente estudio es determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares como son Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus sobre osteoblastos humanos.

## **II. MARCO TEÓRICO**

Los objetivos principales de un tratamiento endodóntico exitoso son la limpieza y conformación adecuadas del conducto radicular y la obturación total del espacio preparado con un material inerte, dimensionalmente estable y biológicamente compatible.

De todas las fases operatorias del tratamiento de conductos, la preparación biomecánica y la obturación del conducto que debe ser lo más hermética posible se considera como fundamental para tener el éxito de este tratamiento (1).

El relleno del conducto radicular es una combinación de cemento sellador con un material de núcleo central, que hasta ahora ha sido casi exclusivamente gutapercha. Este núcleo de gutapercha actúa como un pistón en el cemento sellador, haciendo que éste se extienda, así como también para llenar los espacios vacíos y compactar el material a la pared de dentina. En ocasiones la gutapercha sobrepasa el periapice al igual que el cemento sellador entrando contacto con los tejidos periapicales. De ello se deduce que el cemento sellador debe poseer biocompatibilidad y no desencadenar respuesta inflamatoria (2).

### **2.1. Materiales de obturación**

En 1800, el único material empleado para rellenar el conducto radicular era el oro. Posteriormente se utilizaron diversos materiales tales como, oxiclورو de zinc, parafina y amalgama, proporcionando éxito y satisfacción (3).

En 1847 Hill, desarrolló el primer material de relleno del conducto radicular a base de gutapercha con carbonatos de calcio blanqueado y cuarzo, el cual fue patentado en 1848 e introducido en la práctica odontológica (3).

El primer relleno de un órgano dental con gutapercha fue indicado por Bowman en 1867 y hoy en día sigue utilizándose con ciertas modificaciones y con cementos agregados que permiten un mejor sellado (4).

La presencia de algunas interfaces entre los materiales y la dentina radicular son sitios de posibles microfiltraciones ocasionando el paso de microorganismos y sus toxinas, por ello es necesario tomar en cuenta utilización de un cemento sellador que le va a permitir a la gutapercha y a la dentina una mejor unión sin que exista la presencia de espacios (5).

### **2.1.1. Gutapercha**

La gutapercha se deriva de los árboles de la familia *Sapotaceae*. Es un isómero de caucho (6). Los conos de gutapercha contienen aproximadamente un 20% de gutapercha, un 65% de óxido de zinc, un 10% de sustancias radiopacas y un 5% de plastificadores (7). Se puede encontrar en dos formas cristalina fase  $\alpha$  o  $\beta$ . La forma alfa proviene directamente del árbol, sin embargo, la mayor parte de la gutapercha disponible es en fase beta (8). La fase  $\alpha$  es más fluida y se ablanda a temperatura más baja (9).

Tradicionalmente la forma beta de la gutapercha se ha utilizado para fabricar las puntas, ya que presentan mejor estabilidad, dureza y viscosidad reducida (8).

Cuando la gutapercha es sometida a temperaturas altas alcanza una consistencia que muchas veces permite el desbordamiento del material hacia los tejidos perirradiculares provocando una reacción inflamatoria (10).

Sus principales ventajas son plasticidad, fácil manipulación, mínima toxicidad, radiopacidad y fácil eliminación con calor o disolventes. Las desventajas incluyen falta de adhesión a la dentina y cuando se calienta, retracción al enfriarse (11).

### **2.1.2. Cementos selladores**

A pesar de que los cementos selladores dicen ser biocompatibles y bien tolerados por los tejidos perirradiculares. Peralta menciona, “Todos presentan cierto grado de toxicidad cuando recién se realiza la mezcla, esta citotoxicidad disminuye cuando fraguan” (12). La citotoxicidad, la genotoxicidad, la propiedad antimicrobiana y el potencial alergénico son parámetros que definen la biocompatibilidad de un sellador (13).

Las funciones principales de los cementos selladores es lograr el sellado del sistema de conductos, así como de las irregularidades que éste presenta. Además de los requisitos básicos para materiales de obturación, Grossman enumeró once requisitos y características del buen sellador de conductos radiculares: (14)

1. Debe ser adherente cuando se mezcle, para proporcionar buena adhesión entre el material y la pared del conducto al fraguar.

2. Lograr un sellado hermético.
3. Ser radiopaco, a fin de poder observarse en la radiografía.
4. Las partículas de polvo ser muy finas para que puedan mezclarse fácilmente con el líquido.
5. No contraerse al fraguar.
6. No marchar la estructura dentaria.
7. Ser bacteriostático o por lo menos, no debe favorecer la reproducción de bacterias.
8. Fraguar con lentitud.
9. Ser insoluble en los líquidos bucales.
10. Ser bien tolerado por los tejidos, por consiguiente no irritar los tejidos periapicales.
11. Ser soluble en solvente, por si fuera necesario retirarlo del conducto radicular.

Agregando también que no debe provocar una reacción inmunitaria en los tejidos periapicales (15, 16). Así como no debe ser mutagénico ni carcinogénico (17, 18).

Los materiales selladores se clasifican de acuerdo a su composición en: selladores a base de óxido de zinc y eugenol, de resinas, de hidróxido de calcio, de ionómeros vítreos, de resinas compuestas y agentes de adhesión a dentina, de cementos fosfato de calcio y de silicones

### **2.1.2.1. Roeko Seal**

Roeko Seal consiste en polidimetilsiloxano, aceite de silicona, aceite de parafina-base, ácido hexacloroplatínico (catalizador) y dióxido de zirconio (material radiopaco) (19). Se aplica con una jeringa de doble cámara donde los dos componentes se mezclan de forma homogénea y sin que se formen burbujas. Tiene una elevada fluidez, es insoluble, biocompatible, estable dimensionalmente. Puede usarse en conductos secos o húmedos, es radiopaco y tiene un tiempo de trabajo de 15 - 30 minutos (20).

Se expande en 0,2% durante las primeras 4 semanas y se mantiene estable a partir de entonces lo que mejora su capacidad de sellado sin crear fuerzas excesivas dentro del conducto radicular (21).

Roeko Seal es considerablemente menos citotóxico que los cementos selladores a base de resina epoxi (22). Además en diversos estudios Roeko Seal muestra que fue sólo poco citotóxico o completamente no citotóxico incluso en condición fresca (23-26).

Sus propiedades químicas y físicas cumplen con todos los requisitos de un sellador de conductos radiculares. Roeko Seal combina las propiedades del material excepcionales como excelente fluidez, sin contracción y biocompatibilidad con el manejo práctico. No hay riesgo de mezcla incorrecta. Roeko Seal proporciona un sello excelente y establece nuevos estándares en calidad y biocompatibilidad en endodoncia. Roeko Seal fluye tan bien que el conducto

radicular y conductos laterales se rellenan con eficacia. A las pruebas de efectos mutagénicos y pruebas de sensibilización todos mostraron resultados negativos.

Ventajas: es biocompatible, tiene adhesión mecánica a la pared del conducto debido a la expansión, excelentes propiedades del material y la fluidez, fácil de retirar en caso de ser necesario para un retratamiento, no contiene eugenol y es altamente radiopaco para una excelente evaluación de rayos X (27).

### **2.1.2.2 AH Plus**

Sellador a base de resina, fue desarrollado hace más de 50 años por Andre Schroeder en Suiza (19). Es una resina de bis-fenol utilizando metanamina para la polimerización. Como metenamina (también conocida como urutropin) emite algunos formaldehídos durante la relación de ajuste (28).

Se buscaron algunos sustitutos y se encontraron en una mezcla de aminas que podría efectuar la polimerización sin la formación de formaldehído resultando en el desarrollo del producto AH Plus.

El AH Plus tiene un tiempo de trabajo de 4 hrs aproximadamente (29), es un sellador radicular pasta/pasta de dos componentes basado en una resina epoxi-amina, que ofrece las siguientes características: propiedades de sellado de larga duración, sobresaliente estabilidad dimensional, propiedades auto-adhesivas, radiopacidad elevada, documentación científica excelente en múltiples estudios

clínicos e *in-vitro*, usado como referencia y standard en múltiples estudios, como materiales de relleno para conductos radiculares.

El AH Plus se presenta en las siguientes formas: como AH Plus en tubos para mezcla manual de las pastas A y B, como jeringa de mezcla AH Plus Jet para aplicación intra-oral directa, ofreciendo un procedimiento más preciso, conveniente y rápido. La composición AH Plus pasta A AH Plus, pasta B, resina epoxi de Bisfenol-A, dibenzil-diamina, resina epoxi de Bisfenol-F, aminoadamantano, tungstenato de calcio triciclo-decano-diamina, óxido de zirconio, tungstenato de calcio, sílice, óxido de zirconio, óxido de hierro, sílice, aceite de silicona.

La contraindicación del AH Plus ocurre en pacientes que presentan hipersensibilidad a las resinas de epoxi, aminas u otros componentes del material porque el AH Plus contiene resina epóxica (pasta A) y aminas (pasta B) los cuales pueden causar sensibilización en personas susceptibles. No utilice AH Plus en personas alérgicas a las resinas epóxicas, aminas o cualquier otro componente del producto. Evite el contacto con la piel o contacto con los ojos.

Las siguientes reacciones adversas han sido descritas en usuarios de selladores que contienen resinas de epoxi: puede ocurrir una inflamación aguda reversible tras el contacto de la mucosa oral con la pasta sin fraguar. En casos individuales se han descrito reacciones alérgicas locales y sistémicas (30).

### **2.1.2.2 MTA Fillapex**

El MTA Fillapex se compone de resina de salicilato, diluyente de resina, resina natural, óxido de bismuto, nanopartículas de sílice y el agregado de trióxido mineral. Según el fabricante, tiene las siguientes propiedades físicas: tiempo de trabajo de 35 min, capacidad de flujo 27,66 mm, tiempo de fraguado 130 min, densidad óptica del 77% y solubilidad 0,1%. Por otra parte, es fácilmente manipulado (31). De acuerdo con un ensayo de citotoxicidad, el MTA Fillapex fue más citotóxico en cultivos de fibroblastos en el comienzo pero se desarrolló el mejor comportamiento después de 48 horas (32). Un estudio mostró que aplicación subcutánea MTA Fillapex produce una reacción inflamatoria crónica moderada evidente en el 7<sup>o</sup> día, que se resolvió en un corto período de tiempo (15 días), similar a la inducida por Angelus MTA y más rápido que la inducida por Sealapex (33).

### **2.1.2.2 Sealapex**

Es un cemento que contiene hidróxido de calcio y que se administra como pasta en tubos colapsables. Su base también es óxido de zinc y contiene  $\text{Ca(OH)}_2$  así como también butilbenceno, sulfonamida, y estearato de zinc. El tubo catalizador contiene sulfato de bario y dióxido de titanio como radiopacificadores, así como una resina de patente, salicilato de isobutilo y aerosil R972.

En humedad al 100% tarda tres semanas en alcanzar su fraguado final. En una atmósfera seca nunca fragua, es el único sellador que se expande mientras fragua. (34).

Los cementos selladores de  $\text{Ca(OH)}_2$  se diseñaron para ofrecer actividad terapéutica. Se creía que esos cementos selladores podrían tener actividad antimicrobiana y quizá tuviesen un potencial osteogénico- cementogénico, sin embargo estas acciones no han sido demostradas. La solubilidad es necesaria para la liberación de  $\text{Ca(OH)}_2$  y para mantener su actividad (35).

## **2.2. Compatibilidad biológica**

La biocompatibilidad de un sellador endodóntico contribuye al éxito clínico de la terapia endodóntica, ya que un material tóxico puede retrasar la reparación de los tejidos periapicales o causar una reacción tisular inflamatoria (36).

Waltimo reporta que es importante la compatibilidad biológica de selladores de conducto radicular ya que estos materiales frecuentemente entran en contacto con los tejidos periapicales y la respuesta de los tejidos a estos materiales puede influir en el resultado final del tratamiento de conducto (25).

El concepto tradicional de biocompatibilidad se considera como una falta de reacción adversa significativa entre los tejidos del huésped (37).

Ahora se reconoce que hay pocos cementos selladores que no afecten los tejidos, ya que si hubiera materiales que no causaran reacciones con los tejidos del

huésped estos pudieran permitir o estimular a una reparación o regeneración después del tratamiento. Una definición actualizada de biocompatibilidad podría ser la capacidad de un material restaurador para inducir una respuesta apropiada para el huésped (38). Nuestro estudio se basó en efecto que causan los cementos selladores en contacto con células de osteoblastos humanos.

