

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



**EFFECTO DE CEMENTOS SELLADORES SOBRE LA VIABILIDAD EN  
FIBROCARTELAGO *IN VITRO***

No. de registro: 2015-5

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

**CD. OLGA LUCÍA LÓPEZ ZAMORA**

**Directores de Tesis:**

**DRA. GLORIA YOLANDA CASTRO SALAZAR**

**DR. ROSALÍO RAMOS PAYÁN**

**Asesor:**

**DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia.

A Dios que me ha dado la paciencia, sabiduría y la fuerza para sacar esto adelante impulsándome en cada paso que he dado.

A mi madre Olga Zamora Salazar por su ejemplo de mujer, por ser mi guía en la vida, por su esfuerzo y constante apoyo, además por esa fortaleza interna que me ha sabido transmitir y por ayudarme a formarme como profesionalista.

A mi padre Héctor Manuel López Castro por sus consejos, apoyo y cariño constante y estar día a día ayudándome en lo que necesite.

A mi hermano Jesús Héctor López Zamora quien ha sido mi guía para llegar a este camino, ya que con su ejemplo he salido adelante.

A mi chiqui preciosa Samantha López que siempre estuvo ahí para motivarme y ser mi distracción en momentos de estrés.

A Hiram Monroy Caro por ser mi mejor amigo, por el apoyo que siempre me brindó, paciencia y confianza para lograr esto y por sus palabras de aliento para seguir siempre adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A la Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar, por saber guiarme en la realización de este trabajo de investigación, por su apoyo, por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme en cada situación que lo requería.

Al Dr. Alfredo del Rosario Ayala Ham por su entrega en mi aprendizaje, por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Verena Morales Carreon, por el apoyo que siempre me brindó a lo largo de este sueño, por ser una gran persona, maestra y amiga en la cual supo estar siempre.

A la Dra. Itzel Castro Sánchez, por ser una muy buena maestra, amiga además, estar siempre dispuesta en ayudarme de una manera desinteresada, gracias por el apoyo y conocimientos brindados.

Al Dr. Geovanni Romero, Dra. Erika Silva Benítez y Dr. Eduardo Soto, por guiarme en la realización de este trabajo de investigación.

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 Cazare, Dr. Geovanni Romero Quintana, Dr. Rosalío Ramos, Dra. Maribel Aguilar. Por compartir sus conocimientos y contribuir a mi formación personal.

A la Dra. Margarita Castro por su sincera amistad, y la ayuda que siempre me brindó en todo momento.

A mis amigos y compañeros Casian, Ulises, Noe, Poncho, Denis, Renan, Faby y Melky por los momentos que compartimos juntos, experiencias únicas.

## RESUMEN

**Introducción.** - El objetivo del tratamiento endodóntico es la limpieza, conformación del sistema de conductos radiculares y la obturación total del espacio preparado con un material inerte, estable y biocompatible. El cemento sellador se deposita en la zona más profunda del ápice en contacto directo con las células, permitiendo su destrucción y desencadenando inflamación, procesos inmunológicos y dolor postoperatorio interfiriendo con la reparación posterior al tratamiento, lo cual puede resultar en nuevas intervenciones quirúrgicas; por esto el objetivo de este trabajo fue determinar la biocompatibilidad de cuatro cementos selladores de conductos radiculares (RoekoSeal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) sobre fibrocartílago.

**Materiales y métodos.**- Se realizó un estudio experimental, in vitro, longitudinal y prospectivo. Se utilizó una línea celular primaria de fibrocartílago humanos, para evaluar la citotoxicidad, proliferación y viabilidad, después de la exposición a 4 selladores endodónticos a una concentración de 10 y 40 mg/ml a las 24, 72 y 96 horas. Para el ensayo de citotoxicidad se empleó el kit "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" (Promega, CA), para la proliferación el kit "CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay" (Promega, CA) y la viabilidad se evaluó con azul tripano. Se realizó un análisis estadístico con la prueba de t-Student y ANOVA de un factor de significancia del 95%. **Resultados.**- El cemento AH PLUS fue el más citotóxico e inhibió mayormente el crecimiento celular en relación con los otros cementos, en todos los tiempos estudiados. En cambio, Roekoseal ocasionó la menor inhibición y citotoxicidad en

fibrocartílago. **Conclusiones.**- Este trabajo nos permite concluir que en cuanto a la propiedad de biocompatibilidad, el cemento AH Plus es el más citotóxico y Roekoseal (cemento a base de silicona) es el más recomendable para uso clínico. **Palabras clave:** Biocompatibilidad, citotoxicidad, fibrocartílago, cemento sellador de conductos, AH Plus, RoekoSeal, Sealapex, MTA Fillapex.

