UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

"CITOTOXICIDAD, VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO EN DIFERENTES CEMENTOS SELLADORES ENDODONTICOS"

No. de Registro: 2013-22

Que como requisito para obtener el grado de Especialidad en Endodoncia presenta:

C.D. DULCE MARGARITA HERNÁNDEZ ALEMÁN

Director de tesis:

C.D.M.E. ALFREDO DEL ROSARIO AYALA HAM

Codirector:

DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA

Asesor:

D.C.M. MARÍA DE LOURDES VERDUGO BARRAZA

Culiacán de rosales, Sinaloa, enero de 2014.

DEDICATORIA

Le dedico con mucho cariño este trabajo a mi familia, que son lo más importante para mí, sin ellos nunca lo habría logrado.

A mi madre Margarita Alemán Velázquez por ser una gran mujer, mi guía, mi mejor amiga, por su esfuerzo, fortaleza y dedicación en cada momento de mi vida.

A mi padre Jesús Esteban Hernández Rivera por ser un ejemplo a seguir, por sus enseñanzas, sabios consejos, cariño y por ayudarme a formarme como profesionista.

A mi esposo Sergio Iván Acosta Urquídez, Por ser mi compañero de vida, por ser para mí el más grande apoyo, por sus infinitas muestras de cariño, por todos sus desvelos, por estar siempre a mi lado, por toda su confianza, fortaleza, esfuerzo y admiración.

A mis hermanos Félix Manuel Hernández Alemán y María Esther Lezama Martínez, por ser un gran ejemplo a seguir, por acompañarme y aconsejarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida, por nunca soltarme de la mano.

A mi Sobrina Esther Margarita Hernández Lezama, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante y ser cada día mejor.

A Carlos Osuna Padilla por siempre estar presente en mi vida.

AGRADECIEMIENTOS

Antes que nada, Gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

Agradezco infinitamente a mi familia, porque sin su apoyo y comprensión jamás lo hubiera logrado.

Agradezco al Dr. Alfredo Ayala Ham, por creerme capaz y elegirme para realizar tan importante proyecto, por sus enseñanzas y por apoyarme cuando más lo necesite.

Al Dr. Manuel Hernández Alemán, por su profesionalismo, apoyo incondicional, enseñanzas y porque sin él no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Rosalío Ramos Payan, al Dr. Geovanni Romero Quintana y a la Dra. Maribel Aguilar Medina por su apoyo incondicional en el laboratorio, por darme conocimientos nuevos y por siempre estar al pendiente por mí.

A Luis Fernando Nava López mi compañero en el laboratorio, por ser mi guía y enseñarme un poco de todo lo que sabe, y por tenerme una enorme paciencia y ayudarme a que esto sea posible.

A mis maestros la Dra. Yolanda Castro, Dra. Lourdes Verdugo, Dra. Verena Morales, Dra. Vania Serrano, Dr. Manuel Gómez Rúelas, Dra. Ilsa Inzunza, Dr. Omar cazares, por su paciencia, apoyo, enseñanzas, profesionalismo y por hacer de mí una mejor persona.

A cada uno de mis compañeros Héctor Acosta, Fernando Aristigui, Rocío Beltrán, Alejandro Ceceña, Brisa Félix, Gabriel García, Adelina Rocha y Diego Pantoja por acompañarme, su paciencia y apoyo incondicional día a día, por convertirse en mi familia todo este tiempo. Muchas gracias.

RESUMEN

Introducción: La obturación de los conductos radiculares es un paso importante a tener en cuenta para lograr el éxito del tratamiento endodóntico. Una vez lograda la limpieza y esterilidad del conducto se obturará de forma tridimensional, permanente e impermeable con un material estable y biocompatible. Debido a que el sellador estará en contacto directo con los tejidos periapicales por un tiempo prolongado, su biocompatibilidad es de gran importancia, ya que se puede retardar la cicatrización de los tejidos periapicales o causar una reacción tisular inflamatoria. **Objetivo:** Determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares (Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) sobre fibroblastos periodontales humanos. **Materiales y métodos**: Se realizó la extracción de los fibroblastos de ligamento periodontal y el establecimiento de la línea celular *in vitro.* Para el ensayo de viabilidad, proliferación y daño celular se siguió el protocolo descrito por Key y cols. (2006) utilizando los kits comerciales "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" (Promega, CA) y "Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay" (Promega, CA) **Resultados:** Sealapex mostro elevada citotoxicidad en las primeras horas, MTA Fillapex mostro diferencia estadísticamente significativa a las 72 horas. AH plus presento la mínima citotoxicidad en el rango de 72 horas. Roeko Seal presento elevada citotoxicidad en el rango de 48 horas, disminuyendo significativamente en el horario de 72 horas. **Conclusiones:** AH Plus es el menos citotóxico, MTA Fillapex es el más citotóxico a largo plazo.

Palabras clave: *Citotoxicidad, fibroblastos ligamento periodontal, AH plus, Roeko Seal, MTA Fillapex, Sealapex.*

ABSTRACT

Introduction: the obturation of the root canal is an important step to consider to ensure the success of edodontic tratamiento. Once achieved cleanliness and sterility of the duct is three dimensional, permanent and waterproof form should be sealed with a stable and biocompatible material. Because the sealant will be in direct contact with the periapical tissues for a prolonged time, biocompatibility is of great importance, as it can delay healing of the tissue or periapicaleas tissue cause an inflammatory reaction. **Objective:** determine the in vitro effect of four root canal sealer cements (Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) on human periodontal fibroblasts. **Materials and methods:** Removal of the periodontal ligament fibroblasts and establishment of cell line in vitro was performed. For the viability assay, cell proliferation and damage to the protocol described by key et al. using commercial kits “CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay” (Promega, CA) y “Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega, CA). **Results:** Sealapex showed high cytotoxicity in the early hours, MTA Fillapex showed statistically significant difference at 72 hours. AH plus present low cytotoxicity in the range of 72 hours. Seal Roeko present high cytotoxicity in the range of 48 hours, significantly reducing the hours of 72 hours. **Conclusion:** AH Plus is less cytotoxic Fillapex MTA is the long-term cytotoxic.

Keywords: *Cytotoxicity, periodontal ligament fibroblasts, AH plus, Roeko Seal, MTA Fillapex, Sealapex*

INDICE

I. INTRODUCCIÓN..... 1

II. MARCO TEÓRICO..... 4

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 21

IV. JUSTIFICACIÓN..... 22

V. OBJETIVOS..... 23

VI. MATERIALES Y MÉTODOS..... 24

VII. RESULTADOS..... 29

VIII. DISCUSIÓN..... 34

IX. CONCLUSIONES..... 36

XI. BIBLIOGRAFÍA..... 37

ANEXOS..... 44

I. INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

La obturación de los conductos radiculares es un paso importante a tener en cuenta para lograr el éxito del tratamiento endodóntico. [1]

Una vez logrado el desbridamiento del conducto, la limpieza y esterilidad del mismo se obturará de forma tridimensional, permanente e impermeable con un material inerte, estable y biocompatible. [2]

Se han aconsejado diversos materiales endodónticos para la obturación del espacio radicular. La mayoría de las técnicas emplean un núcleo central y un cemento sellador que es esencial para lograr la impermeabilidad de los fluidos.

Se requiere de un cemento sellador para rellenar las irregularidades entre el material de obturación y las paredes del conducto principal, conductos laterales y accesorios y los espacios que quedan entre las puntas de gutapercha usadas en la condensación lateral. [3]

Debemos impedir que el espacio que anteriormente ocupaba la pulpa dentaria se transforme en un refugio para microrganismos. [2]

La biocompatibilidad se define como la compatibilidad de los materiales dentales y dispositivos de fabricación artificial con los tejidos y líquidos corporales. [4]

Debido a que el sellador estará en contacto directo con los tejidos periapicales por un tiempo prolongado, su biocompatibilidad es de gran importancia, ya que se

puede retardar la cicatrización de los tejidos periapicales o causar una reacción tisular inflamatoria. [1]

Un sellador biocompatible debe ayudar o estimular la reorganización de las estructuras dañadas para que la reparación pueda producir el sellado biológico del ápice y aislar cualquier cuerpo extraño. [2]

También se utilizan como lubricantes y ayudan al asentamiento del material sólido de obturación durante la condensación. Un buen sellador debe ser biocompatible y bien tolerado por los tejidos perirradiculares. Todos los selladores recién mezclados presentan cierto grado de toxicidad, que se reduce en gran medida al ser colocados. Todos son reabsorbibles cuando se exponen a los tejidos y a los líquidos tisulares. [5]

El material endodóntico ideal debe mostrar y ser biocompatible, dimensionalmente estable, capacidad de inducir osteogénesis y cementogénesis, fácil preparación y uso, estéril, radiopaco y no expandible. [6]

El potencial tóxico es particularmente mayor antes del fraguado del material, mientras que una liberación lenta de componentes del sellador puede ocurrir durante largos períodos dependiendo de la solubilidad del material en los fluidos tisulares y el grado de exposición al organismo. [3]

Estudios realizados tanto in vitro como in vivo han aportado evidencias de que la mayoría de los cementos selladores de uso común, causan efectos citotóxicos sobre el tejido Periapical. [4]

Los cementos selladores más populares son las mezclas de óxido de zinc-eugenol, hidróxido de calcio, los ionómeros de vidrio y las resinas, todos ellos resultan tóxicos hasta que fraguan, por esa razón se debe evitar su extrusión en los tejidos perirradiculares.

Una ventaja de los cementos selladores es su actividad antimicrobiana. [3]

Respecto a su actividad antimicrobiana, deben ejercer acción especialmente sobre bacilos gramnegativos anaerobios y sobre levaduras como *Candida albicans*. [2]

La citotoxicidad es la capacidad del material de dañar las células y provocar inflamación. [2]

Debido al estrecho contacto entre los selladores y los tejidos perirradiculares, ya que se sabe que se liberan sus subproductos a través del foramen apical antes y después de su endurecimiento, es necesario conocer el grado de citotoxicidad que presentan. [7]

El propósito de este trabajo es realizar una investigación in vitro sobre la citotoxicidad de los cementos selladores utilizados en Endodoncia sobre células de ligamento periodontal.