### **2.3. Células de osteoblastos**

El proceso de remodelación ósea implica una serie de pasos que se inician a partir de un estímulo del tejido óseo, que puede ser inducido o provocado por una lesión. Los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos son las células identificables en el tejido óseo. Los osteoblastos son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ) y tienen una morfología particular (aspecto piriforme). Se caracterizan por ser células mononucleares de núcleo grande, con aparato de Golgi y retículo endoplasmico muy desarrollado y con abundantes mitocondrias, éstas derivan de células mesenquimatosas pluripotenciales, también llamadas células madre. Son células polarizadas diferenciadas que sintetizan el colágeno y la sustancia fundamental ósea. Participan en el proceso de mineralización de la matriz orgánica produciendo vesículas de matriz que acumulan iones calcio y fosfato y son ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que inducen la creación de centros de nucleación para el depósito de las sales minerales. Su vida activa se encuentra entre una y diez semanas; al final de este periodo toman dos destinos posibles: ser rodeadas por la matriz ósea que producen y convertirse en osteocitos

(15%), o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo (39).

Con la eliminación en la lesión apical de elementos extraños y/o de agentes infecciosos, se estimula la apoptosis de células involucradas en la primera etapa destructiva y se promueve la respuesta reparativa sobre los acontecimientos implicados en el tejido de granulación y la angiogénesis para restaurar la integridad funcional de la región apical. Con respecto al tejido óseo, en la etapa proliferativa, las células mesenquimáticas pueden diferenciarse en osteoblastos que van a producir matriz ósea. En este proceso están involucradas moléculas biológicamente activas como los factores de crecimiento (FCT B, FCI y FCF) y las citocinas (interleucinas, monocinas y linfocinas). Estas últimas son reguladoras de crecimiento y encargadas de la diferenciación de células del sistema inmunológico y hematopoyético. Durante esta fase el tejido de granulación es remodelado y madurado hacia la formación de una cicatriz. Se inicia el proceso de osteogénesis y mineralización.

La formación de cristales de hidroxapatita se realiza diez días después del comienzo de la reparación. Hay un aumento del pH y de la enzima fosfatasa alcalina. Esta promueve la precipitación de fosfato de calcio, el cual inicia la mineralización. La misma está limitada al espacio físico disponible por las fibras de colágeno dispuestas longitudinalmente. El suministro sanguíneo es de suma importancia tornándose indispensable para finalizar el proceso reparativo. La reparación de cemento resulta de la diferenciación de cementoblastos a partir de

células indiferenciadas del ligamento periodontal o tejido de granulación. Estas células, muestran niveles elevados de fosfatasa enzimática, la cual está íntimamente relacionada con la formación de hueso y de cemento. Por lo tanto, la actividad específica del ligamento periodontal, los fibroblastos, los cementoblastos y osteoblastos logran en conjunto, poco a poco, la total reparación de los tejidos lesionados (40).

## **2.4. ANTECEDENTES**

En 1976 Antrim, evaluó la citotoxicidad de diferentes cementos selladores en cultivos celulares *in vitro* como fueron el cemento de Grossman, N2 (permanente), cemento de Rickert y Cavit. Como resultado el cemento de Grossman resultó ser el más citotóxico, seguido de N2, Rickert y Cavit. Grossman y N2 mostraron considerablemente alta toxicidad, Rickert mostró moderada toxicidad y Cavit mostró de leve a moderada toxicidad (41).

Nakamura y cols. (1986), estudiaron la citotoxicidad de cementos selladores de conductos. Se evaluaron Canals, Neodyne, FR, AH26, Tubli-Seal, y Nogenol. Nogenol mostró leve citotoxicidad en las soluciones de evaluación 1, 2 y 3 semanas. Moderada citotoxicidad fue observada en la solución de 1 y 3 semanas de Canals en todos los días experimentales. Moderados resultados fueron observados en solución de 1 semana de Neodyne en 2 o 3 días. Tubli-Seal mostró moderada citotoxicidad en solución de 2 o 3 semanas. FR generalmente mostró

severa citotoxicidad en la solución de 1, 2 y 3 semanas. Severa citotoxicidad se mostró en solución de 1, 2 y 3 semanas de AH26 (42).

En un estudio realizado por Spangberg y Pascon en 1988, analizaron la importancia de la preparación de los materiales en la expresión de citotoxicidad durante una evaluación *in vitro* de biomateriales. Los materiales fueron rutinariamente evaluados y los resultados mostraron que la preparación de los materiales muestra alteración significativa en el efecto de la citotoxicidad de los materiales (43).

Investigadores como Briseño en 1990, evaluó la citotoxicidad de cementos selladores de conductos radiculares en fibroblastos de encía humana a base de óxido de zinc y eugenol concluyendo que evidentemente la citotoxicidad de los selladores no disminuye y en la mayoría de los casos la actividad persiste durante el cultivo de 21 días (44).

De igual manera Briseño y Willershausen (1991), estudiaron la citotoxicidad de cementos selladores a base de resina y silicón en fibroblastos gingivales humanos. Se evaluaron los cementos AH26 y Diaket a base de resina y Lee Endo-Fill a base de silicón por un periodo de 21 días. AH26 mostró en un periodo de 24 horas severa citotoxicidad que permaneció durante todo el periodo experimental, mientras que Diaket y Lee Endo-Fill mostraron una baja citotoxicidad relativa observada en el grupo de las 48 horas, sin embargo, la citotoxicidad es similar para todos los cementos en el grupo de 24 horas (45).

Briseño y cols. En 1992 Estudiaron la citotoxicidad de cementos selladores de conductos radiculares con fibroblastos gingivales humanos, con sellador a base de hidróxido de calcio, y encontraron el siguiente resultado, Sealapex mostró que tiene baja citotoxicidad después de 3 días de cultivo. Aunque CRCS mostró alta citotoxicidad durante la fase inicial, la cual decrece después de los 3 días (46).

En 1993 Araki y cols, redujeron la citotoxicidad de un cemento sellador sustituyendo eugenol. Investigaron la citotoxicidad de dos cementos selladores a base de óxido de zinc, uno con eugenol y el otro usando ácidos grasos. Los resultados mostraron que la citotoxicidad de los selladores puede ser reducida reemplazando eugenol por ácidos grasos (47).

Investigadores como Araki y cols. (1994), estudiaron la citotoxicidad indirecta, longitudinal de cementos selladores en células L929 heteroploides de fibroblastos de ratón y fibroblastos humanos diploides del ligamento periodontal humano. Los conductos radiculares con una mezcla fresca mostraron citotoxicidad más alta para las líneas celulares. Después de las 24 horas ninguna citotoxicidad fue detectada. Los resultados indican que sustituyendo el eugenol la citotoxicidad de los selladores decrece (48).

Gerosa y cols. (1995), obtuvieron cultivos celulares de pacientes sanos para evaluar citotoxicidad de seis diferentes cementos endodónticos: AH-26, Pulp Canal Sealer, Rocanal-R2, Rocanal-R3, Bioseql, y Endomethasone y observaron severa toxicidad en la primera y segunda semana con AH-26 (49).

Para evaluar la citotoxicidad de cuatro cementos selladores Torabinejad y cols. (1995), realizaron un estudio en el que se evaluó citotoxicidad utilizando los métodos de superposición y agar radiocromático, de amalgama, Super EBA, IRM y MTA. Siendo menos citotóxico el MTA, seguido de la amalgama, Super EBA y el IRM. Basado en estos resultados el MTA es un material potencial para evaluaciones *in vivo* (50).

Investigadores como Chang y cols. (1998), evaluaron *in vitro* la citotoxicidad y genotoxicidad de medicamentos intraconducto en fibroblastos de la pulpa humana. Se estudiaron los efectos de fenol alcanforado y paraclorofenol alcanforado, se observó que paraclorofenol alcanforado es más citotóxico que el fenol alcanforado, pero no causan genotoxicidad en las células pulpares (51).

Osorio y cols. (1998), compararon la citotoxicidad de materiales endodónticos. En el análisis estadístico el resultado mostró que CRCS fue el más citotóxico para las células L929 seguido de Endomet y AH26, mientras que MTA no fue citotóxico, Gallium GF2 mostró poca citotoxicidad, Sin embargo, Ketac Silver, Super-EBA y Amalgama mostraron niveles altos de citotoxicidad (52).

Asimismo Leyhausen y cols. (1999), evaluaron genotoxicidad y citotoxicidad de un cemento sellador a base de resina epóxica AH Plus. Como resultado se muestra que AH Plus puede causar una leve o nula injuria. Además, no fue revelada ni genotoxicidad ni mutagenicidad con AH Plus (53).

De igual manera Tai y Chag., en el 2000 realizaron un estudio en el que evaluaron la citotoxicidad de materiales de reparación de perforación en reparaciones de

células de ligamento periodontal humano *in vitro*. Se utilizaron tres materiales de reparación que fueron amalgama, ionómero de vidrio y resina. La resina exhibe niveles más altos de citotoxicidad seguido por el ionómero y la amalgama, y estos presentan una reacción más favorable para las células del ligamento periodontal humano que la resina (54).

En el año 2000 Willershausen y cols., compararon la citotoxicidad de materiales de relleno del conducto radicular en tres diferentes líneas celulares humanas. El crecimiento celular, la morfología celular, la viabilidad celular, el contenido de proteína de las células, y la liberación de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) fueron utilizados como parámetros para determinar la citotoxicidad de los materiales. Este estudio investiga la compatibilidad biológica de 5 cementos selladores que se evaluaron en fibroblastos de encía, fibroblastos nasales y en células de un tumor epitelial. Se demostró que PGE<sub>2</sub> mostró diferencias significativas entre los materiales. Un incremento no significativo se encontró con Sealapex, Endion y Super-EBA, y un incremento significativo se encontró con Ketac Endo, AH Plus y puntas de gutapercha con cemento de hidróxido de calcio (55).

En el mismo año 2000 Gheshlaghi y cols., evaluaron *in vitro* la citotoxicidad de un nuevo cemento sellador a base de resina epóxica. AH26 induce efectos citotóxicos después de una semana, y sufre una reducción substancial en citotoxicidad (20).

En una investigación realizada por Leonardo y cols. (2000), evaluaron la citotoxicidad de cinco cementos selladores en cultivos celulares de macrófagos peritoneales. Se evaluaron Sealapex, CRCS, Apexit, Sealer 26 y Fill Canal en

macrófagos peritoneales de rata. El sellador más citotóxico fue Fill Canal seguido por CRCS, Sealer 26, Apexit y Sealapex (56).

Keiser y cols. (2000), estudiaron la citotoxicidad del Mineral Trióxido Agregado en fibroblastos de ligamento periodontal humano. Se comparó la citotoxicidad del MTA con Super-EBA y amalgama. Los materiales se expusieron por 24 horas a diferentes concentraciones, la mayor citotoxicidad se observó con amalgama seguida por Super-EBA y finalmente MTA (57).

En un estudio *in vitro* sobre la citotoxicidad de dos cementos selladores realizado por Cohen y cols. (2000), se estudiaron AH26 y AH-Plus sobre la línea celular L929 de ratón, después de un periodo de observación de 48 horas se observó una severa citotoxicidad en ambos (58).

Investigadores como Gheshiaghi y cols. en 2000, evaluaron la citotoxicidad de un nuevo cemento a base de resina epóxica, el cultivo de fibroblastos fue incubado directamente con extracto del cemento sellador en diferentes tiempos de intervalo. Como resultados AH Plus induce una significativa citotoxicidad en las primeras fases del tratamiento y desaparece después de 4 horas (59).

Un año después Tai y cols. (2001), evaluaron la citotoxicidad de materiales de relleno de conducto radicular en cultivos primarios de fibroblastos orales humanos diferentes (derivado de la encía y la mucosa bucal) y una línea de células de hámster permanente (V79 células) en el que los resultados mostraron que todos los cementos selladores fueron citotóxicos para cultivos primarios de fibroblastos

orales y células V79 y se encontró que N2 fue el más tóxico entre los cultivos analizados (60).