## **Abstract**

**Introduction:** The aim of endodontic treatment is cleaning, shaping the root canal system and the total sealing of the space prepared with an inert, stable and biocompatible material. Cement sealer is deposited in the deepest part of the apex in direct contact with the cells, allowing their destruction and triggering inflammation, immune processes and postoperative pain with the subsequent repair treatment, which can result in new operations; therefore the aim of this study was to determine the biocompatibility of four sealing root canal cements (RoekoSeal, Sealapex, MTA Fillapex, AH Plus) on fibrocartilage. **Materials and methods:** an experimental study was conducted in vitro, longitudinal and prospective. a primary human cell line fibrocartilage was used to evaluate the cytotoxicity, proliferation and viability, endodontic sealants exposed to 4 with a concentration of 10 and 40 mg / ml at 24, 72 and 96 hours. For the cytotoxicity assay kit "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay," (Promega, CA) was used for the proliferation kit "CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay" (Promega, CA) and viability was evaluated with trypan blue. A statistical analysis with the Student t-test and one-way ANOVA significance of 95% was performed. **Results:** AH Plus cement was the most cytotoxic and mostly inhibited cell growth relative to other cements, in all times studied. Instead, RoekoSeal caused the lower inhibition and cytotoxicity, in fibrocartilage. **Conclusions:** This work allows us to conclude that as far as the property of biocompatibility, the AH Plus cement is the most cytotoxic and RoekoSeal (silicone-based cement) is the most suitable for clinical use.

**Keywords:** Biocompatibility, cytotoxicity, AH Plus, fibrocartilage cell, root canal sealer, RoekoSeal, Sealapex, MTA Fillapex.



# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	MARCO TEÓRICO .....	3
2.1.	Materiales de obturación.....	3
2.1.1.	Gutapercha.....	4
2.1.2.	Cementos selladores.....	5
2.1.2.1.	RoekoSeal .....	7
2.1.2.2.	AH Plus.....	8
2.1.2.3.	MTA Fillapex .....	10
2.1.2.4.	Sealapex.....	10
2.2.	Compatibilidad biológica .....	11
2.3.	Tejido Cartilaginoso .....	12
2.3.1.	Condroblasto .....	12
2.3.2.	Cartílago hialino.....	13
2.3.3.	Cartílago elástico.....	13
2.3.4.	Cartílago fibroso .....	13
2.4.	Proceso de reparación .....	15
2.5.	Antecedentes .....	17
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
IV.	JUSTIFICACIÓN .....	26
V.	OBJETIVOS.....	27
5.1.	OBJETIVO GENERAL .....	27
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
6.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28

6.2.	MUESTRA DE ESTUDIO.....	28
6.3.	CEMENTOS SELLADORES.....	28
6.4.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	29
6.5.	LUGAR DE REALIZACIÓN.....	29
6.6.	PROCEDIMIENTO.....	30
6.6.1.	ENSAYOS DE VIABILIDAD .....	31
6.6.2.	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN .....	32
6.7.	ENSAYOS DE DAÑO CELULAR.....	32
6.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	34
VII.	RESULTADOS .....	35
7.1.	VIABILIDAD CELULAR.....	35
7.2.	CITOTOXICIDAD.....	36
7.3.	PROLIFERACIÓN.....	42
VIII.	DISCUSIÓN .....	48
IX.	CONCLUSIONES.....	51
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	52

# 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. Este 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 fibrocartílago.

## **II. MARCO TEÓRICO**

Los objetivos principales de un buen tratamiento endodóntico la limpieza y conformación adecuada 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 radicular lo más hermética posible, se consideran fundamentales para tener el éxito en 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 periápice 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 micro filtraciones ocasionando el paso de microorganismos y sus toxinas, por ello es necesario tomar en cuenta la 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 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 presenta.

Además de los requisitos básicos para materiales de obturación, Grossman enumero 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 cementos 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 de vidrio, de resinas compuestas y agentes de adhesión a dentina, de cementos fosfato de calcio y de silicones.



### 2.1.2.1. RoekoSeal

RoekoSeal 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).

RoekoSeal es considerablemente menos citotóxico que los cementos selladores a base de resina epoxi (22). Además en diversos estudios RoekoSeal 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. RoekoSeal combina las propiedades del material excepcionales como excelente fluidez, sin contracción y biocompatibilidad con el manejo práctico. No hay riesgo de mezcla incorrecta. RoekoSeal proporciona un sello excelente y establece nuevos estándares en calidad y biocompatibilidad en endodoncia. RoekoSeal 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.