II. MARCO TEÓRICO

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. [1]

La obturación del conducto es responsable del control microbiano, lo cual es decisivo para una correcta reparación tisular. Los microorganismos son el principal factor etiológico de periodontitis apicales, su eliminación durante el tratamiento de conductos mediante la irrigación y la instrumentación, es esencial. [2]

Los selladores son sustancias que idealmente facilitan la obtención de un sellado hermético [7]. Según Topalian, Grossman en 1958 enumeró los requisitos y características que debe poseer un cemento sellador de conductos radiculares ideal, como es proporcionar adhesión entre el material y la pared del conducto radicular, producir sellado hermético, ser radiopaco para poder observarse radiográficamente, poseer partículas finas en polvo, no debe encogerse al fraguar, tampoco debe pigmentar la estructura dentaria, debe ser bacteriostático, o por lo menos no favorecer la reproducción de bacterias, debe fraguar con lentitud para permitir un tiempo de trabajo adecuado para la colocación del material de obturación, debe ser insoluble en fluidos bucales, debe ser tolerado por los tejidos periapicales y por último ser soluble en algún solvente común para retirarlo del conducto radicular en caso de ser necesario. [1]

Para actualizar estos requisitos, podemos agregar que los cementos selladores no deben ser mutagénicos ni carcinogénicos; no deben provocar reacción inmunitaria en los tejidos apicales y periapicales; no deben ser modificados en presencia de humedad; no deben corroerse. Un sellador biocompatible debe ayudar o estimular la reorganización de las estructuras dañadas para que la reparación pueda producir el sellado biológico del ápice y aislar cualquier cuerpo extraño. [2]

Los cementos selladores deben ser biocompatibles y bien tolerados por los tejidos perirradiculares. “Todos presentan cierto grado de toxicidad cuando recién se realiza la mezcla, que disminuye cuando fraguan”. [3]

La citotoxicidad, la genotoxicidad, la propiedad antimicrobiana y el potencial alergénico son parámetros que definen la Biocompatibilidad de un sellador. [2]

Rickert en 1952 -citado por Topalian- señaló la necesidad de utilizar un sellador unido a conos de gutapercha como alternativa a los selladores de cloropercha y eucapercha de aquella época. [1]

Los materiales selladores se clasifican de acuerdo a su composición:

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]

Los selladores a base de óxido de zinc eugenol se han estudiado in vitro, la mayoría de los estudios que utilizan técnicas de cultivos celulares han demostrado que el óxido de zinc eugenol es citotóxico [5]

RoekoSeal**.** Es un sellador a base de una silicona por adición (polidimetilsiloxano). 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, se expande en un 0.2%; es radiopaco y tiene un tiempo de trabajo de 15 -30 minutos. [5]

MTA Fillapex. Primer cemento obturador endodóntico a base de MTA en el sistema pasta-pasta. El MTA con su comprobada eficiencia para el tratamiento de accidentes y complicaciones endodónticas ofrece sus propiedades y beneficios para un material obturador, presentando alta capacidad de sellado, baja solubilidad, bajo grado de reacción inflamatoria post-operatoria y total biocompatibilidad. Alcanza todos los requisitos exigidos por la ISO 6876. [13]

AH-Plus. Es un sustituto de AH26, fue introducido por Dentsply/DeTrey. Es un cemento sellador de conductos basado en un polímero de epoxi-amina con formaldehído en su composición. Es una versión mejorada, del tradicional cemento AH 26. Según la casa comercial, ofrece incluso mejor biocompatibilidad, mejor radioopacidad y estabilidad de color y es más fácil de eliminar. Su manipulación también es más fácil y rápida. Es químicamente inerte tras su fraguado. Es un sistema pasta/pasta. La consistencia proporciona a la mezcla una óptima viscosidad. Posee una fluidez adecuada con baja contracción y solubilidad lo que asegura un buen sellado. Un factor importante es la radioopacidad, que supera incluso a su predecesor AH 26. Puede usarse con todas las técnicas conocidas de obturación incluso con gutapercha condensada con calor. [5]

Sealapex. Se usan porciones iguales de la base y el catalizador con tiempo de trabajo muy prolongado, mezclado tarda tres semanas en alcanzar su fraguado final en humedad al 100%; en medio seco, nunca fragua, el conducto no debe ser secado completamente, al utilizar este cemento. Tiene plasticidad y escurrimiento adecuado y radioopacidad escasa; alta solubilidad y poca estabilidad, resultando en un sellado inadecuado. [13]

En la práctica clínica los cementos selladores disponibles hoy en día parecen funcionar bien, ya que una vez limpiado y conformado el sistema de conductos correctamente realizada la obturación total y tridimensional con gutapercha y sellador, se obtiene reparación y cicatrización apical a distancia. [1]

Se debe elegir de acuerdo a la clínica, aquel que genere respuesta inflamatoria leve y de corta duración, con leve o nula sintomatología post operatoria y que contribuya a la cicatrización. [2]

La capacidad de un cemento sellador de ser bacteriostático, lo hace ser citotóxico a los tejidos periapicales (contenido de formaldehído en su fórmula). [13]

Se han realizado numerosas investigaciones a la variedad de cementos selladores que se encuentran en el mercado, ya que es de vital importancia conocer cuales mejoran nuestro pronóstico postoperatorio al ser más biocompatible con los tejidos.

Topalian M. (2002) estudió el efecto citotóxico de los cementos selladores utilizados sobre el tejido periapical concluyendo 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. [1]

Lioni C. (2010) investigó la relación entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad de agentes selladores concluyendo que todos los selladores producen cierto grado de toxicidad sobre los tejidos periapicales. [2]

Racciatti G. (2000) comparó agentes selladores en endodoncia concluyendo que la citotoxicidad del sellador en este estudio no disminuyó proporcionalmente al tiempo de fraguado como sucede con la mayoría de los selladores. [5]

Gomes-Filho y cols. realizaron un estudio en Brasil 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. [6]

Peralta M. (2006) realizó un estudio in vitro 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. [7]

Briseño B. (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. [8]

Bethany realizó un estudio sobre citotoxicidad de cementos selladores donde concluye que todos los cementos exhiben severa citotoxicidad a las 24 hrs. La citotoxicidad de AH Plus gradualmente disminuyó y fue no citotóxico, mientras que sellador BC tuvo moderada citotoxicidad pasado el periodo de 6 semanas. [9]

Bae y cols. (2010) 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. [10]

Gheshiaghi y cols. (2003) 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 significante citotoxicidad en las primeras fases del tratamiento y desaparece después de 4 horas. [11]

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 fagocitica y producción de interlucina-12 y óxido nítrico. Los resultados concuerdan que la citotoxicidad no decrece y aumenta entre más fresco sea el cemento sellador. [12]

Gómez P. (2004) evaluó cementos selladores en endodoncia, concluyó que todos los cementos selladores son citotóxicos recién preparados, pero va disminuyendo significativamente después del fraguado. [13]

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, and Endomethasone y observaron severa toxicidad en la primera y segunda semana con AH-26. [14]

Tai y cols. evaluaron la citotoxicidad de materiales de relleno de conducto radicular en cultivos primarios de fibroblastos orales humanos y línea celular permanente de hámster 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. [15]

Key J. y cols. estudiaron en 2006 la citotoxicidad de un nuevo cemento sellador de conductos radiculares en fibroblastos de encía humana en el que encontraron que Resilon tuvo resultado similar que la gutapercha y el grupo control. Epiphany fue menos citotóxico que cemento de Grossman de la 1 a las 24 horas, Epiphany fue más citotóxico que Sealapex en la primera hora. Se indica que Resilon es el de más baja citotoxicidad. [16]

Briseño y cols. estudiaron citotoxicidad de cementos selladores de conductos radiculares con fibroblastos gingivales humanos. Sellador a base de hidróxido de calcio. Como resultado Sealapex mostró que tiene baja citotoxicidad después de 3 días de cultivo. Aunque CRCS mostró alta citotoxicidad durante la fase inicial, decrece después de los 3 días. [17]

Camps y cols. en 2003 realizaron un estudio de citotoxicidad de selladores endodónticos: un nuevo método. 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. [18]

Silva y cols. evaluaron en 2012 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 muestra un pH neutro y significativamente menor que MTA Fillapex. [19]

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, los resultados 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 micro núcleos comparado con el grupo control. [20]

Loshine y Cols. en 2011 evaluaron la citotoxicidad y propiedades de un cemento sellador mezclado biocerámico, encontrando que el sellador exhibe severa toxicidad a las 24 horas. [21]

Lee y Cols. 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 y fueron incubadas. Como conclusiones ProRoot MTA y GIC mostraron buena biocompatibilidad en el estudio, mientras que Ortho MTA mostró baja biocompatibilidad. [22]

Xu y cols. 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. Se necesitan más estudios para evaluar la biocompatibilidad de RealSeal. [23]

Pinna y cols. en 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. [24]

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. RoekoSeal no es citotóxico. [25]

Zhang y cols. evaluaron la citotoxicidad de MTAD usando el método MMT-Tetrazolium en fibroblastos L929, basado en los resultados MTAD tiene baja citotoxicidad que el eugenol, la pasta de hidróxido de calcio con agua oxigenada, el hipoclorito de sodio, Peridex y EDTA. [26]