Al estudiar el efecto citotóxico de los cementos selladores utilizados sobre el tejido periapical Topalian M. (2002), concluyen que aunque todos los cementos selladores disponibles actualmente producen diferentes grados de irritación sobre los tejidos periapicales en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha comprobado que en la gran mayoría de los casos este efecto desaparece sin causar daños irreparables sobre los tejidos que impidan irreversiblemente la cicatrización (61).

De igual manera Oliveira (2003), evaluó *in vitro* la citotoxicidad de dos cementos selladores en actividad de macrófagos. Se observó el efecto de dos cementos selladores a base de óxido de zinc y eugenol, frescamente preparado y después de 24 horas para evaluar su efecto en adherencia, actividad fagocítica y producción de interleucina-12 y óxido nítrico. Los resultados concuerdan que la citotoxicidad no decrece y aumenta entre más fresco sea el cemento sellador (62).

Camps y cols., en 2003 realizaron un estudio de citotoxicidad de selladores endodónticos: un nuevo método de inmersión-radicular. El propósito de este estudio fue comparar la citotoxicidad de los selladores del conducto de tres raíces probadas con las normas ISO frente a la técnica de inmersión-radicular. La hipótesis es que la citotoxicidad de los selladores de conducto radicular es mucho mayor cuando se prueba con las normas ISO en comparación con la técnica de inmersión-radicular. En los resultados la citotoxicidad de Sealapex decrece con el tiempo, pero la de AH Plus y Cortisomol no. La técnica mostró diferencias

significativas entre los selladores, pero fueron pequeñas y no tuvieron relevancia clínica (63).

Asimismo investigadores como Zhang y cols. (2003), evaluaron la citotoxicidad de MTAD usando el método de reducción metabólica del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico (MTT-Tetrazolium) en fibroblastos L929, basado en los resultados de este estudio, MTAD tiene una citotoxicidad más baja que todos los demás, como la pasta de hidróxido de calcio mezclada con agua oxigenada, seguido del hipoclorito de sodio, el Peridex y por último el EDTA, siendo el MTAD el menos citotóxico en este estudio (64).

En el año 2005 Miletic y cols., evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores como RoekoSeal y AH Plus *in vitro* en células de carcinoma cervical y fibroblastos de piel de ratón. AH Plus mostró significativamente mayor citotoxicidad en las evaluaciones de 1, 24 y 48 horas. Concluyendo que RoekoSeal no es citotóxico (65).

En el estudio *in vitro* realizado por Peralta (2006), de la citotoxicidad de tres selladores endodónticos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929 concluyendo que debido a que el cemento RSA no mostró citotoxicidad, pareciera que los selladores a base de silicona constituyen la primera elección para el tratamiento de conductos (12).

Key y cols. (2006), estudiaron la citotoxicidad de un cemento sellador de conductos a base de resina llamado Resilon. Es un material de poliéster que es un material de relleno sólido. Este producto viene con su propio sellador de resina. Se

estudió en fibroblastos de encía humana en el que encontraron que Resilon tuvo un resultado similar que la gutapercha y el grupo control. Epiphany que es el otro material de estudio, fue menos citotóxico que el cemento de Grossman a la hora 1 y a las 24 horas, Epiphany fue más citotóxico que Sealapex en la primera hora. Se indica que Resilon es el de más baja citotoxicidad (66).

En otro estudio Pinna y cols. (2008), compararon la citotoxicidad de MetaSeal y un sellador metacrilato a base de resina con una base de resina epóxica y con un sellador a base de óxido de zinc y eugenol. Se prepararon discos de 5 mm de diámetro para los distintos selladores y se pusieron en contacto con las células de osteosarcoma de rata parecidas a odontoblastos. MetaSeal resultó más citotóxico que AH Plus durante la primera semana (67).

Khashaba y Chutkan (2009), realizaron un estudio comparativo para determinar la biocompatibilidad de tres cementos selladores a base de fosfato de calcio y compararon la respuesta de citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos y una línea celular de fibroblastos de ratón (L929). Como resultado todos los materiales mostraron citotoxicidad para la línea celular L929 y fibroblastos gingivales humanos a las 24 horas. Células L929 fueron generalmente más sensibles que los fibroblastos gingivales humanos a los cementos selladores a base de fosfato de calcio (68).

En una revisión realizada por Desai y Chandler (2009) sobre cementos selladores a base de hidróxido de calcio que se llevó a cabo con experimentos de laboratorio y estudios clínicos evaluando diferentes propiedades como biocompatibilidad,

fuga, adhesión, solubilidad, propiedades antibacteriales y efectos de la salud periodontal. Como resultado comparativos estudios revelan leve citotoxicidad, pero su efecto antibacterial es variable. Futuros estudios se requieren para establecer las propiedades de cementos selladores a base de hidróxido de calcio en tejido sano (69).

En Brasil Gomes-Filho y cols. (2009), realizaron un estudio en el que evaluaron la citotoxicidad de un reciente sellador compuesto de cemento portland llamado Endo-CPM-Sealer y llegaron a la conclusión de que ningún material es considerado citotóxico en cultivos de fibroblastos (70).

Para investigar la relación entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad de agentes selladores Lioni (2010) realizó un estudio en el cual concluye que todos los selladores producen cierto grado de toxicidad sobre los tejidos periapicales. (13)

En 2010 Bae y cols., realizaron un estudio sobre células de ligamento periodontal humano junto a un nuevo cemento sellador de fosfato de calcio en el que los resultados consisten en que la citotoxicidad de CAPSEAL I y II es parecida a la de AH26 y EWT después de 1 a 14 días (71).

Xu y cols. (2010) evaluaron la citotoxicidad del RealSeal en células MG63 parecidas a osteoblasto humano, la gutapercha resultó no tóxica para las células *in vitro*, mientras que el RealSeal mostró una toxicidad inicial después de un día de cultivo y desaparece después de 3 días. El RealSeal fue más citotóxico que el AH Plus (72).

En el estudio realizado por Loshine y cols. (2011), en el cual evaluaron la citotoxicidad y propiedades de un cemento sellador mezclado biocerámico, encontraron que el sellador exhibe severa toxicidad a las 24 horas (73).

Para estudiar sobre citotoxicidad de cementos selladores Bethany (2011), realizó un estudio donde concluye que todos los cementos exhiben severa citotoxicidad a las 24 hrs. La citotoxicidad de AH Plus disminuyó gradualmente y fue no citotóxico, mientras que sellador BC tuvo moderada citotoxicidad pasado el periodo de 6 semanas (74).

En el año 2012 Bin y cols., estudiaron la citotoxicidad y genotoxicidad de cementos selladores basados en MTA. Se utilizaron fibroblastos de hámster chinos y se pusieron en contacto con las diferentes soluciones previamente expuestas a los materiales, El ensayo de micronúcleos (MNT) se puede usar para detectar mutaciones cromosómicas, clastogenicidad, y aneugenicidad, porque los cromosomas y sus fragmentos pueden conducir a la formación de micronúcleos durante la interfase del ciclo celular, los resultados de este estudio mostraron que el remanente de células viables fue de aproximadamente el 50% en el grupo de MTA blanco en todas las diluciones y que AH Plus induce una inmediata citotoxicidad independientemente de la dilución. MTA Fillapex y AH Plus mostraron una baja viabilidad celular a causa del incremento de la formación de micronúcleos comparado con el grupo control (32).

Investigadores como Lee y cols. (2012), estudiaron la citotoxicidad de un nuevo cemento de relleno radicular Ortho MTA, se usaron células MG-63 derivadas de

un osteosarcoma humano, las células fueron expuestas a los extractos de los materiales de prueba y fueron incubadas. Como conclusiones ProRoot MTA y GIC mostraron buena biocompatibilidad en el estudio, mientras que Ortho MTA mostró baja biocompatibilidad (75).

De igual manera Silva y cols. (2013), evaluaron la citotoxicidad y propiedades fisicoquímicas de un sellador endodóntico basado en silicato de calcio, MTA Fillapex, en el estudio se evaluó la citotoxicidad en periodos de 1 a 4 semanas, y se encontró que MTA Fillapex fue más citotóxico que AH Plus. También se mostró que MTA Fillapex presenta un pH alcalino en el tiempo experimental, mientras que AH Plus mostró un pH neutro y significativamente menor que MTA Fillapex (76).

Asimismo Lee y cols. (2013), investigaron las características de nuevos cementos selladores utilizando resina epóxica y cemento portland. Los resultados mostraron que la resina epóxica en un corto tiempo muestra menos microfiltraciones comparado con MTA. Bajo las condiciones del estudio se encontró que el nuevo material compuesto por resina epóxica y cemento portland presenta radioopacidad favorable, corto tiempo de fraguado, baja micro filtraciones y clínicamente una aceptable baja citotoxicidad (77).

Tavares y cols. (2013), analizaron las reacciones del tejido conectivo en contacto con MTA Fillapex, comparada con un sellador a base de óxido de zinc y un material con base de resina epóxica en ratas Windstar. Al final del periodo experimental de 7 días, todos los selladores puntuaron más alto que los del grupo de control en las variables de los linfocitos, MTA Fillapex presentó menor

condensación de fibra en comparación con los demás, después de 60 días macrófagos y linfocitos mostraron significancia alta para MTA Fillapex y Endofill comparado con el control negativo y AH Plus mostró resultados similares a los relatados (78).

Es importante analizar los cementos selladores con células humanas como los osteoblastos ya que en diferentes estudios, los distintos cementos selladores como son AH Plus, Roeko Seal, Sealapex y MTA Fillapex muestran diferentes niveles de citotoxicidad con diferentes tipos de células humanas, o líneas celulares de ratón, esto en la consulta clínica podría derivar en un fracaso al tratamiento de conductos o el retraso de la reparación biológica del periapice, todo esto resulta contradictorio con lo que los fabricantes de cada material afirman acerca de la biocompatibilidad de cada producto.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cemento se deposita en la zona más profunda del ápice, en muchas ocasiones puede estar en contacto directo con los osteoblastos del hueso alveolar pudiendo generar destrucción celular y procesos inmunológicos como inflamación y dolor postoperatorio.

¿Cuál de los 4 cementos selladores: Roeko Seal (Silicona), Sealapex (hidróxido de calcio), MTA Fillapex (MTA) o AH Plus (Resina) es más biocompatible con los osteoblastos del hueso alveolar humano?

## **IV. JUSTIFICACIÓN**

Es posible que los selladores empleados en el tratamiento de conductos, sobrepasen el foramen apical entrando en contacto directo con las células que se encargan de la reparación del periodonto, entre ellas están los osteoblastos del hueso alveolar. El contacto directo de estas sustancias pueden ocasionar daño celular, inflamación y daño a las tejidos periapicales, pudiendo retardar la reparación o regeneración necesaria de los tejidos, incluso nos puede llevar al fracaso del tratamiento de conductos.

Por esta razón es importante evaluar el efecto que presentan diferentes cementos selladores sobre la viabilidad de osteoblastos humanos.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares sobre la viabilidad de osteoblastos del hueso alveolar humanos.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la citotoxicidad, proliferación y daño celular de osteoblastos humanos en diferentes tiempos de contacto con Roeko Seal.
- Evaluar la citotoxicidad, proliferación y daño celular de osteoblastos humanos en diferentes tiempos de contacto con Sealapex.
- Evaluar la citotoxicidad, proliferación y daño celular de osteoblastos humanos en diferentes tiempos de contacto con MTA Fillapex.
- Evaluar la citotoxicidad, proliferación y daño celular de osteoblastos humanos en diferentes tiempos de contacto con AH Plus.
- Comparar los efectos de los cuatro cementos selladores en osteoblastos humanos.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizó una investigación experimental, *in vitro*, longitudinal, prospectiva.

### **6.2. MUESTRA DE ESTUDIO**

Se utilizó línea de cultivo de osteoblastos tomadas en el Laboratorio de Microbiología Molecular, FCQB.

### **6.3 CEMENTOS SELLADORES**

Los cementos selladores usados para este estudio fueron el Cemento de Portland MTA FILLAPEX (Angelus,PR, Brasil) Hidróxido de Calcio, Sealapex (Sybronendo, CA,USA) Resina Epóxica, AH Plus (Dentsply, Konstanz, Alemania). Sellador de Silicón, RoekoSeal (Alemania).