Entre las ventajas que poseen 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 el 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).

### 2.1.2.3 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° 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).

### 2.1.2.4 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  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  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 un medio seco 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, más 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 humanas tales como fibrocartílago.

### **2.3. Tejido Cartilaginoso**

El tejido cartilaginoso es una variedad especial de tejido conjuntivo que está constituido principalmente por la matriz cartilaginosa, semejante a un gel, en la cual sus células, los condrocitos, se sitúan en pequeñas cavidades denominadas lagunas (39).

El tejido cartilaginoso se origina del mesodermo. En los lugares del embrión donde se formará tejido cartilaginoso de manera definitiva o en las zonas donde posteriormente el tejido cartilaginoso se transformará en tejido óseo, las células mesodermales se diferencian en células mesenquimatosas las cuales a continuación darán origen a las células osteocondrógenas(40).

#### **2.3.1. Condroblasto**

Son células que se diferencian de las denominadas osteocondrógenas y posteriormente de las condrógenas. El estímulo de diferenciación es la existencia de una menor tensión de oxígeno en el mesénquima en proceso de diferenciación y del factor expresión Sox 9.

Cuando los condroblastos aumentan la secreción de matriz cartilaginosa amorfa y fibrilar y se rodean de ella, se transforma en condrocitos jóvenes estas siendo las células más abundantes del cartílago (40).

Existen tres tipos de cartílago: hialino, elástico y fibroso, los cuales se diferencian fundamentalmente por la cantidad de sustancia amorfa que presenta y por el tipo de fibra que predomina en la matriz cartilaginosa (39).

### 2.3.2. Cartílago hialino

Es el más frecuente en el organismo y presenta un aspecto homogéneo. Los condrocitos están incluidos en lagunas en el seno de la matriz que ellos segregan y son células esféricas, con un núcleo central luminoso y uno o dos nucléolos (39).

### 2.3.3. Cartílago elástico

Sus células son similares a la del hialino, tienen la misma forma esférica, aunque menor cantidad de grasa y glucógeno, y están rodeadas por la matriz territorial, formando una cápsula gruesa.

### 2.3.4. Cartílago fibroso

Los condrocitos se encuentran distribuidos aisladamente o en parejas, y alineados en el cartílago fibroso, entre las fibras colágenas.

La sustancia fundamental es muy poco visible, excepto la matriz territorial o cápsula fina que se tiñe intensamente (39).

A diferencia de los otros dos tipos de cartílago, que se originan de las células condrógenas, el cartílago conjuntivo o fibrocartílago se forma, por la transformación de fibroblastos que, al momento de iniciar la síntesis y secreción de proteoglicanos y fibras de colágena tipo I, modifican su morfología porque las células fusiformes redondean sus extremos para convertirse en condrocitos (40).

El fibrocartílago como su nombre lo indica contiene numerosos haces paralelos de fibras de colágenas y escasa cantidad de matriz hialina, lo que lo distingue de los otros tipos de cartílago. El fibrocartílago que se localiza en el organismo no se encuentra aislado, sino que se fusiona progresivamente con otros tejidos, tales como el cartílago hialino o tejido fibroso denso de los ligamentos y capsulas articulares.

En cuanto a regeneración es muy pobre, debido a que los condrocitos del cartílago del adulto son incapaces de dividirse; sin embargo, en las lesiones del cartílago próximas a la superficie sinovial, puede ocurrir cierta cicatrización, a expensas de las células sinoviales que proliferan y producen fibrocartílago.

El cartílago puede crecer tanto por aposición de nuevo tejido a la superficie, como por la expansión desde el interior por crecimiento y multiplicación de condrocitos y el hueso por su dureza crece sólo por aposición (39).



## **2.4. Proceso de reparación**

El proceso de reparación o regeneración es una serie de eventos que ocurren posteriores a la remoción de los agentes que desencadenan una reacción de defensa del organismo, como es la inflamación. Este mecanismo de defensa puede originarse con agentes infecciosos, como son bacterias, hongos y virus; o por agentes externos tales como traumatismo, procedimientos iatrogénicos, extracción de material de cemento sellador (41).

Trowbridge & Emling (1996), mencionan que los eventos de reparación ocurren después de la inflamación; sin embargo, hay una sobre posición, pues tanto en la inflamación aguda como en la crónica se produce el proceso de fagocitosis, fundamental para la instalación del proceso de reparación, así como la fibroplasia y angiogénesis frecuentes en la fase crónica y también en la reparación (42).