Camps y cols. realizaron un test de citotoxicidad de cementos selladores: un nuevo método, éste estudio compara los estándares ISO contra las técnicas para evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de los cementos selladores. Los estándares ISO muestran diferencias significativas entre los selladores, AH Plus es no citotóxico, Cortisomol mostró una alta citotoxicidad que decrece con el tiempo y Sealapex mostró una alta citotoxicidad que no decrece con el tiempo. La nueva técnica muestra diferencias significativas entre los selladores, pero las diferencias son tan pequeñas que no hay relevancia clínica, la alta citotoxicidad de AH Plus decrece con el tiempo pero la de Sealapex y Cortisomol no. Este nuevo método reduce la discriminación de los test y la clasificación de los materiales. [27]

Neff y cols. realizaron una evaluación in vitro de la citotoxicidad de cementos endodónticos expuestos a calor. 7 selladores fueron expuestos por 10 minutos a temperaturas de 23°c, 43°c y 100°c. Los cementos Roth 801 y Roth 811 después de la exposición a 100°c mostraron adhesión pero no proliferación, mientras Kerr PCS y Dentalis mostraron deceso en la adhesión pero mostraron proliferación. AH Plus y AH26 mostraron incremento en adhesión y proliferación después de la exposición, mientras que Sealapex no se vio afectado. [28]

Willershausen y cols. compararon la citotoxicidad de materiales de relleno del conducto radicular en tres diferentes líneas celulares humanas. 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 PGE2 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. [29]

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. [30]

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. [31]

Leonardo y cols. evaluaron la citotoxicidad de cinco cementos selladores en cultivos celulares. 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. [32]

Keiser y cols. 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. [33]

Cohen y cols. realizaron un estudio in vitro sobre la citotoxicidad de dos cementos selladores. Se estudiaron AH26 y AH-Plus sobre la línea celular L929 de ratón, después de un periodo de observación de 48 horas se observó severa citotoxicidad en ambos. [34]

Leyhausen y cols. en 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. [35]

Chang y cols. 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. [36]

Osorio y cols. 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. [37]

Torabinejad y cols. evaluaron la citotoxicidad de cuatro cementos selladores. Se evaluó citotoxicidad 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. [38]

Araki y cols. estudiaron la citotoxicidad indirecta, longitudinal de cementos selladores en células L929 y fibroblastos de ligamento periodontal humano. Los conductos radiculares con una mezcla fresca mostraron citotoxicidad más alta para las líneas celulares. En y después de las 24 horas ninguna citotoxicidad fue detectada. Los resultados indican que sustituyendo el eugenol la citotoxicidad de los selladores decrece. [39]

Tagger y Katz evaluaron la radioopacidad de selladores endodónticos con un nuevo método directo. Los estándares nacionales e internacionales requieren una radioopacidad de 3 a 4 mm de aluminio. La opacidad de los ejemplos varia en el rango de 1.6 mm hasta 11 mm de aluminio. [40]

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. [41]

Briseño y Willershausen 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 el periodo de 24 horas severa citotoxicidad que permaneció durante todo el periodo experimental, mientras que Diaket y Lee Endo-Fill hubo 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. [42]

Spangberg y Pascon estudiaron 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]

Nakamura y cols. estudiaron la citotoxicidad de cementos selladores de conductos. Se evaluaron Canals, Neodyne, FR, AH26, Tubli-Seal, y Nogenol. Nogenol mostro 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. [44]

Antrim evaluó en 1976 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. [45]

Tavares y cols. 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 cementos mostraron aumento en la variable de los linfocitos que el grupo control y MTA Fillapex mostró baja condensación de fibras comparado con los túbulos vacíos, 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 en los túbulos vacíos. [46]

Desai y Chandler realizaron en 2009 una revisión de 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. [47]

Khashaba y Chutkan realizaron en 2009 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. [48]

Lee y cols. investigaron en 2011 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 micro filtraciones 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. [49]

Queiroz y cols. evaluaron la citotoxicidad de dos cementos endodónticos en cultivos de macrófagos en el 2005. Se estudiaron Sealer 26 y Endofill utilizando cultivos de macrófagos para inducir la producción de óxido nítrico. No se mostró diferencia significativa entre el grupo control positivo y el Sealer 26. Por lo tanto, Sealer 26 causa significativamente mayor toxicidad para los macrófagos, posiblemente debido a los componentes de la resina epóxica y el formaldehido que se libera durante la polimerización. [50]

Truque y cols. evaluaron en el 2006 la citotoxicidad de los materiales de obturación gutapercha y Resilon *in vitro* en las líneas celulares HEK-293, 3T3-J y en cultivos primarios de células humanas aisladas de ligamento periodontal. Los resultados demostraron que existe un incremento significativo ($P<0.05$) en la citotoxicidad de las células estudiadas en condiciones *in vitro* en respuesta al

incremento en la exposición de los materiales gutapercha y Resilon a partir de 1 mg/0.32 cm2, así como en respuesta al tiempo de incubación a las 72 h. [51]

De la cruz y cols. Compararon in vitro el efecto citotóxico de tres agentes quelantes sobre fibroblastos del ligamento periodontal humano. Los agentes quelantes RC-Prep, Glyde y EDTA tienen un efecto citotóxico a nivel de los fibroblastos del ligamento periodontal, siendo el EDTA el de menor efecto citotóxico a los 30 y 60 minutos comparado con RC-Prep y Glyde. [52]

Cortázar y cols. evaluaron la citotoxicidad de distintos cementos selladores endodónticos en cultivos de fibroblastos gingivales. Los cementos selladores investigados fueron: ProRoot MTA gris y blanco CPM, MTA Angelus, Sealapex y Gutta-Flow. Los resultados demostraron que a pesar de que el ProRoot MTA (gris y blanco) MTA Angelus, CPM y GuttaFlow demostraron tener un potencial citotóxico menor que el Sealapex, no se encontraron diferencias estadísticas significativas. [53]

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cemento se deposita en la zona más profunda del ápice, pudiendo estar en contacto directo con fibroblastos del ligamento periodontal y la citotoxicidad de estos materiales puede generar destrucción celular, desencadenando procesos inmunológicos como inflamación y dolor postoperatorio.

Se plantea evaluar el efecto de cuatro cementos, algunos nuevos y sin estudios previos, de ahí la importancia de determinar la citotoxicidad sobre cultivos primarios de fibroblastos periodontales.

De ahí que surja el siguiente cuestionamiento:

¿Cuál de los 4 cementos selladores: Roeko Seal (silicona), Sealapex (hidróxido de calcio), MTA Fillapex (MTA) o AH plus (resina) es más biocompatible para fibroblastos de ligamento periodontal humano?

IV. JUSTIFICACIÓN

IV. JUSTIFICACIÓN

La obturación de conductos radiculares es una de las etapas más difíciles dentro de un tratamiento endodóntico por la compleja y variable anatomía de los conductos radiculares. [2] Es posible que los selladores empleados contribuyan al fracaso endodóntico al ocasionar inflamación y daño a los tejidos periapicales.

La falta de información sobre la citotoxicidad de los nuevos materiales usados en las prácticas odontológicas y las posibles interacciones celulares así como el aumento en su uso en la práctica nos lleva a analizarlos a detalle para evaluar su efecto sobre fibroblastos periodontales *in vitro*.

V. OBJETIVOS

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares (Roeko Seal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) sobre fibroblastos periodontales humanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Establecer el cultivo celular de fibroblastos de ligamento periodontal.

Evaluar la citotoxicidad, proliferación y daño celular de fibroblastos de ligamento periodontal en contacto con 4 selladores endodónticos.

Comparar los efectos de los 4 cementos selladores en fibroblastos de ligamento periodontal.

VI. MATERIAL Y METÓDOS

VI. MATERIAL Y METÓDOS

Tipo de estudio: se realizó una investigación experimental, *in vitro*, longitudinal, prospectiva.

La investigación se realizó en una muestra no probabilística por conveniencia.

Universo de estudio: Se extrajeron los terceros molares de al menos 5 pacientes atendidos en la Clínica de Odontología de la UAS.

Antes de la extracción, se les solicitó a los pacientes que se cepillen con solución salina y un enjuague de clorhexidina, seguida de anestesia local y extracción del molar. Una biopsia del tejido periodontal fue extraída para el cultivo de fibroblastos.

Criterios de Inclusión: terceros molares que presenten tejidos periodontales sanos, terceros molares de pacientes menores a 40 años, terceros molares que se encuentren con anatomía intacta.

Criterios de exclusión: terceros molares con mala salud periodontal, dientes que no sean terceros molares, pacientes a los que no se les pueda realizar el consentimiento informado, pacientes mayores a 40 años, terceros molares destruidos por caries, fracturados o desgastados.

Criterios de eliminación: muestras que se contaminen, muestras en las que el fibroblasto muera.

La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

VARIABLES

Citotóxicidad: es la cualidad de ser tóxico a las células.

Variable cemento MTA Fillapex

Variable cemento AH-Plus

Variable cemento Roeko Seal

Variable cemento Sealapex

Procedimiento

Se realizó la extracción de los fibroblastos de ligamento periodontal y el establecimiento de la línea celular *in vitro:* se realizó el lavado del órgano dental para eliminar restos celulares, se colocó en un medio de biopsia DMEM con SBF y estreptomicina y posteriormente se lavó con medio de biopsia, se prosiguió a raspar con una hoja de bisturí el ligamento periodontal, colocándolo en caja de biopsia con el medio de biopsia, se incubaron por 24 horas a 37°c con 5% de CO_2, se realizó el cambio del medio de biopsia y se incubaron hasta lograr la confluencia celular, posteriormente se separaron las células con ayuda de tripsina y se preservaron a -70°c, para su posterior uso.

Para la preparación del sellador: Se siguió la metodología propuesta por Truque y cols. 2006.

Los materiales fueron mezclados de acuerdo a las indicaciones del fabricante con una espátula estéril y se les permitió fraguar por lo menos 15 h bajo luz ultravioleta para prevenir posibles contaminaciones, para establecer las condiciones experimentales, se pesaron en una balanza analítica 10 mg de cada material.