## 6.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Definición	Tipo	Clasificación	Codificación	Medida
Citotoxicidad	El conteo de muerte celular	Cuantitativa	Discreta		Células
Biocompatibilidad	El conteo de prevalencia celular	Cuantitativa	Discreta		Células
Proliferación	La multiplicación celular del numero original	Cuantitativa	Discreta		Células
Tratamiento	Cementos	Cualitativa	Discreta	1. AH Plus 2. Sealapex 3. Roeko Seal 4. MTA Fillapex	Células

## **6.5 LUGAR DE REALIZACIÓN**

Este trabajo se realizó en el edificio de la Facultad de Odontología en la Unidad de Posgrado, Especialidad en Endodoncia en colaboración de los laboratorios de inmunología y microbiología molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

## **6.6 PROCEDIMIENTO**

Se prepararon los medios de cultivo con los 4 cementos a las dos concentraciones que serán evaluadas (10 y 40 mg/mL). Para esto los cementos, espátulas y materiales a utilizar se colocarán en la campana de flujo laminar bajo luz UV por 15 min.

Se evaluó la citotoxicidad de 4 selladores odontológicos: 1) Cemento de portland MTA FILLAPEX (Angelus, PR, Brasil). 2) Hidróxido de calcio, Sealapex (Sybronendo, CA, USA). 3) Resina epóxica, AH-Plus (Dentsply, Konstanz, Alemania). 4) Un sellador de silicón, Roeko Seal (Alemania). Los materiales fueron seleccionados por su frecuencia de uso en la práctica odontológica en nuestra región.

Para la evaluación de los materiales se siguió la metodología propuesta por Tai (79).

Se realizó la preparación del medio (DMEM) únicamente con antibiótico al 1% (pen strep, gibco). Se prepararon 10 mg o 40 mg de cada cemento y se colocaron

inmediatamente en 1.5 mL de DMEM y perlas de vidrio de 0.5 mm para obtener la concentración de 10 mg/mL y 40 mg/mL, respectivamente. Se homogenizó en disruptor genie durante un minuto. Se incubó por 10 minutos u 8 horas a 37 °C a 250 rpm (environment shaker, Lab-line Instruments Inc, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante, conservándolo a 4 °C hasta los experimentos posteriores. El control de medio DMEM fue tratado del mismo modo que la preparación de los cementos.

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron a las 24, 72 y 96 horas de incubación con los diferentes medios de interacción con los selladores a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, por triplicado evaluando la proliferación, citotoxicidad y viabilidad de los osteoblastos con los diferentes cementos selladores.

Las células cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF)(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Life Science) y 1% de antibiótico (Pen Strep penicillin/Streptomycin, Gibco by Technologies) en cajas de 75 cm<sup>2</sup> hasta la confluencia, posteriormente fueron cosechadas con tripsina (6 ml) y gendarme, se lavaron con DMEM (10% SBF y 1% de antibiótico), se centrifugaron a 1,000 rpm por 10 min, y se realiza el cambio de medio seguido del conteo de células colocando 10 µL suspensión celular y 5 µL de azul tripano (4%), se observaron en cámara de Neubauer, para determinar el porcentaje de viabilidad y la concentración celular.

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron en placas de 96 pocillos con 10,000 células / pocillo en 100 µL de DMEM (10% SBF y 1% de antibiótico) a los

cuales se les adicionaron 100  $\mu$ L del medio preparado a las diferentes condiciones y controles.

### **6.6.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD**

Se usó el protocolo descrito por Key, Rahemtulla (80). Posterior a los tiempos de interacción, el sobrenadante de los pocillos fue removido y las células fueron desprendidas de los pocillos con ayuda de tripsina. La suspensión celular fue mezclada con 10  $\mu$ L de azul tripano (0.4%), un colorante vital, y 10 $\mu$ L de suspensión celular.

Únicamente las células muertas se tiñeron de azul, dicha suspensión se colocó en una cámara de Neubauer para el conteo, el porcentaje de viabilidad se determinó por la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Viabilidad} = (A/B) * 100$$

Donde A es el número de células viables en el experimento y B es el número de células viables en el control.

### **6.6.2 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN**

Se utilizó el kit comercial “CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante, posterior a los tiempos de incubación se agregaron 15  $\mu$ L la solución de tinción y se incubó a 37 °C por 3

h protegido de la luz. Transcurrido el tiempo se adicionaron 100 µL de la solución de paro y se colocó a 4 °C por toda la noche. Al siguiente día se tomó lectura en el lector de placas (ELIREAD, KontroLab).

## 6.7 ENSAYOS DE DAÑO CELULAR

Se utilizó el kit comercial “CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay” (Promega, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicional al control de medio sin cemento sellador se utilizó un control positivo para el daño celular (Control máximo de LDH). Brevemente, 45 min antes del término de las incubaciones se agregó la solución de lisis (10 X) al control máximo de LDH.

Se transfirieron 50 µL del sobrenadante a placas de ELISA de 96 pocillos, se agregaron 50 µL de la mezcla de sustratos a cada pocillo, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente protegidas de la luz, posteriormente se adicionaron 50 µL de la solución de paro de reacción y se tomaron las lecturas de las absorbancias a 490 nm. El cálculo del daño celular se realizó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\textit{Experimental}}{\textit{Maxima}} \times 100$$

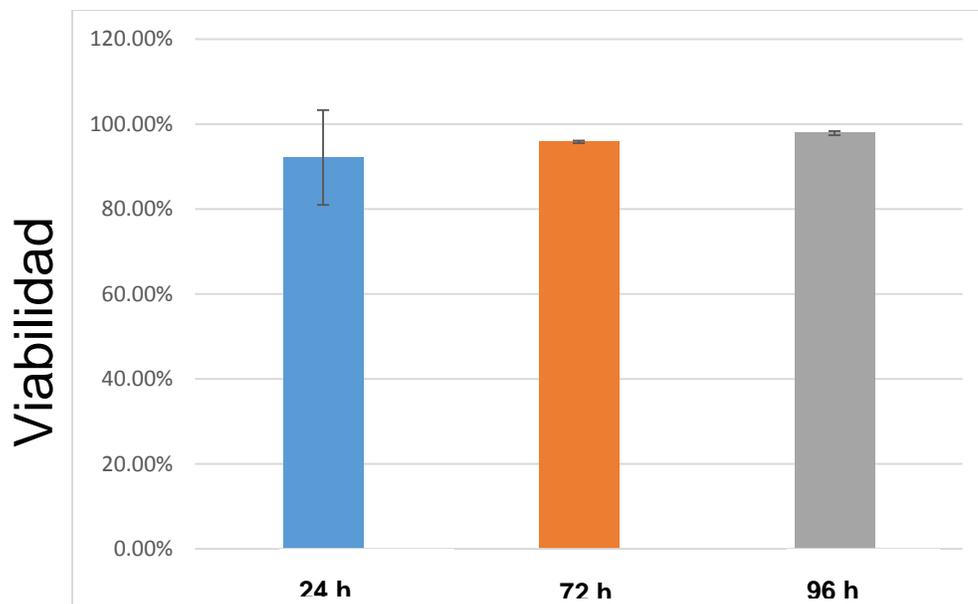
## **6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la prueba de viabilidad por azul tripano se usó la prueba Chi cuadrada. Para la proliferación y citotoxicidad se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA), de un factor, y la prueba de comparaciones múltiple de Bonferroni. La significancia estuvo dada con un valor de  $p < 0.05$  (81). Todos los datos se analizaron con el programa IBM SPSS v20 (IL, USA).

## VII. RESULTADOS

### 7.1. VIABILIDAD

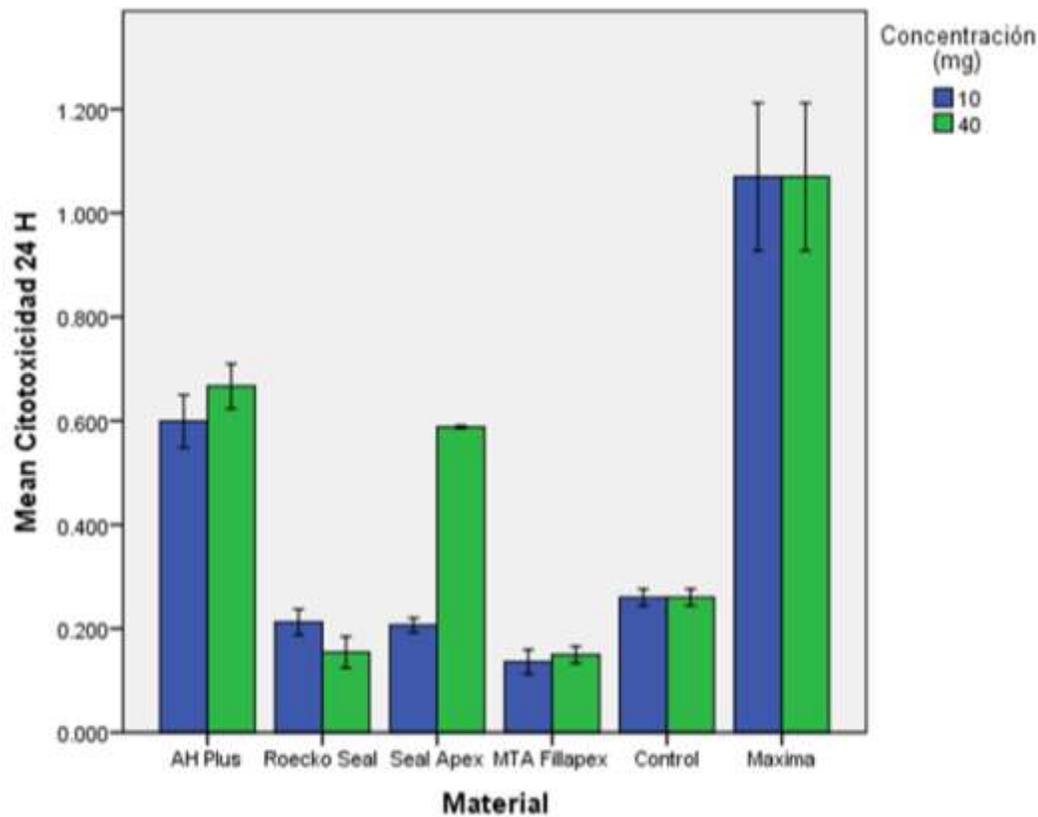
El porcentaje de viabilidad de osteoblastos a las 24 h. fue de 92.10% y fue en aumento a las 72 h. con un porcentaje de 95.80% y por último a las 96 h. se observó un aumento en la viabilidad en un porcentaje de 97.85% (Fig. 1).



**Figura 1. Gráfica de Viabilidad.** 1, viabilidad a las 24 hrs. 2, viabilidad a las 72 hrs. 3, viabilidad a las 96 h.

## **7.2. CITOTOXICIDAD**

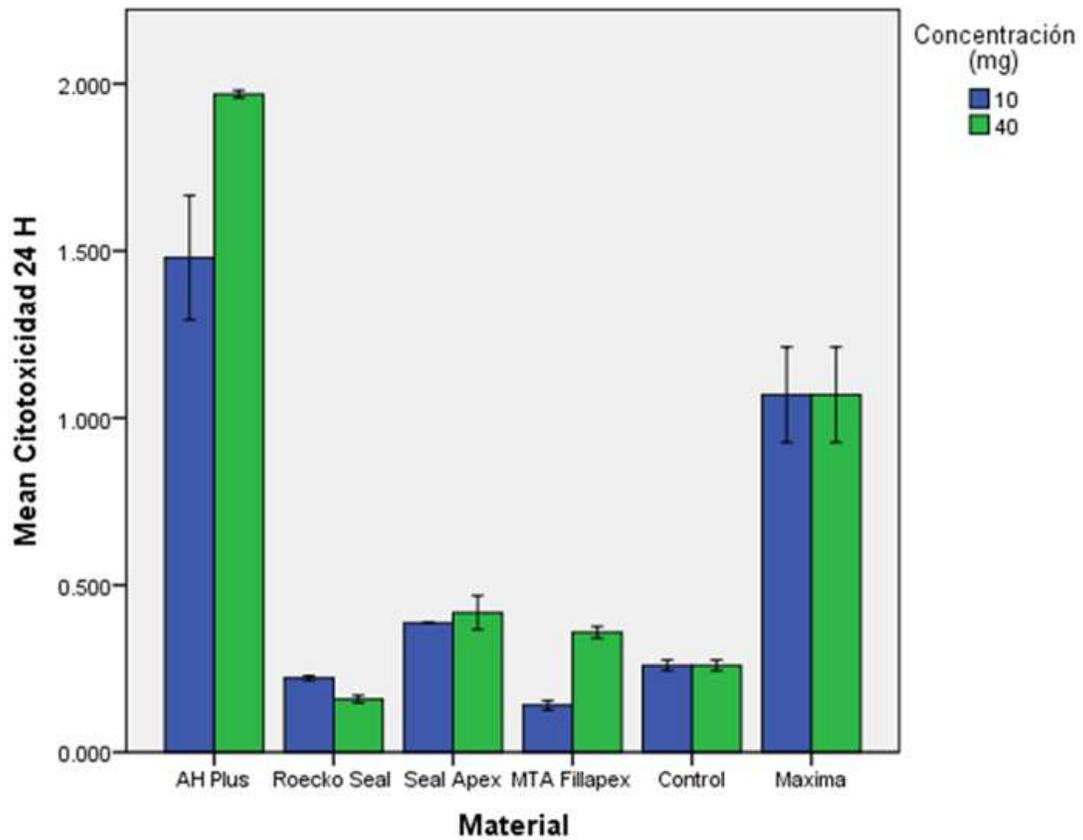
Los osteoblastos presentaron una citotoxicidad menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador AH Plus que presentó una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 24 h de interacción  $0.599 \pm 0.051$  y  $1.142 \pm 0.142$ , respectivamente (Fig. 2). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.667 \pm 0.043$ ) en comparación con el control ( $1.070 \pm 0.142$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 2. Gráfica de Citotoxicidad a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

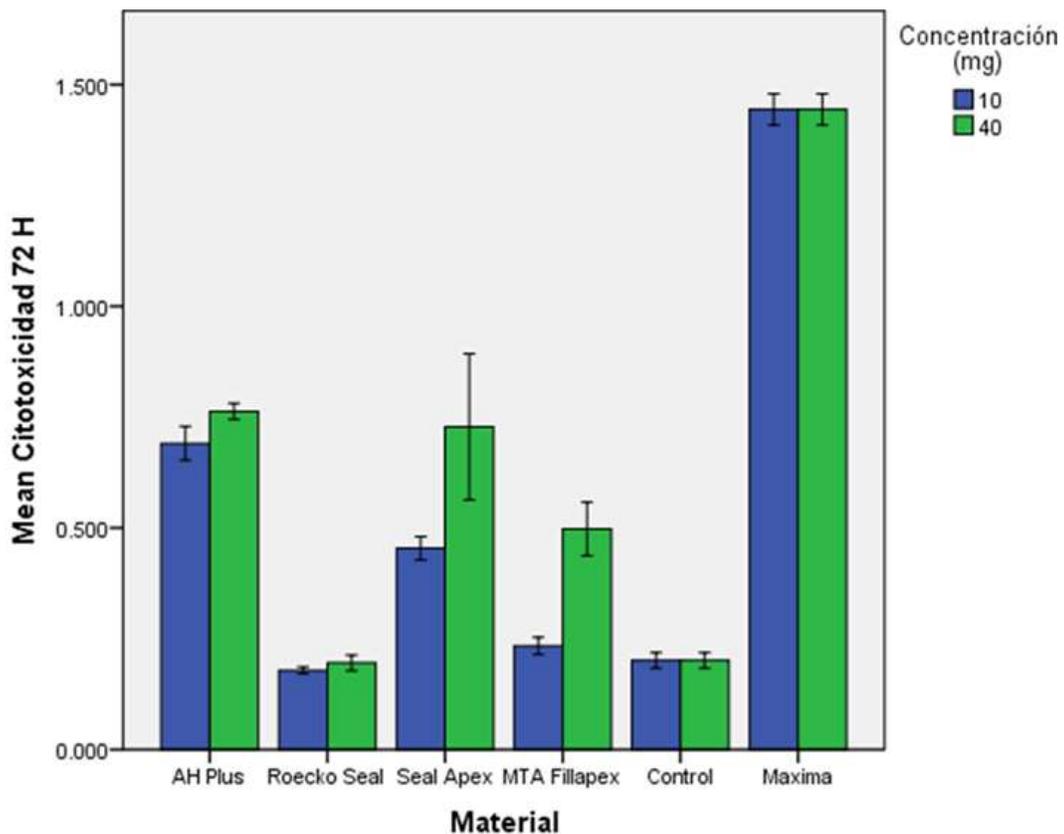
Las células de osteoblastos presentaron una citotoxicidad menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador AH Plus que presentó una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 24 h de interacción  $1.480 \pm 0.186$  y  $1.070 \pm 0.142$ , respectivamente (Fig. 3). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $1.969 \pm$

0.011) en comparación al control ( $1.070 \pm 0.142$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



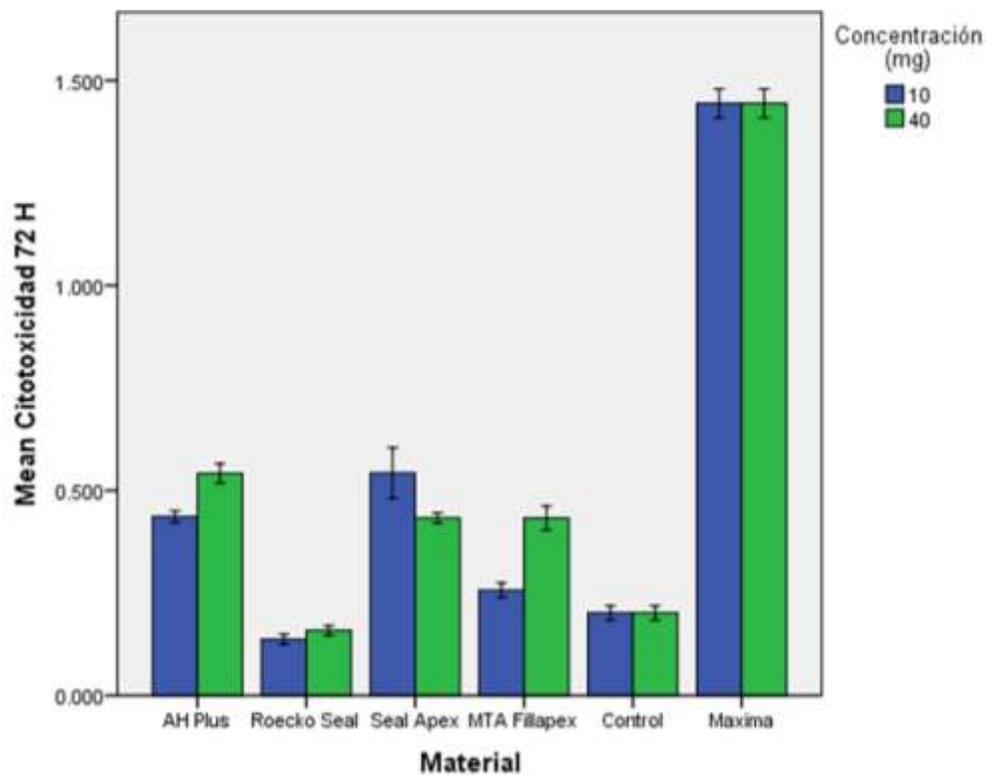
**Figura 3. Gráfica de Citotoxicidad a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

Los osteoblastos presentaron una citotoxicidad menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo, la reacción de las células en contacto con el sellador AH Plus presentó la más alta citotoxicidad a las 72 h de interacción  $0.691 \pm 0.038$  y  $1.444 \pm 0.035$ , respectivamente (Fig. 4). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.763 \pm 0.018$ ) en comparación al control ( $1.444 \pm 0.035$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



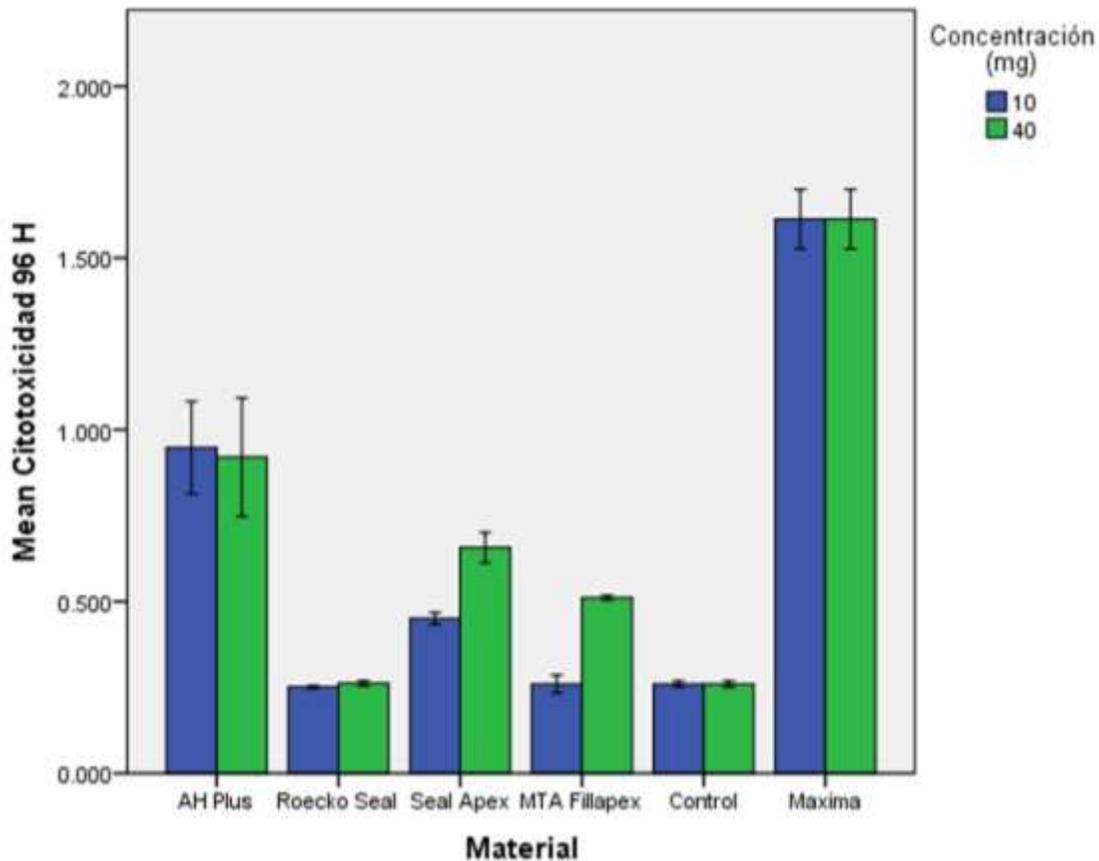
**Figura 4. Gráfica de Citotoxicidad a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias ± Error Estándar.**

Los osteoblastos presentaron una citotoxicidad menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo, el sellador Sealapex presentó la más alta citotoxicidad a las 72 h de interacción  $0.387 \pm 0.001$  (Fig. 5). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.436 \pm 0.014$ ) en comparación al control ( $1.444 \pm 0.035$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 5. Gráfica de Citotoxicidad a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

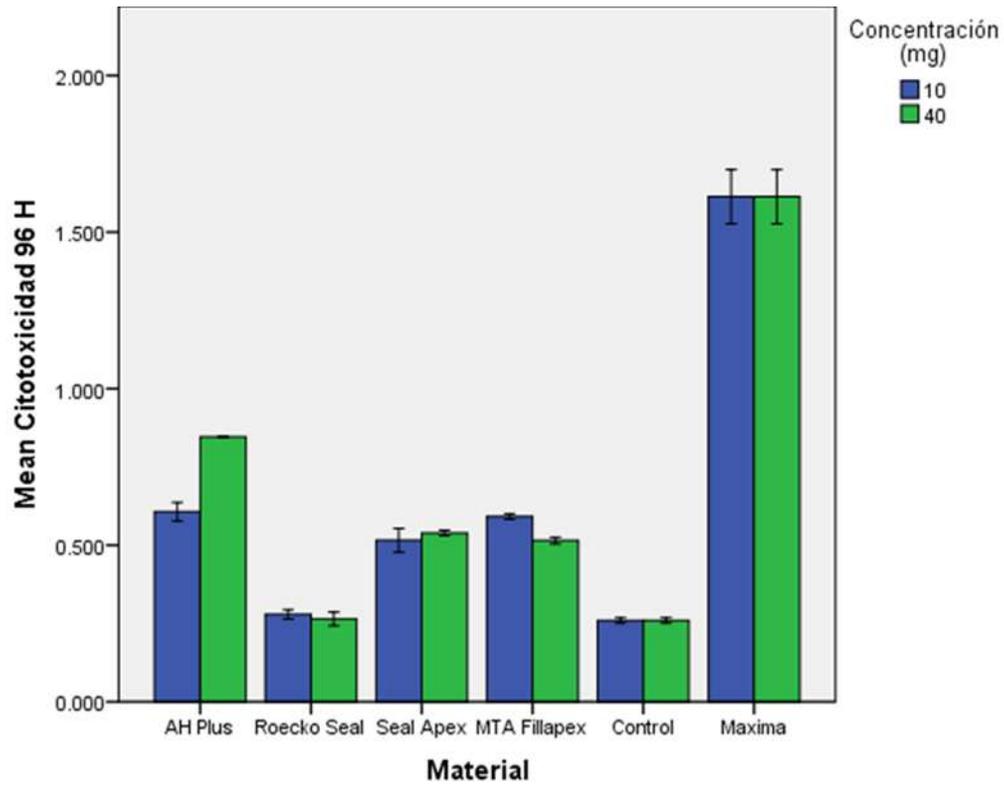
La citotoxicidad observada en los osteoblastos fue menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador AH Plus que presentó la más alta citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 96 h de interacción  $0.948 \pm 0.135$  y  $1.613 \pm 0.087$ , respectivamente (Fig. 6). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.920 \pm 0.173$ ) en comparación al control ( $1.613 \pm 0.087$ ) y los demás cementos en esta misma concentración comparado con la máxima y los demás cementos.