Ensayo de viabilidad: Se siguió el protocolo descrito por Key y cols. 2006

Se utilizaron 1 X 10^5 células transferidas a placas de 12 pozos para la evaluación de los materiales una vez que se logró la confluencia.

Alícuotas de 50, 100 y 200 uL de cada material se pusieron en contacto con las células y el medio de cultivo.

El material sellador y el medio se mezclaron previo a la exposición y se colocaron bajo luz ultravioleta durante 1 hora para evitar la posible contaminación bacteriana.

Se evaluó la viabilidad de los materiales a las 0, 24, 48 y 72 horas después de ponerse en contacto con las células. El medio con el sellador fue removido y las células fueron desprendidas de los pocillos con ayuda de tripsina.

Se utilizó un control negativo sin sellador.

La suspensión celular fue mezclada con 1 mL de azul tripano, un colorante vital, y 0.1 mL de DMEM.

El porcentaje de viabilidad se determinó por la siguiente formula:

*Porcentaje de Viabilidad = (A/B) * 100*

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

Ensayo de Daño celular: se siguió el mismo procedimiento que para viabilidad.

Se utilizaron células del cultivo en una concentración de 1 X 10^5 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos.

Se utilizó el kit comercial "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" (Promega, CA), siguiendo las condiciones del fabricante.

El cálculo del daño tisular se realizó con la siguiente formula:

% Citotoxicidad = Experimental/Máxima *100

Ensayo de proliferación: se siguió el mismo procedimiento que para daño celular

Se utilizaron células del cultivo en una concentración de 1 X 10^5 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos.

Se utilizó el kit comercial “Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega, CA)

Cada experimento se realizó por triplicado, por lo que los resultados fueron expresados como promedios de cada material y tiempo con su respectiva desviación estándar.

Procesamiento estadístico:

Se realizaron comparaciones simples usando la prueba t Student.

Significancia del 95%

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico IBM SPSS v20 (IL, USA).

VII. RESULTADOS

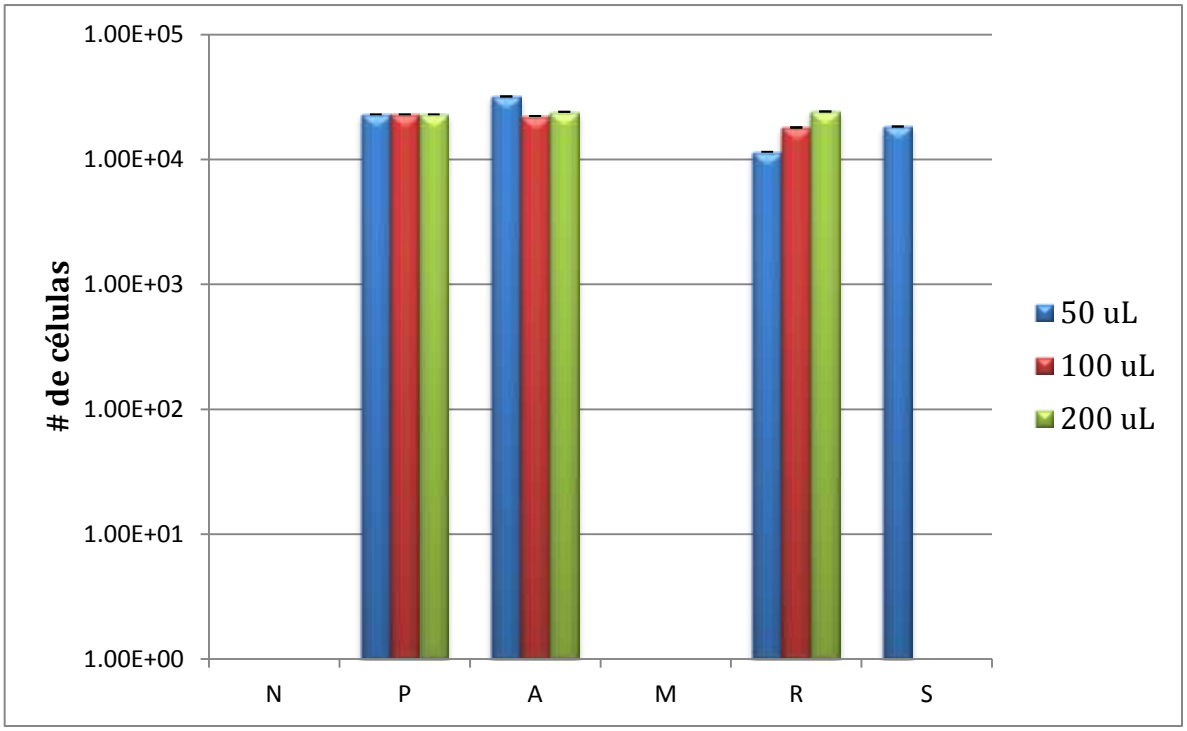
VII. RESULTADOS

Viabilidad: Para la realización del ensayo experimental se llevó a cabo la técnica del colorante azul de tripano, obteniendo por arriba del 90% de viabilidad, continuando con los ensayos de citotoxicidad y proliferación.

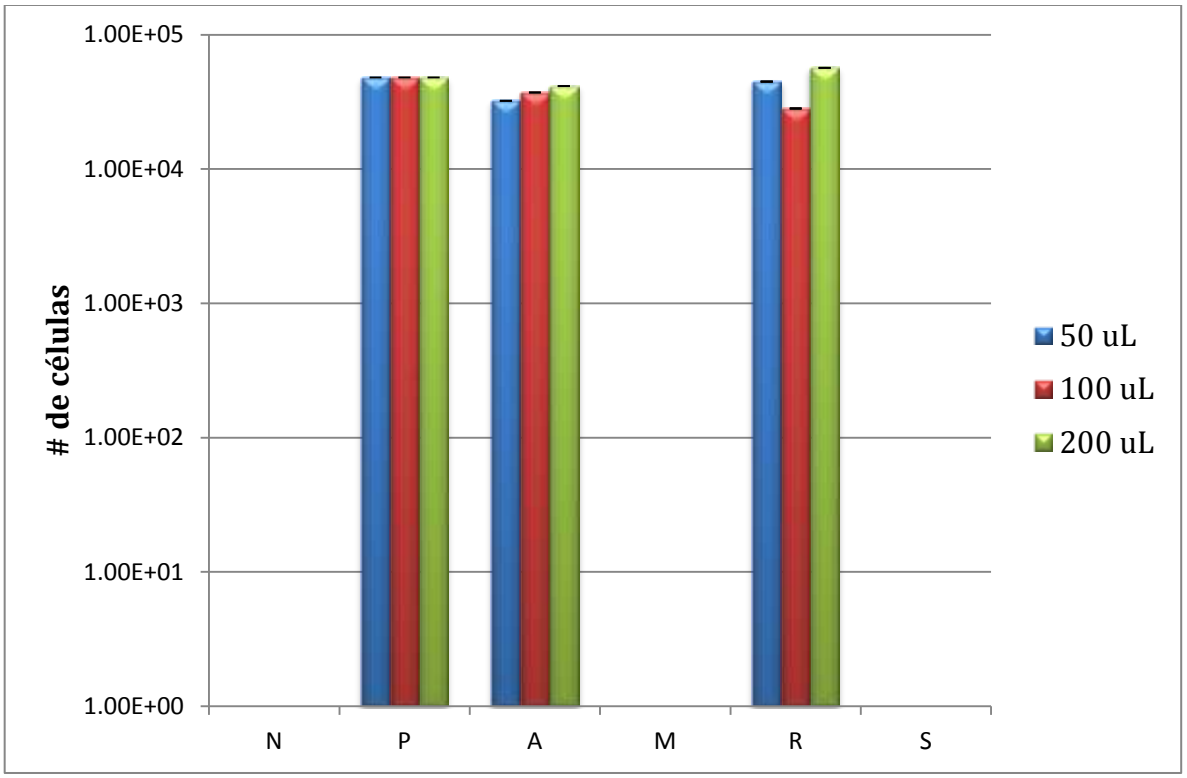
Proliferación: AH Plus y Roeko Seal muestran una proliferación mayor a la del grupo control positivo creciente conforme los rangos de tiempo experimental. Roeko Seal mostro una proliferación mayor que AH Plus y el Grupo Control positivo, Disminuyendo en el rango de 72 horas. Por el contrario MTA Fillapex mostro nula proliferación desde el rango de tiempo 0, en cambio, Sealapex presento moderada proliferación en el rango de tiempo 0, pero disminuyo en el rango de 24, 48 y 72 horas.

Citotoxicidad: Sealapex mostro elevada citotoxicidad desde el rango de tiempo 0 en las 3 concentraciones de estudio, siendo MTA Fillapex el que mostro diferencia estadísticamente significativa a las 72 horas en las 3 concentraciones estudiadas. AH plus presento la mínima citotoxicidad en el rango de 72 horas. Roeko Seal presento elevada citotoxicidad en el rango de 48 horas, disminuyendo significativamente en el horario de 72 horas.