**Figura 6. Gráfica de Citotoxicidad a las 96 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

Los osteoblastos presentaron una citotoxicidad menor que la máxima al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador AH Plus que presentó la más alta citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 96 h de interacción  $0.607 \pm 0.029$  y  $1.613 \pm 0.087$ , respectivamente (Fig. 7). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.846 \pm$

0.001) en comparación al control ( $1.613 \pm 0.087$ ) y los demás cementos en esta misma concentración comparado con la máxima y los demás cementos.

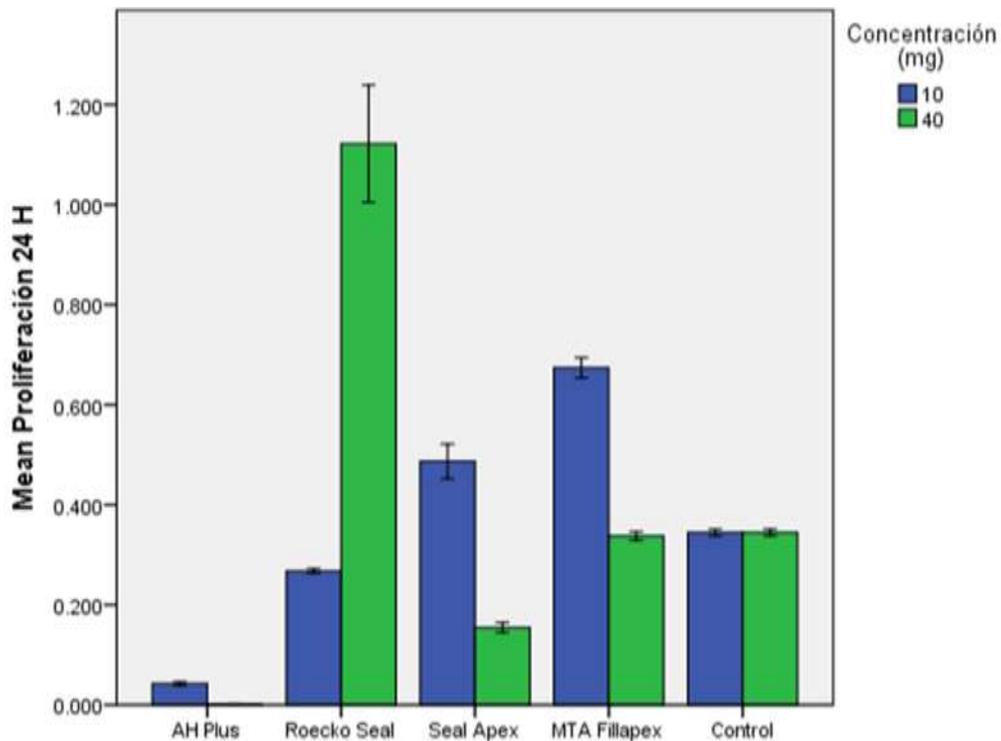


**Figura 7. Gráfica de Citotoxicidad a las 96 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

### 7.3. PROLIFERACIÓN

Los osteoblastos presentaron una proliferación al aplicarse 10mg de cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo, siendo el sellador MTA Fillapex con el que se observó una proliferación mayor comparable con el control a las 24 hrs de interacción.  $0.136 \pm 0.024$  y  $0.260 \pm 0.016$  respectivamente (fig. 8). A concentraciones de 40 mg de los cementos selladores fue el Roeko Seal el que produjo mayor proliferación ( $0.155 \pm 0.030$ ) en comparación con el control ( $0.260 \pm 0.016$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.

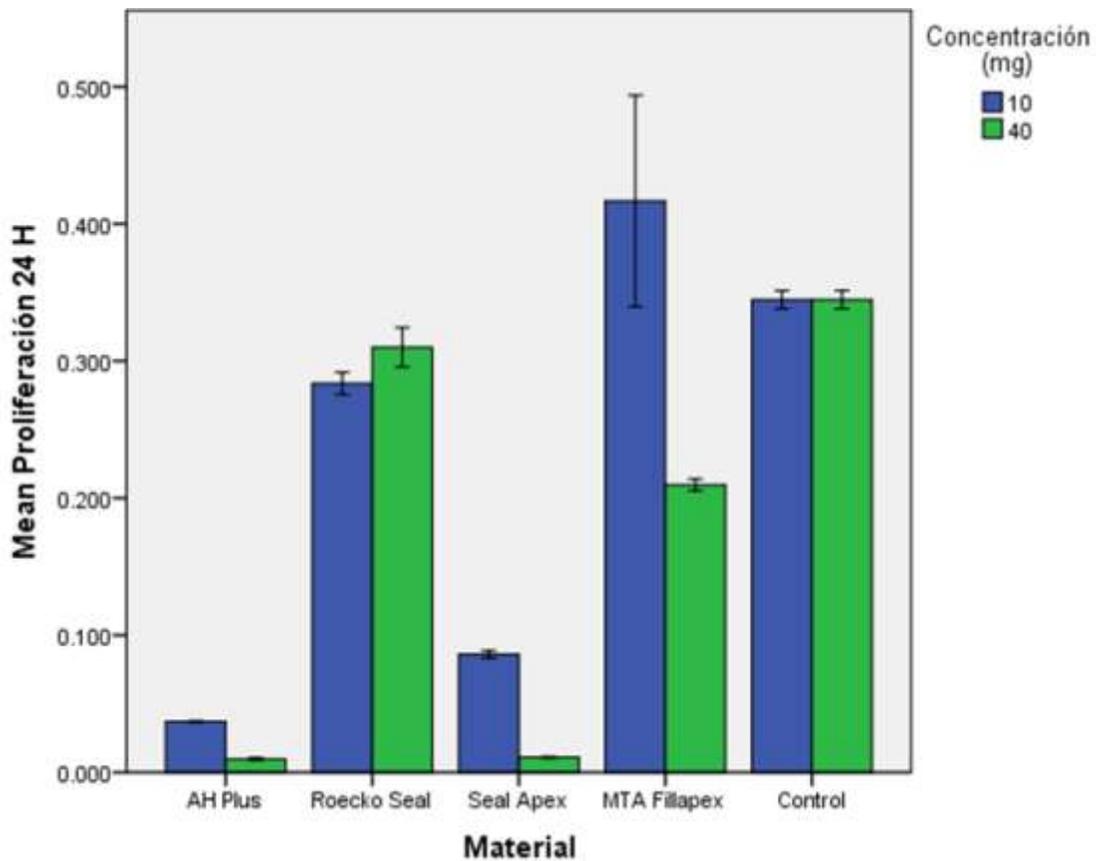
Además en concentraciones de 40 mg el sellador AH Plus inhibió a la proliferación ( $0.002 \pm 0.001$ ) en comparación al control ( $0.260 \pm 0.016$ )



**Figura 8. Gráfica de proliferación a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

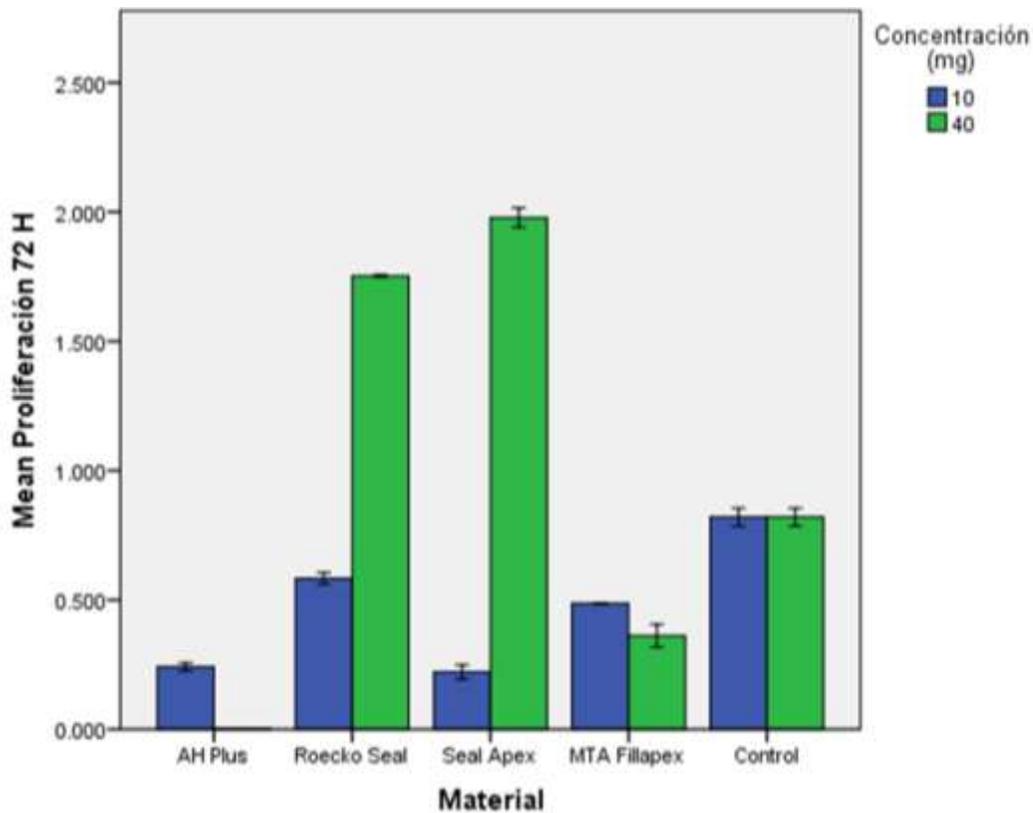
Al aplicarse 10mg de cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo, los osteoblastos mostraron proliferación siendo el sellador MTA Fillapex con el que se observó una proliferación mayor comparable con el control a las 24 h de interacción  $0.417 \pm 0.077$  y  $0.345 \pm 0.007$ , respectivamente (Fig. 9). A concentraciones de 40 mg de los cementos selladores, fue el Roeko Seal el que indujo mayor proliferación ( $0.310 \pm 0.014$ ) en comparación con el control ( $0.345 \pm 0.007$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.

Además en concentraciones de 40 mg los selladores AH Plus ( $0.010 \pm 0.001$ ) y Sealapex ( $0.011 \pm 0.001$ ) inhibieron la proliferación de forma similar y en comparación al control ( $0.345 \pm 0.007$ ).