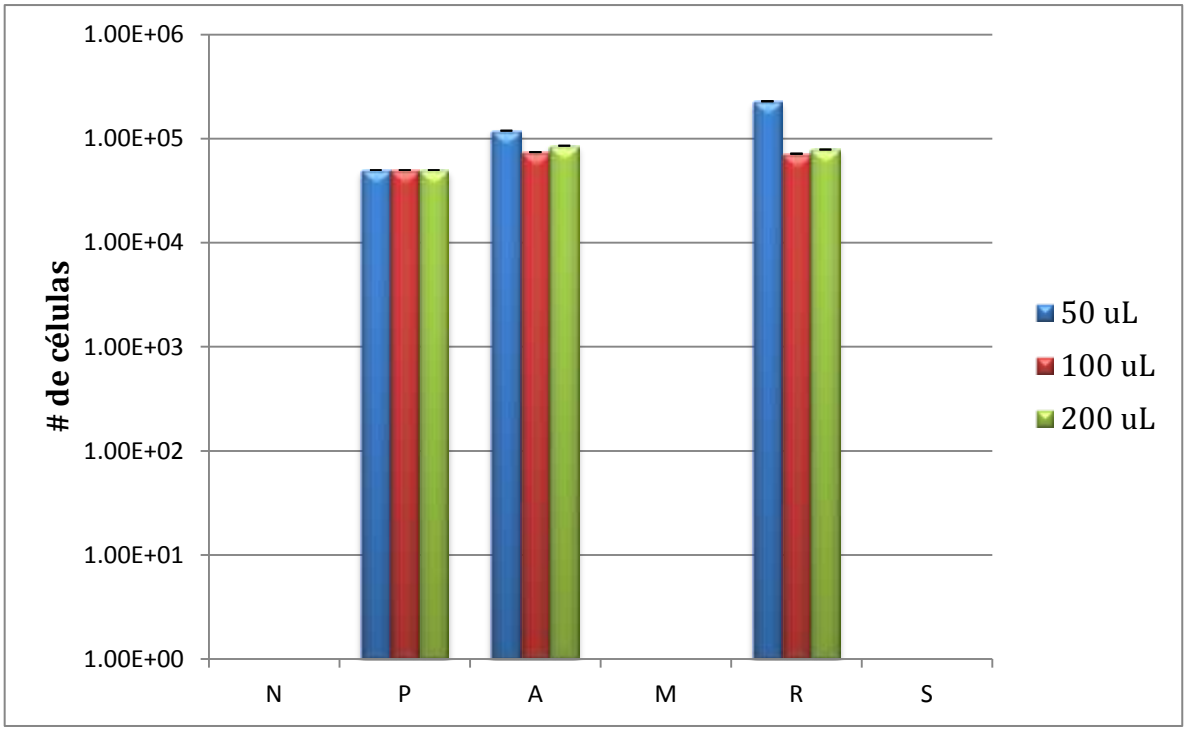
Proliferación 0 horas



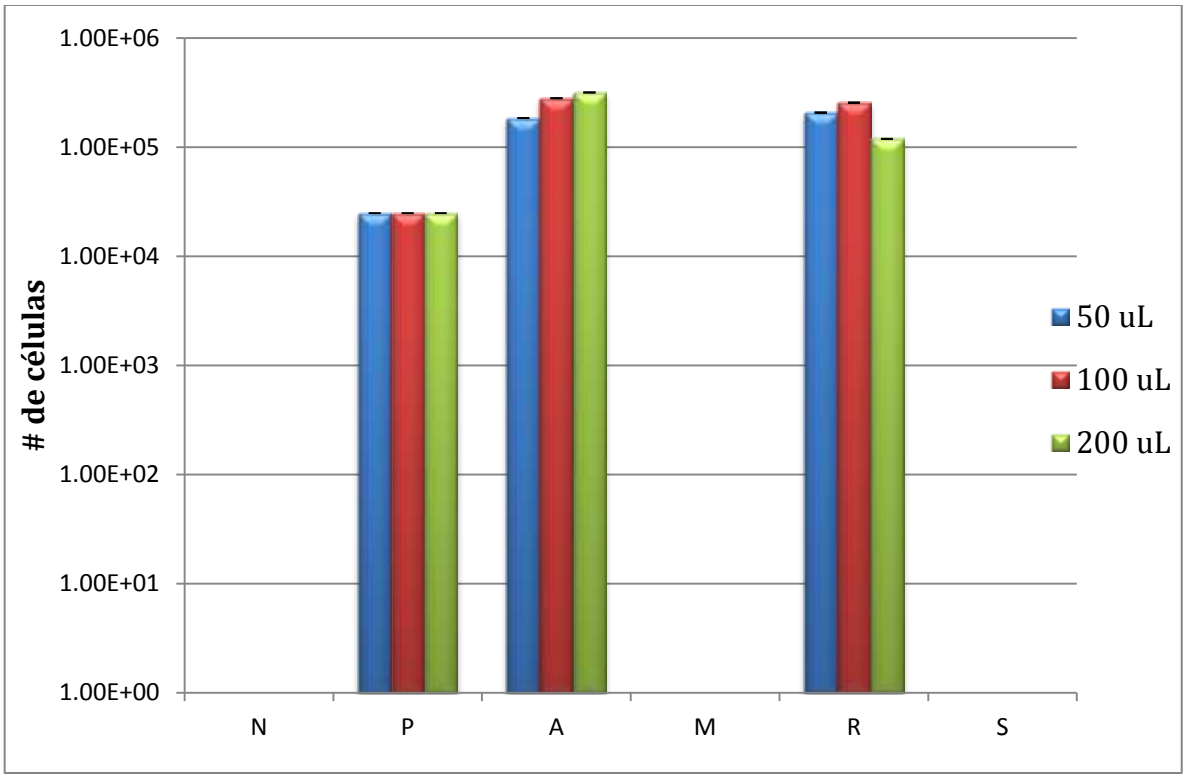
Proliferación 24 horas



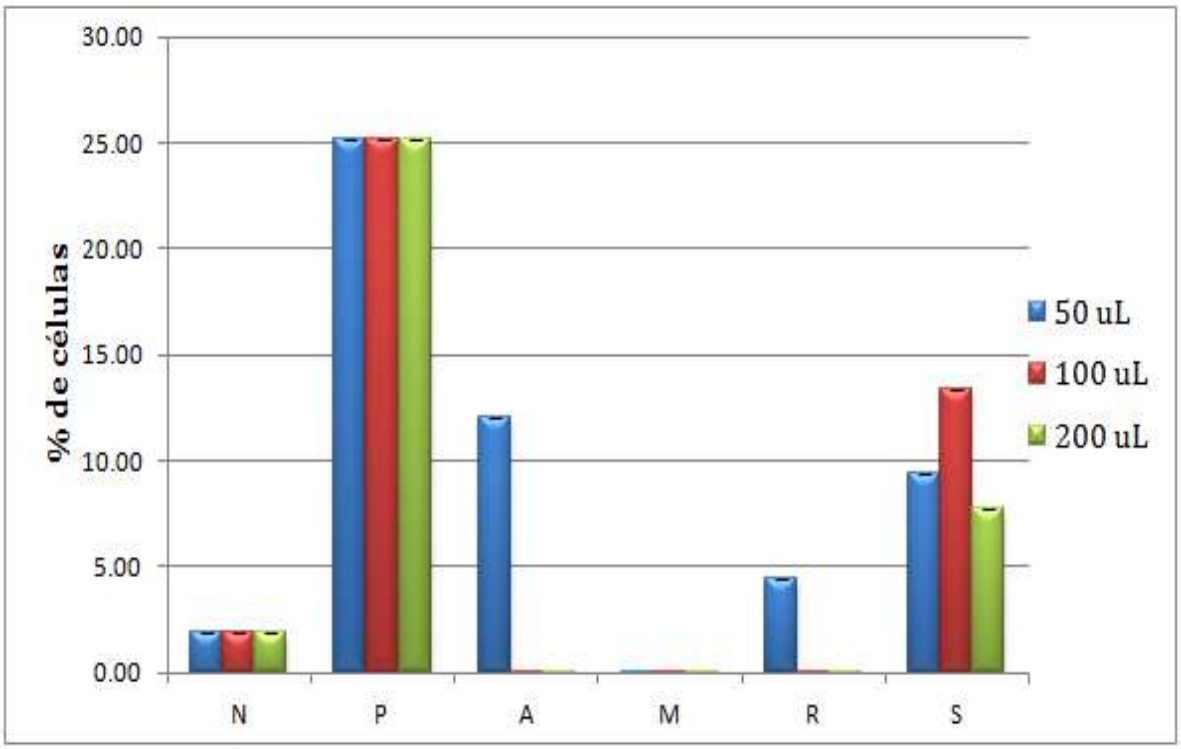
Proliferación 48 horas



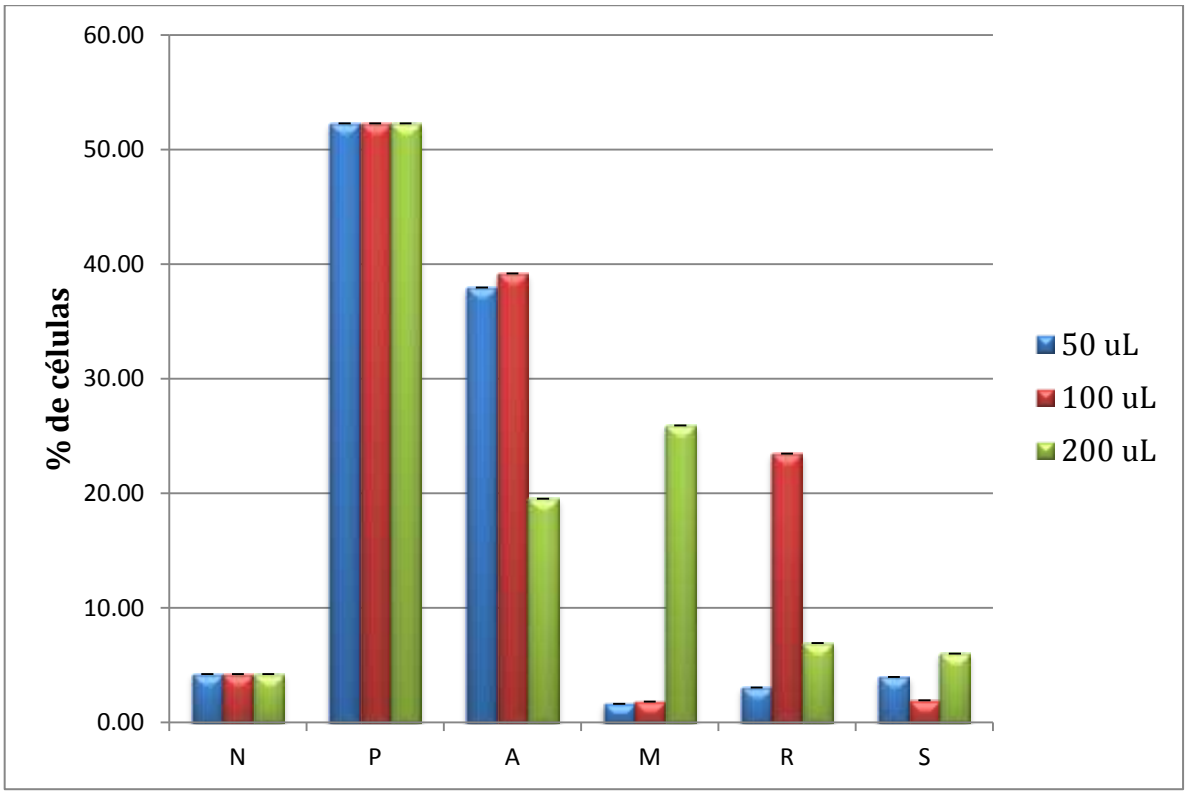
Proliferación 72 horas



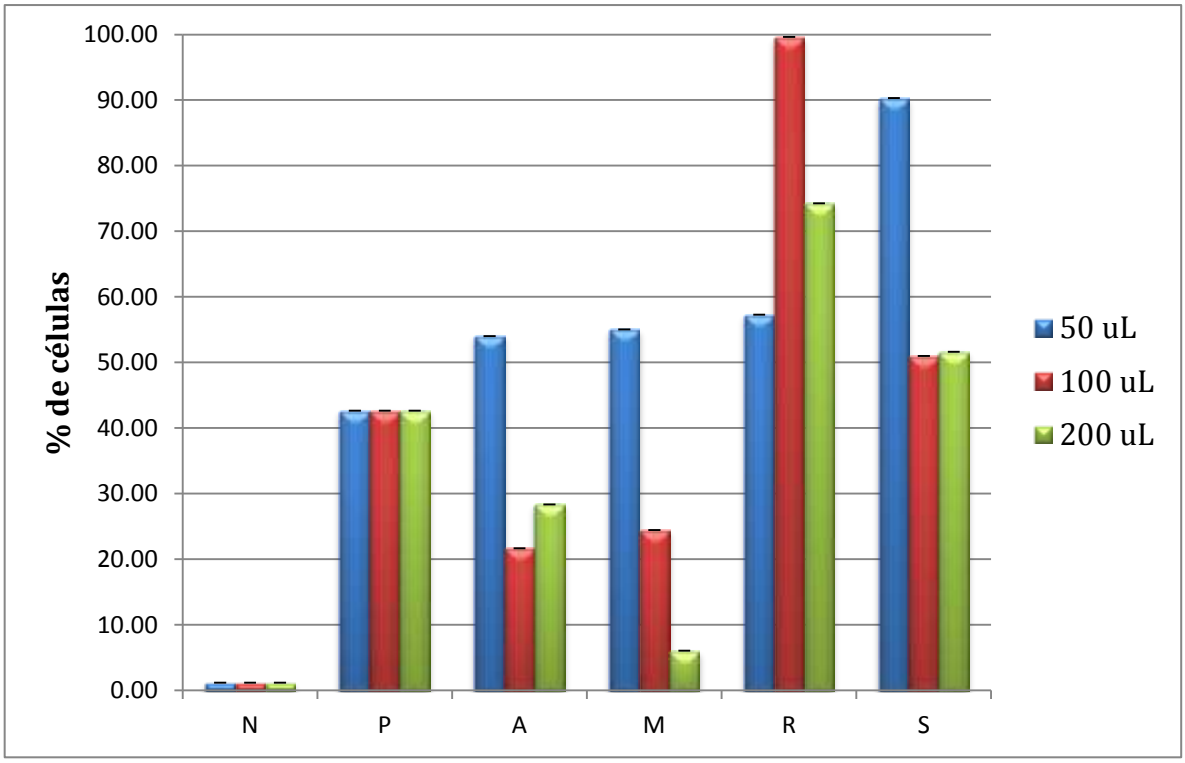
Citotoxicidad 0 horas



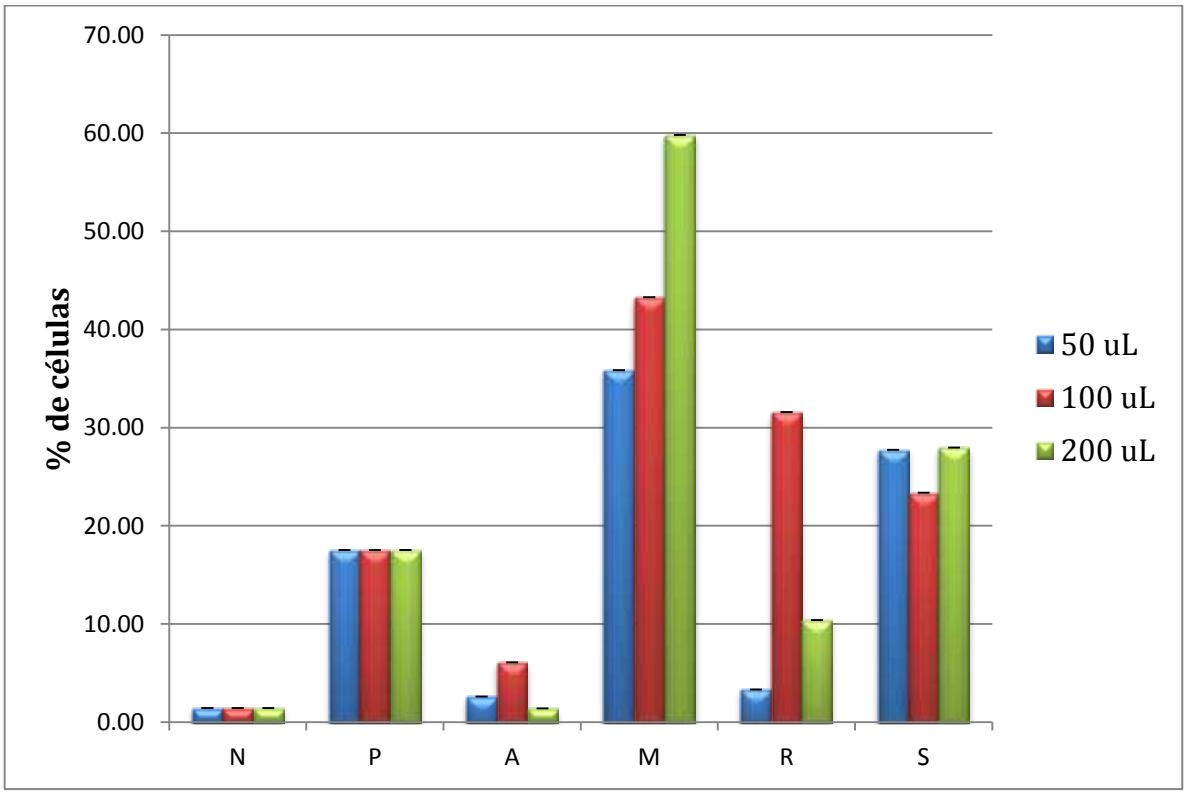
Citotoxicidad 24 horas



Citotoxicidad 48 horas



Citotoxicidad 72 horas



VIII. DISCUSIÓN

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, por lo que difiere de nuestros resultados, ya que nosotros encontramos citotoxicidad con diferentes cementos selladores sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano.[6]

Bethany realizó un estudio sobre citotoxicidad de cementos selladores donde concluye que todos los cementos exhiben severa citotoxicidad a las 24 hrs. Coincidimos con este estudio en que la citotoxicidad de AH Plus disminuye gradualmente. [9] También coincidimos con Gheshiaghi y cols. que evaluaron la citotoxicidad de un nuevo cemento a base de resina epóxica, Como resultados AH Plus induce una significante citotoxicidad en las primeras fases del tratamiento y desaparece después de 4 horas. [11]

No coincidimos con Peralta M. ya que realizó un estudio in vitro de la citotoxicidad de tres selladores endodónticos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929 concluyendo que los selladores a base de silicona constituyen la primera elección para el tratamiento de conductos. [7] Sin embargo, coincidimos con Silva y cols. que evaluaron la citotoxicidad del MTA Fillapex y encontraron que fue más citotóxico que AH Plus. También 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. [19].