**Figura 9. Gráfica de proliferación a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

Los osteoblastos presentaron una proliferación al aplicarse 10 mg de cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo, siendo el sellador Roeko Seal con el que se observó una proliferación mayor comparable con el control a las 72 h de interacción  $0.583 \pm 0.023$  y  $0.820 \pm 0.035$ , respectivamente (fig. 10). A concentraciones de 40mg de los cementos selladores fueron Sealapex ( $1.978 \pm 0.038$ ) y Roeko Seal ( $1.753 \pm 0.005$ ) los que generaron mayor proliferación, similar entre sí, en comparación con el control ( $0.820 \pm 0.035$ ) y los demás cementos en esta misma concentración. Además en concentraciones de 40 mg el sellador AH Plus inhibió a la proliferación ( $0.003 \pm 0.001$ ) en comparación al control ( $0.820 \pm 0.035$ ).

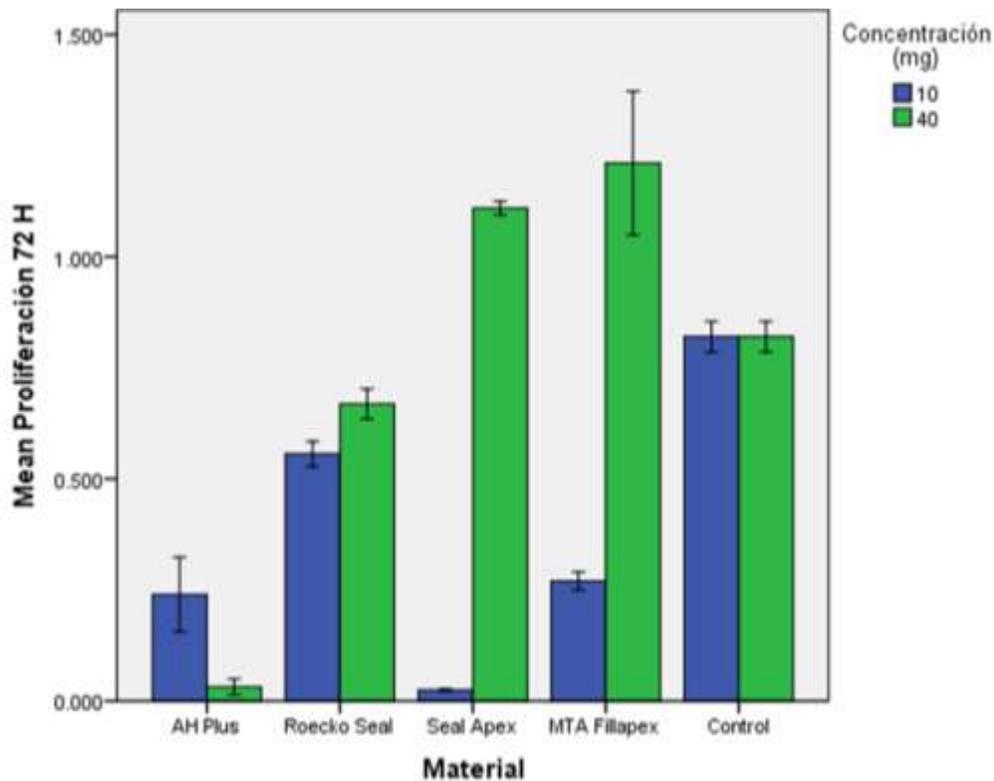


**Figura 10. Gráfica de proliferación a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

Los osteoblastos mostraron proliferación al aplicarse 10 mg de cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo, siendo el sellador Roeko Seal con el que se observó una proliferación mayor comparable con el control a las 72 h de interacción  $0.556 \pm 0.029$  y  $0.820 \pm 0.035$ , respectivamente (fig. 11). A concentraciones de 40 mg de los cementos selladores fueron MTA Fillapex ( $1.211 \pm 0.162$ ) y Sealapex ( $1.110 \pm 0.015$ ) los que generaron mayor

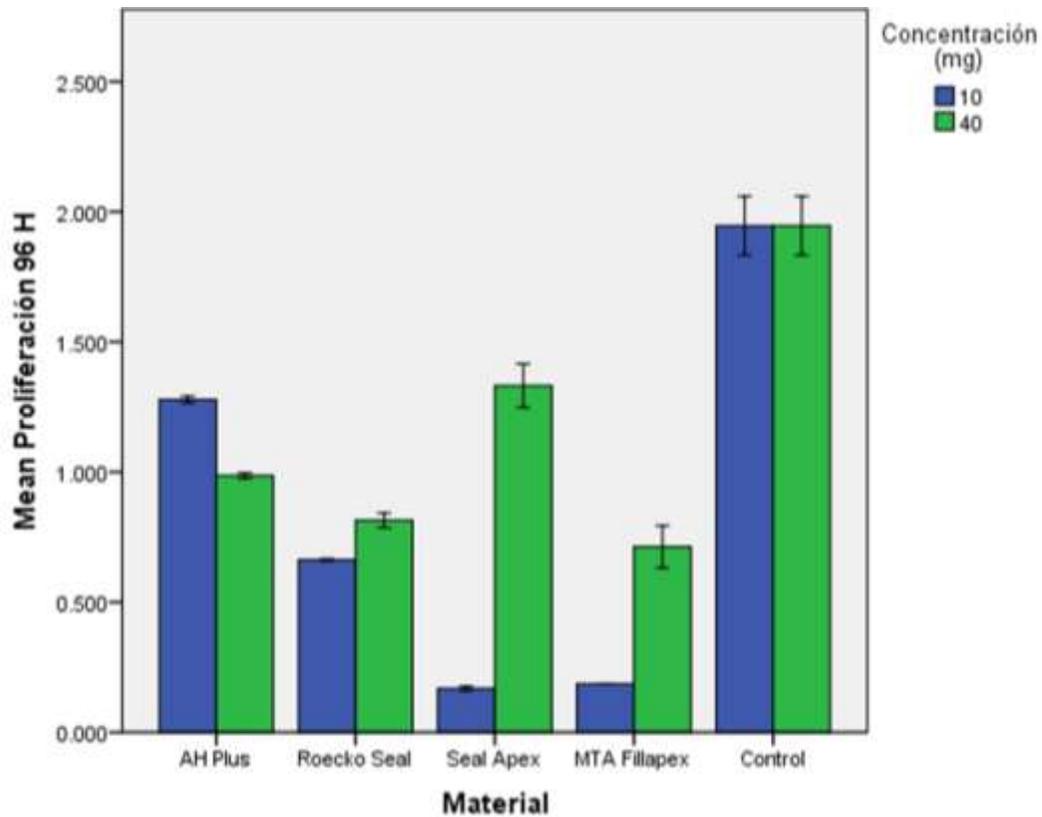
proliferación en comparación con el control ( $0.820 \pm 0.035$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.

Además en concentraciones de 40 mg el sellador AH Plus inhibió a la proliferación ( $0.032 \pm 0.018$ ) en comparación al control ( $0.820 \pm 0.035$ ).



**Figura 11. Gráfica de proliferación a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

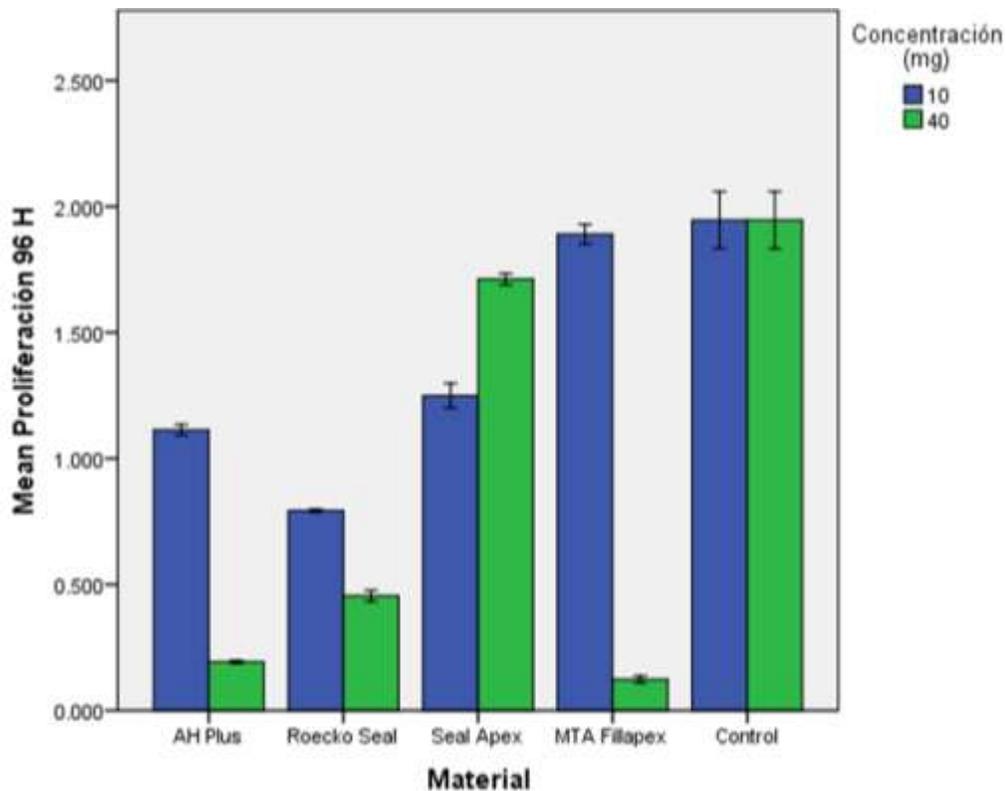
Los osteoblastos mostraron proliferación al aplicarse 10 mg de cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo, siendo el sellador AH Plus que genero una proliferación mayor comparable con el control a las 96 h de interacción  $1.274 \pm 0.013$  y  $1.946 \pm 0.113$ , respectivamente (fig. 12). A concentraciones de 40 mg el cemento sellador fue el Sealapex el que indujo mayor proliferación ( $1.332 \pm 0.085$ ) en comparación con el control ( $1.946 \pm 0.113$ ) y los demás cementos en esta misma concentración. Además en concentraciones de 40 mg los cementos selladores Roeko Seal ( $0.168 \pm 0.009$ ) y MTA Fillapex ( $0.186 \pm 0.001$ ) inhibieron de manera semejante la proliferación en comparación al control ( $1.946 \pm 0.113$ ).



**Figura 12. Gráfica de proliferación a las 96 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

Los osteoblastos presentaron una proliferación al aplicarse 10 mg de cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo, el sellador MTA Fillapex fue el que generó proliferación mayor comparable con el control a las 96 h de interacción  $1.890 \pm 0.039$  y  $1.946 \pm 0.113$ , respectivamente (fig. 13). A concentraciones de 40 mg de los cementos selladores fue Sealapex con el que se observó mayor proliferación ( $1.250 \pm 0.048$ ) en comparación con el control ( $1.946$

$\pm 0.113$ ) y los demás cementos en esta misma concentración. Además en concentraciones de 40 mg el sellador MTA Fillapex inhibió la proliferación ( $0.124 \pm 0.014$ ) en comparación al control ( $1.946 \pm 0.113$ ).



**Figura 13. Gráfica de proliferación a las 96 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.**

## VIII. DISCUSIÓN

Gomes-Filho y cols., realizaron un estudio en el que evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores y llegaron a la conclusión de que ningún material es considerado citotóxico en cultivos de fibroblastos, lo que difiere de nuestros resultados, ya que nosotros encontramos citotoxicidad con diferentes cementos selladores en contacto con osteoblastos humanos (70). De la misma manera, los resultados de Gheshiaghi y cols., difieren de los nuestros al evaluar la citotoxicidad de un nuevo cemento a base de resina epóxica similar al AH Plus, y concluyen que induce una significativa citotoxicidad en las primeras fases del tratamiento y desaparece después de 4 h (59). Tampoco coincidimos con Silva y cols., que evaluaron la citotoxicidad del MTA Fillapex y encontraron que fue más citotóxico que AH Plus. En el mismo estudio se mostró que MTA Fillapex presenta un pH alcalino en el tiempo experimental, mientras que AH Plus muestra un pH neutro y significativamente menor que MTA Fillapex.(76)

En cambio Peralta M., que realizó un estudio *in vitro* de la citotoxicidad de tres selladores endodónticos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929, concluyó que los selladores a base de silicona constituyen la primera elección para el tratamiento de conductos. Este estudio coincide con nuestros resultados ya que Roeko Seal fue el que presentó menor citotoxicidad y más biocompatibilidad en nuestro estudio (12). De la misma manera nuestros resultados coinciden con los de Bethany que realizó un estudio sobre citotoxicidad de cementos selladores, concluyendo que todos los cementos exhiben severa citotoxicidad a las 24 h.

Nuestros resultados coinciden con esto ya que observamos que la citotoxicidad existe a partir de un rango de tiempo de 24 h (73).

Camps y cols., realizaron un estudio de citotoxicidad de selladores endodónticos, sus resultados mostraron que la citotoxicidad de Sealapex decrece con el tiempo, pero la citotoxicidad que muestra AH Plus y Cortisomol no disminuye. Nuestros resultados coinciden en el caso del AH Plus, pero no con el de Sealapex ya que este mostró que la citotoxicidad no disminuye conforme pasa el tiempo (63).

Contrario a nuestros estudios Leyhausen y cols. Realizaron un estudio en el que se muestra que AH Plus puede causar una leve o nula injuria (53). Tampoco concordamos con Lee y cols., ya que sus resultados mostraron que la resina epóxica presenta una aceptable baja citotoxicidad, mientras que en nuestros resultados los selladores a base de resina como el AH Plus causan una gran citotoxicidad (77).

Miletic y cols. Evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores como Roeko Seal y AH Plus *in vitro* en fibroblastos de piel de ratón. Al igual que en nuestros estudios ellos observaron que AH Plus mostró significativamente mayor citotoxicidad en las evaluaciones y Roeko Seal es menos citotóxico que AH Plus.(65)

## **IX. CONCLUSIONES**

En este estudio se demostró que los cementos selladores causan daño, sin llegar a causar la muerte celular, como es el caso del AH Plus, que fue el que mostró mayor citotoxicidad en comparación con los demás cementos y ésta se mantiene en el periodo de tiempo analizado independientemente de la concentración a la que se aplique.

El AH Plus fue el más citotóxico en todas las concentraciones y periodos de tiempo estudiados. Seguido por el Sealapex, el MTA Fillapex y el Roeko Seal resulto ser el menos citotóxico y más biocompatible en este estudio.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Mario Roberto L. tratamiento de conductos radiculares. artes medicas latinoamerica ed. 253-45 p.
2. ØRstavig DAG. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. Endodontic Topics. 2005;12(1):25-38.
3. Cohen S. Vias de la pulpa. decima ed2011.
4. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. International Endodontic Journal. 2004;37(3):193-8.
5. Alicia Karr N, Baumgartner JC, Marshall JG. A Comparison of Gutta-Percha and Resilon in the Obturation of Lateral Grooves and Depressions. Journal of Endodontics. 2007;33(6):749-52.
6. Spångberg LSW. Endodontic filling materials. 1982. p. 223-57.
7. Friedman CE, Sandrik JL, Heuer MA, Rapp GW. Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials. Journal of Endodontics.3(8):304-8.
8. Ingle JI, Bakland LK, Hernández JLG. Endodoncia: McGraw Hill; 2004.
9. Combe EC. Alpha- and beta-forms of gutta-percha in products for root canal filling. Int Endod J. 2001;34:447-51.

10. Gound TG, Riehm RJ, Makkawy HA, Odgaard EC. A Description of an Alternative Method of Lateral Condensation and a Comparison of the Ability to Obturate Canals Using Mechanical or Traditional Lateral Condensation. *Journal of Endodontics*. 2000;26(12):756-9.
11. Goodman A, Schilder H, Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*.37(6):954-61.
12. Peralta Pérez M, Uribe Querol E, García Aranda RL, Gutiérrez Opsina G. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929. *Revista Odontológica Mexicana*. 2006;10(2):63-8.
13. Lioni CB. Agentes Selladores. Relacion entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad. *Electronic Journal of Endodontics Rosario*. 2010;2(9):462-85.
14. Grossman LI. *Endodontic practice*. 10th ed1982.
15. Robert M. Block D, R. Denby Lewis, DDS , Jimmy B. Sheats, DDS , Stephan H. Burke, BScorrespondence. Antibody formation to dog pulp tissue altered by N2-type paste within the root canal. *Journal of Endodontics*. 1977;3(8):309-15.
16. Torabinejad M, Kettering JD, Bakland LK. Evaluation of systemic immunological reactions to AH-26 root canal sealer. *Journal of Endodontics*. 1979;5(7):196-200.

17. Harnden DG. Tests for carcinogenicity and mutagenicity 1. *International Endodontic Journal*. 1981;14(1):35-61.
18. Lewis BB CS. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc*. sep 1981;103(3):429-34.
19. Schroeder A. The impermeability of root canal filling material and first demonstrations of new root filling materials. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*. 1954;64:921-31.
20. G. R. Agentes selladores en endodoncia. Available from: [rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/1380/10-431PB.pdf?sequence=1](http://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/1380/10-431PB.pdf?sequence=1).
21. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dental Materials*.17(6):512-9.
22. Jain P1 PV, Sikri VK. An ex vivo evaluation of the sealing ability of polydimethylsiloxane-based root canal sealers. *Indian J Dent Res*. 2014 25(3):336-9.
23. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International Endodontic Journal*. 2007;40(5):329-37.
24. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak ÖF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Şahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*. 2011;44(7):626-34.

25. Lodiené G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *International Endodontic Journal*. 2008;41(1):72-7.
26. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-Term Cytocompatibility of Various Endodontic Sealers Using a New Root Canal Model. *Journal of Endodontics*.28(11):749-53.
27. AG CW. ROEKO ROEKOSEAL. Available from: [http://www.coltene.com/en/products/21/details/124/ROEKO\\_ROEKOSEAL.html](http://www.coltene.com/en/products/21/details/124/ROEKO_ROEKOSEAL.html).
28. Spangberg LS. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod*. 1993;19:596-8.
29. Cohen S. *vias de la pulpa diez ed2011*.
30. Dentsply. AH Plus® Material para sellado de conductos. Available from: [http://www.dentsply.es/DFU/esp/AH%20Plus%20Jet\\_esp.pdf](http://www.dentsply.es/DFU/esp/AH%20Plus%20Jet_esp.pdf).
31. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CES, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal*. 2012;45(5):419-28.
32. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Sealers Based on Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*.38(4):495-500.
33. GOMES-FILHO JE, WATANABE S, CINTRA LTA, NERY MJ, DEZAN-JUNIOR E, QUEIROZ IOA, et al. Effect of MTA-based sealer on the healing of periapical lesions. *Journal of Applied Oral Science*. 2013;21:235-42.

34. Crane DL, Heuer MA, Kaminski EJ, Moser JB. Biological and physical properties of an experimental root canal sealer without eugenol. *Journal of Endodontics*. 6(2):438-45.
35. Cohen S. obturación del sistema de conductos radiculares limpios y conformados. decima ed. Barcelona 2011.
36. Kouji Araki D, PhD1correspondence, Hideaki Suda, DDS, PhD2, Larz S.W. Spångberg, DDS, PhD3. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 1994;20(2):67-70.
37. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials—does it have a role? *International Endodontic Journal*. 1988;21(2):50-8.
38. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2007;12:258-66.
39. Jaime GG. El proceso de remodelación ósea. *Ortho-tips*. 2008;Vol. 4(No. 3 ):170-6.
40. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón Md, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2006;11:47-51.

41. Antrim DD. Evaluation of the cytotoxicity of root canal sealing agents on tissue culture cells in vitro: Grossman's sealer, N2 (permanent), Rickert's sealer, and Cavit. *Journal of Endodontics*. 1976;2(4):111-6.
42. Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto Y, Hirano S, Hayakawa H, Sakai K, et al. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *Journal of Endodontics*. 1986;12(4):156-60.
43. Spangberg L, Pascon EA. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during in vitro evaluation of biomaterials. *Journal of Endodontics*. 1988;14(5):247-50.
44. Briseño BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. I. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *Journal of Endodontics*. 1990;16(8):383-6.
45. Briseño BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. Silicone- and resin-based sealers. *Journal of Endodontics*. 1991;17(11):537-40.
46. Briseño BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts: III. calcium hydroxide-based sealers. *Journal of Endodontics*. 1992;18(3):110-3.
47. Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spångberg LSW. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *Journal of Endodontics*. 1993;19(11):554-7.

48. Araki K, Suda H, Spångberg LSW. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 1994;20(2):67-70.
49. Gerosa R, Menegazzi G, Borin M, Cavalleri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 1995;21(9):446-8.
50. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of Endodontics*. 1995;21(10):489-92.
51. Chang Y-C, Huang F-M, Cheng M-H, Chou LS-S, Chou M-Y. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 1998;24(9):604-6.
52. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*. 1998;24(2):91-6.
53. Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *Journal of Endodontics*. 1999;25(2):109-13.
54. Tai K-W, Chang Y-C. Cytotoxicity Evaluation of Perforation Repair Materials on Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *Journal of Endodontics*. 2000;26(7):395-7.
55. Willershausen B, Briseño Marroquín B, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of Root Canal Filling Materials to Three Different Human Cell Lines. *Journal of Endodontics*. 2000;26(12):703-7.

56. Leonardo RdT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of Cell Culture Cytotoxicity of Five Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics*. 2000;26(6):328-30.
57. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate Using Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 2000;26(5):288-91.
58. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An In Vitro Study of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics*. 2000;26(4):228-9.
59. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In Vitro Cytotoxicity of a New Epoxy Resin Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics*. 2000;26(8):462-5.
60. Tai K-W, Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxic Evaluation of Root Canal Filling Materials on Primary Human Oral Fibroblast Cultures and a Permanent Hamster Cell Line. *Journal of Endodontics*. 2001;27(9):571-3.
61. Topalian K M. Efecto Citotóxico de los Cementos Selladores Utilizados en Endodoncia Sobre el Tejido Periapical Venezuela2002 [cited 2015 Enero]. Available from: [http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado\\_23.htm](http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_23.htm).
62. de Oliveira Mendes ST, Sobrinho APR, de Carvalho AT, de Souza Côrtes MI, Vieira LQ. In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers on Macrophage Activity. *Journal of Endodontics*. 2003;29(2):95-9.

63. Camps J, About I. Cytotoxicity Testing of Endodontic Sealers: A New Method. *Journal of Endodontics*. 2003;29(9):583-6.
64. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of Cytotoxicity of MTAD Using the MTT-Tetrazolium Method. *Journal of Endodontics*. 2003;29(10):654-7.
65. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The Cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus Compared during Different Setting Periods. *Journal of Endodontics*. 2005;31(4):307-9.
66. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a New Root Canal Filling Material on Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 2006;32(8):756-8.
67. Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, et al. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Self-adhesive, Methacrylate Resin-based Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics*. 2008;34(9):1085-8.
68. Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line. *International endodontic journal*. 2009;42(8):711-8.
69. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers: A Review. *Journal of Endodontics*. 2009;35(4):475-80.

70. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod.* 2009;35(11):1577-9.
71. Bae W-J, Chang S-W, Lee S-I, Kum K-Y, Bae K-S, Kim E-C. Human Periodontal Ligament Cell Response to a Newly Developed Calcium Phosphate-based Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics.* 2010;36(10):1658-63.
72. Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod.* 2010;36(1):40-4.
73. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting Properties and Cytotoxicity Evaluation of a Premixed Bioceramic Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics.* 2011;37(5):673-7.
74. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod.* 2011;37(5):673-7.
75. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Sealers Based on Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics.* 2012;38(4):495-500.
76. Lee BN, Son HJ, Noh HJ, Koh JT, Chang HS, Hwang IN, et al. Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. *J Endod.* 2012;38(12):1627-30.

77. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013;39(2):274-7.
78. Lee SJ, Chung J, Na HS, Park EJ, Jeon HJ, Kim HC. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clinical oral investigations.* 2013;17(3):1009-15.
79. Tavares CO, Böttcher DE, Assmann E, Kopper PMP, de Figueiredo JAP, Grecca FS, et al. Tissue Reactions to a New Mineral Trioxide Aggregate-containing Endodontic Sealer. *Journal of Endodontics.* 2013;39(5):653-7.
80. Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod.* 2001;27(9):571-3.
81. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2006;32(8):756-8.
82. Aguilar-Medina M, Ramos-Payan R, Arambula-Meraz E, Sanchez-Torres L, Favila-Castillo L. Parasitaemia levels in *Plasmodium chabaudi* infected-mice modify IFN-gamma and IL-10 expression after a homologous or heterologous challenge. *Parasite immunology.* 2010;32(4):267-74.