Camps y cols. realizaron un estudio de citotoxicidad de selladores endodónticos. En los resultados la citotoxicidad de Sealapex decrece con el tiempo, pero la de AH Plus y Cortisomol no. Coincidimos en los resultados de Sealapex, pero no con el resultado de que la citotoxicidad de AH Plus no disminuye conforme pasa el tiempo. [18]

Coincidimos con el estudio realizado por Leyhausen y cols. en el que se muestra que AH Plus puede causar una leve o nula injuria. [35] También coincidimos con Lee y cols. ya que sus resultados mostraron que la resina epóxica presenta una aceptable baja citotoxicidad. [49]

Miletic y cols. evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores como RoekoSeal y AH Plus *in vitro* en fibroblastos de piel de ratón. Diferimos con sus resultados en que AH Plus mostró significativamente mayor citotoxicidad en las evaluaciones y que Roeko Seal no es citotóxico. [25]

IX. CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

1. AH Plus es el menos citotóxico en todas las concentraciones y rangos de tiempo estudiados, determinado por daño celular y la inducción de proliferación.

2. MTA Fillapex es el más citotóxico a largo plazo, mostrando una muerte celular total.

3. En el presente estudio se ve demostrado que los materiales de ensayo pueden causar daño celular sin llegar a la muerte como es el caso del MTA Fillapex, que muestra nula citotoxicidad en los primeros rangos del tiempo experimental y significativamente alta citotoxicidad en el rango de 72 horas, debido al daño celular presente se pueden mostrar falsos positivos en cuanto a proliferación.

Perspectiva

Se debe evaluar qué tipo de muerte celular es la que se está llevando a cabo en este tipo de ensayo experimental.

El sistema que se utilizó me permite evaluar otro tipo de materiales.

X. BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Topalian K. M. Efecto citotóxico de los cementos selladores utilizados en Endodoncia sobre el tejido periapical. Publicación electrónica: www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_23.htm. 2002
2. Lioni C. B. Agentes selladores. Relación entre la velocidad de absorción y la biocompatibilidad. Publicación electrónica: www.endojournal.com.ar E.J.E.R //Electronic Journal of Endodontics Rosario//Año 09//Volumen 02//Oct. 2010
3. Cohen S. Vías de la pulpa. Edit. Elsevier Mostby. 9a Ed.2008 Pág. 365-403.
4. Ochoa C., Pulido E., Rueda K. Articulo de revisión de cementos en Endodoncia. Pontifica Universidad Javeriana. Publicación electrónica: http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i_a_revision39.html
5. Racciatti G. Agentes selladores en endodoncia. Publicación electrónica: rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/1380/10-431PB.pdf?sequence=1
6. Gomes-Filho J., Watanabe S., Gomes A., Faria M., Lodi C., Penha S. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. (J Endod 2009;35:1577-1579)
7. Peralta M., Uribe E., García R., Gutiérrez O. Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929. R e v i s t a Odontológica Mexicana 2006;10 (2): 63-68

8. Briseño B., Willershausen B. Root Canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. Zinc oxide-eugenol-based sealers. Journal of Endodontics Vol. 16, N° 8, august 1990.
9. Bethany A., Bryan T., Looney S., Guillen B., Loushine R., Weller R., Pashley D., Tay F. Setting properties and cytotoxicity. Evaluation of a Premixed Bioceramic Root Canal Sealer. J Endodon 2011; 37:673-677.
10. Bae W., Chang S., Lee S., Kum K., Bae K., Kim E. Hjuman Periodontal ligament cell response to a newly developed Calcium Phosphate-based Root Canal Sealer. J Endodon 2010; 36:1658-1663.
11. Gheshiaghi N., Heidari M., Samadi Z., Shokri F. *In vitro* Cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. J Endodon vol. 25, N°8, august 2000.
12. Oliveira S., Ribeiro A., Teixeira A., Lima M., Quercia L. In Vitro Evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. J Endodon Vol. 29, N° 2, february 2003.
13. Gómez P. Cementos selladores en Endodoncia. Publicación electrónica: scienti.colciencias.gov.co:8084/publindex/docs/articulos/1692-5106/1/5.pdf
14. Gerosa R., Menegazzi G., Borin M., Cavalleri G., Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. Journal of Endodontics Vol. 21 N°.9 september 1996.
15. Tai K., Huang F., Chang Y. Cytotoxic evaluation of root canal filling marerials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hámster cell line. Journal of endodontics. Vol. 27 N°. 9 september 2001.
16. Key J., Rahemtulla F., Eleazer P. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. J Enddon 2006;32:756-758.

17. Briseño B., Willershausen B. root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts. III. Calcium Hydroxide-based sealers. Journal of Endodontics. Vol. 18. N°.3, March1992.
18. Camps J., About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: A new method. Journal of endodontics. Vol. 29 N°. 9, September 2003.
19. Silva E., Rosa T., Herrera D., Jacinto R., Gomes B., Zaia A. Evaluation of citotoxicity and physicochemical propieties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA fillapex. (J Endod 2012; :1-4).
20. Bin C., Valera M., Camargo S., Rabelo S., Silva G., Balducci I., Camargo C. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on Mineral Trioxide Aggregate. (J Endod 2012, 38:495-500).
21. Loushine B., Bryan T., Looney S., Gillen B., Loushine R., Weller N., Pashley D., Tay F. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. (J Endod 2011; 37:637-677).
22. Lee B., Son H., Jin H., Koh J., chang H., Hwang I., Hwang H., Oh W. Citotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. (J Endod 2012;38:1627-1630).
23. Xu P., Liang J., Dong G., Zheng L., Ye L. Citotoxicity of RealSeal on human osteoblas-like MG63 cells. (J Endod 2010;36:40-44).
24. Pinna L., Brackett M., Lockwood P., Huffman B., Mai S., Cotti E., Dettori C., Pashley D., Tay F. *In vitro* cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, Methacrylate resin-based root canal sealer. (J Endod 2008;34:1085-1088).

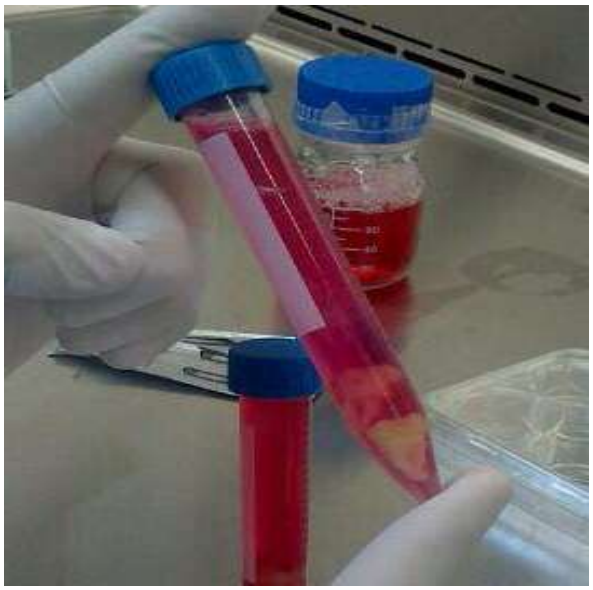
25. Miletic I., Devcic N., Anic I., Borcic J., Karlovic Z., Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. JOE— Volume 31, Number 4, april 2005.
26. Zhang W., Torabinejad M., Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using MTT-Tetrazolium Method. JOE- Volume 29, Number 10, october 2003.
27. Camps J., About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. JOE- Volume 29, Number 9, september 2003.
28. Neff T., Layman D., Jeansonne B. In vitro cytotoxicity evaluation of endodontic sealers exposed to head before assay. JOE- Volume 28, Number 12, december 2002.
29. Willershausen B., Briseño B., Schafer D., Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. JOE- Volume 26, Number 12, december 2000.
30. Gheshlaghi N., Heidari M., Bahrami Z., Shokri F. *In vitro* cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. JOE- Volume 26, Number 8, august 2000.
31. Tai K., Chang Y. Cytotoxicity evaluation of perforation repair materials on human periodontal ligament cells *in vitro*. JOE- Volume 26, Number 7, july 2000.
32. Leonardo R., Consolaro A., DDS, Zeppone C., Leonardo M. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. JOE- Volume 26, Number 6, june 2000.

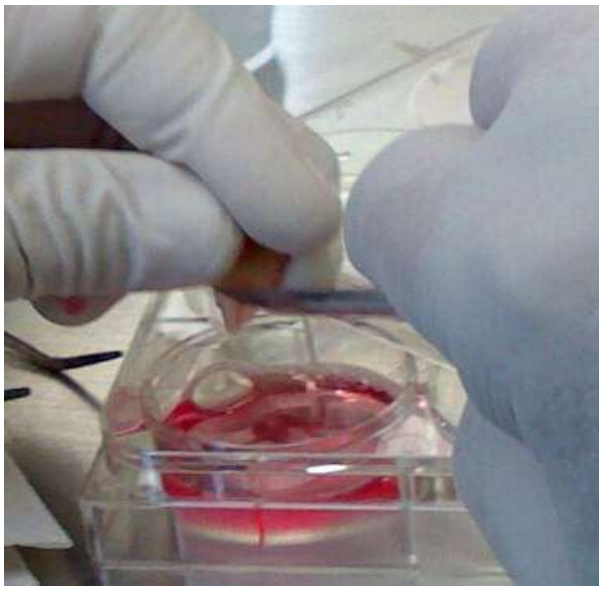
33. Keiser K., Johnson C., Tipton D., Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. JOE- Volume 26, Number 5, may 2000.
34. Cohen B., Pagnillo M., Musikant B., Deutsch A. An *in vitro* study of the cytotoxicity of two root canal sealers. JOE- Volume 26, Number 4, april 2000.
35. Leyhausen G., Heil J., Reifferscheid G., Waldmann P., Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH Plus. JOE- Volume 25, Number 2, february 1999.
36. Chang Y., Huang F., Cheng M., Chou L., Chou M. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. JOE- Volume 24, Number 9, september 1996.
37. Osorio R., Hefti A., Vertucci F., Shawley A. Cytotoxicity of endodontic materials. JOE- Volume 24, Number 2, february 1998.
38. Torabinejad M., Ford P., Kettering D. Cytotoxicity of four root end filling materials. JOE- Volume 21, Number 10, october 1995.
39. Araki K., Suda H, Spangberg L. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 Cells and human periodontal ligament fibroblasts. JOE- Volume 20, Number 2, february 1994.
40. Tagger M., Katz A. Radiopacity of endodontic sealers: development of a new method for direct measurement. JOE-Volume 29, Number 11, november 2003.

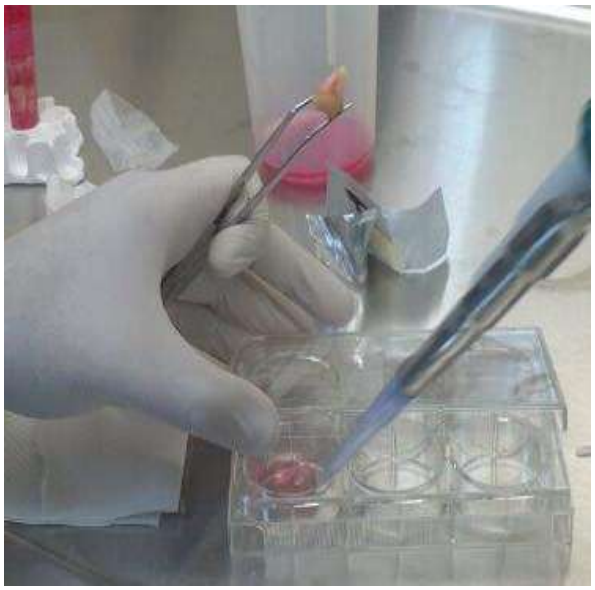
41. Araki K., Suda H., Barbosa S., Spangberg L. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. JOE-Volume 19, Number 11, november 1993.
42. Briseño B., Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. II. Silicone- and resin- based sealers. JOE- Volume 17, Number 11, november 1991.
43. Spangberg L., Pascon E. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. JOE- Volume 14, Number 5, may 1988.
44. Nakamura H., Sakakibara F., Matsumoto Y., Hirano S., Hayakawa H., Sakai K. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. JOE- Volume 12, Number 4, april 1986.
45. Antrim D. 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. JOE- Volume 2, Number 4, april 1976.
46. Tavares C., Bottcher D., Assmann E., Kopper P., Poli J., Soares F., Tissue reactions to a new Mineral Trioxide Aggregate–containing endodontic sealer. JOE- Volume, Number, 2013.
47. Desai S., Chandler N. Calcium hydroxide–based root canal sealers: A review. JOE- Volume 35, Number 4, april 2009.
48. Khashaba R., Chutkan N. 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. Int Endod J. 2009; 42(8):711-8.

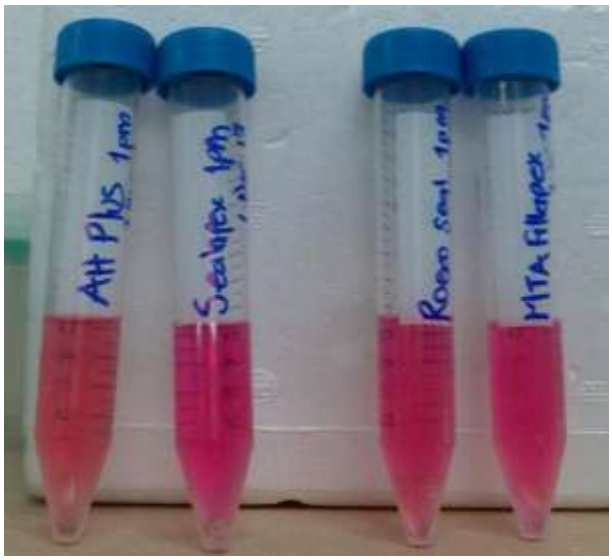
49. Lee S., Chung J., Park E., Jeon H., Kim H. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. Clin Oral Investig. 2013; 17(3):1009-15.
50. Queiroz C., Soarez J., Leonardo R., Carlos I., Dinelli W. Evaluation of cytotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. J Appl Oral Sci. 2005; 13(3):237-42
51. Truque P., Pozos A., Galicia O. Evaluación de la citotoxicidad in vitro de los materiales de obturación gutapercha y Resilon en cultivos de líneas celulares y células de ligamento periodontal humano. SLP Premio de Investigación Dr. Ramón García Valverde 2006
52. De la Cruz E., Figueredo L., Gomez J., Jimenez I., Montes I., Roca S. comparación del efecto citotóxico de tres agentes quelantes sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano. Estudio in vitro. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2012; 28 (3): 402-410
53. Cortázar C., García R., Willershausen I., Willershausen B., Briseño B., Evaluación de la citotoxicidad de distintos cementos selladores endodónticos en cultivos de fibroblastos gingivales. Rev. Od. Mex. Vol. 17, Núm. 1 Enero-Marzo 2013 pp 33-41

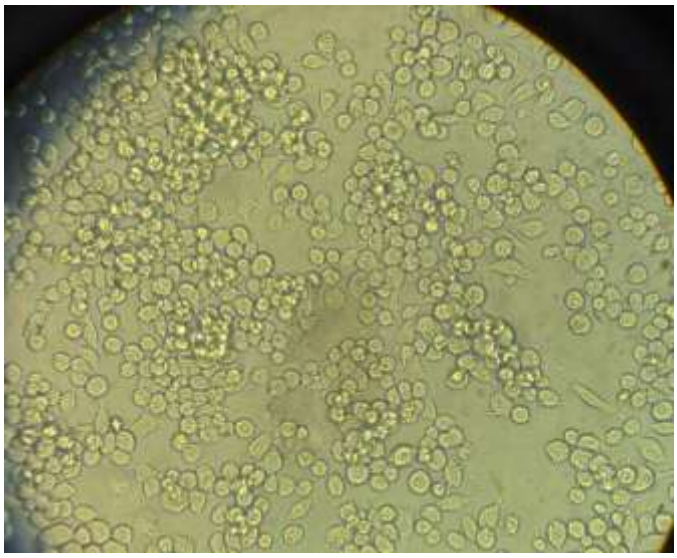
ANEXOS

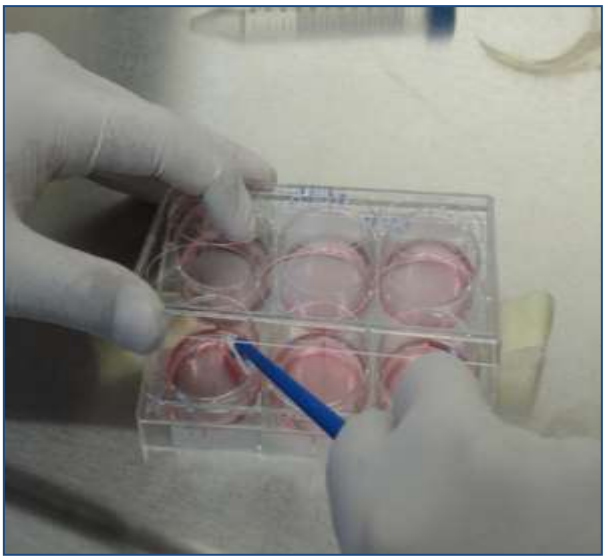


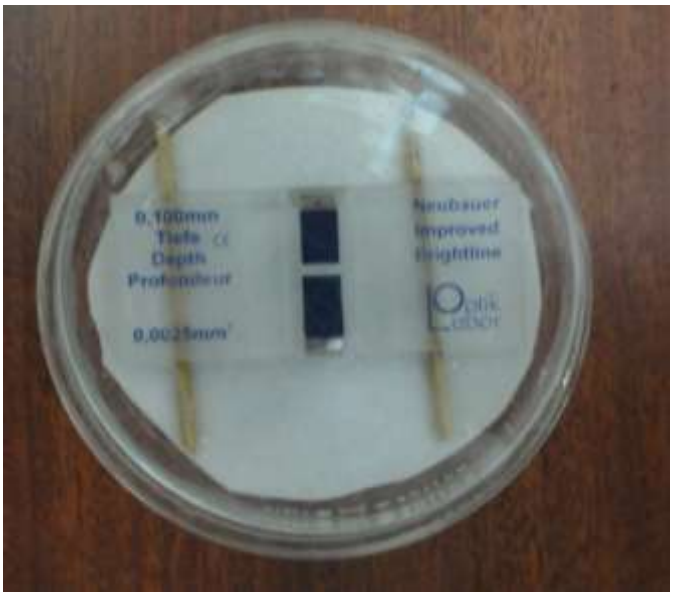
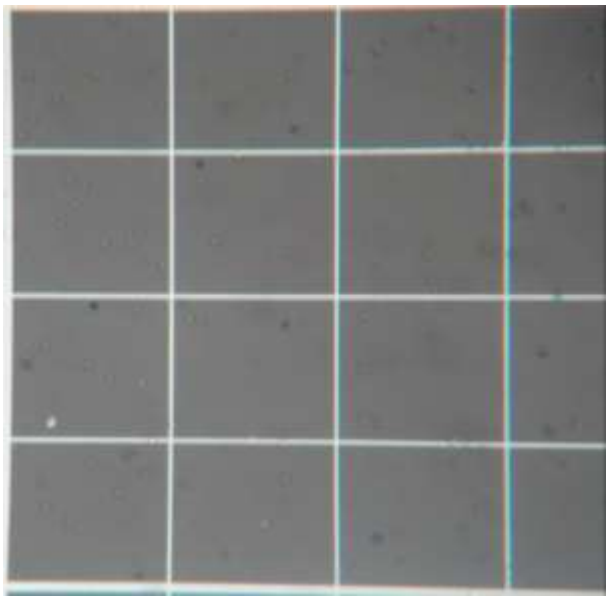
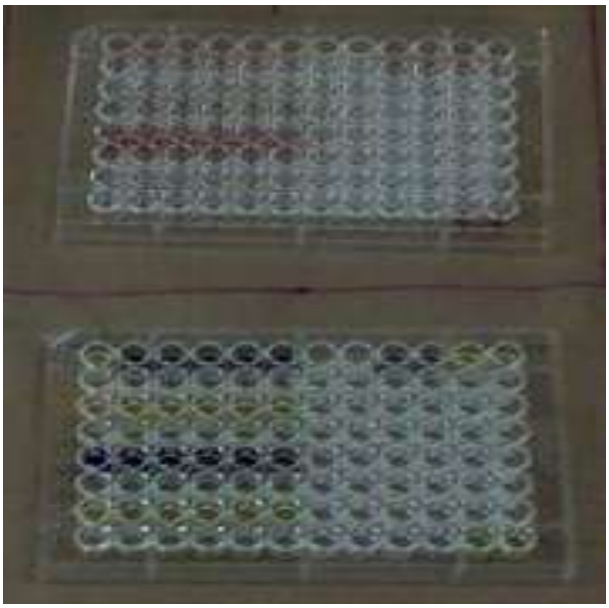





AH Plus 1gm
Sealapex 1gm
Roeko Seal 1gm
MTA Fillapex 1gm






0,100mm
Tiefe
Depth
Profondeur
0,0025mm²
Neubauer
improved
Bright-line