La reparación de un tejido se considera como una fase de la reacción inflamatoria (43). Se inicia al principio de la inflamación e implica dos procesos separados, la regeneración del tejido lesionado por células parenquimatosas del mismo tipo y la sustitución por tejido conjuntivo que producen una regeneración permanente (44). Esto depende de la capacidad regenerativa de las células afectadas, extensión de la lesión y actividad proliferativa del estroma conjuntivo (42, 45-47).

En conclusión, la reparación es el mecanismo mediante el cual un tejido lesionado o perdido, de cualquier tipo, es sustituido inicialmente por una masa de tejido conjuntivo fibroso (48).

En el tejido oral consiste en fibroplasia, proliferación endotelial y aposición de sustancia fundamental intersticial, colágeno y maduración del tejido conjuntivo (49). En dicho proceso se encuentra la etapa fibroplástica, en la malla de fibrina proveniente de la coagulación de la sangre, permite que los fibroblastos comiencen a depositar tropocolágeno aproximadamente tres o cuatro días después del daño. Pero los fibroblastos también secretan fibronectina, la cual ayuda a estabilizar a la fibrina (50).

La fibrosis o fibroplastia se produce sobre los nuevos vasos en el tejido de granulación y sobre la matriz extracelular laxa que se desarrolla inicialmente en el sitio de reparación. El reclutamiento y estimulación de los fibroblastos es mediado por diversos factores de crecimiento (44).

Cuando la cicatrización es por primera intención, se produce un tejido fibroso que rápidamente se osifica con una mínima formación de callo (50). El callo que se forma está compuesto por cantidades variables del tejido fibroso, cartílago y hueso (43, 51).

El tejido conjuntivo fibroso o callo que se forma en el sitio de la fractura requiere de un alto grado de vascularización para que finalmente ocurra la osificación, si el suministro de oxígeno está comprometido se formará cartílago en lugar de hueso (43, 50, 51). Este cartílago posteriormente se calcificará y será sustituido por hueso esponjoso que luego se remodelará (51).

Por todo lo anteriormente expuesto es necesario hacer una revisión de los estudios realizados previamente a nuestro trabajo de investigación, encontrando entre ellos los siguientes antecedentes.

## **2.5. Antecedentes**

Koulaouzidou (1998) evaluó la citotoxicidad de tres cementos selladores a base de resina: AH26, AH Plus y TopSeal. Se utilizaron células L929 y células de pulpa de ratas, RPC-C2A. La citotoxicidad se determinó por medio de la técnica cuantitativa a las 24 y 48 horas. El AH26 presentó un efecto citotóxico severo, mientras que TopSeal y AH Plus demostraron una influencia tóxica marcadamente menor. No se estableció una diferencia significativa en los grados de citotoxicidad entre el TopSeal y AH Plus. En los tratamientos de conductos, los selladores endodónticos son colocados en los conductos radiculares recién mezclados, por lo que durante un período después de la aplicación clínica, el material provoca respuestas locales debido a los componentes reactivos. Luego del período de fraguado, es posible aún que constituyentes potencialmente tóxicos sean liberados por los materiales, ya sea por filtración hacia los fluidos tisulares, por corrosión o por desgaste físico. En este estudio se concluyó que el potencial citotóxico del AH26 es alto, en especial inmediatamente después de mezclarse. El fabricante afirma que AH Plus contiene nuevos tipos de aminas que disminuyen la cantidad de formaldehído liberado y una reacción de polimerización basada en reacciones de adición térmica epóxico amina. Estos cambios en la composición de AH Plus® pueden producir un efecto

citotóxico de menor intensidad comparado al AH26. Para el autor el AH Plus y TopSeal representan progresos en el desarrollo de materiales endodónticos más compatibles (52).

En un estudio realizado por Holland (1999) para evaluar la reacción del tejido periapical en dientes de perro obturados con gutapercha y Ketac-Endo y Mineral Trióxido Agregado (MTA) en el que luego de un período de 6 meses, se realizó el examen histopatológico. Los resultados revelaron ausencia total de reacciones inflamatorias del tejido periapical y cierre total del foramen apical de todos los dientes obturados con MTA. Los dientes sellados con Ketac-Endo presentaron dos casos de cierre apical parcial y reacciones inflamatorias crónicas leves en el tejido periapical en los casos sobreobturados, mientras en los casos no sobreobturados se observó ausencia total de inflamación en algunos casos e inflamación leve en otros. En conclusión aunque el MTA presentó resultados más favorables que Ketac-Endo, se demostró que ambos materiales estudiados son biocompatibles con el tejido periapical (53).

Leonardo(1999) comparó la liberación de formaldehído de AH26, Endomethasone, AH Plus y TopSeal luego de endurecer, los resultados indicaron que todos los selladores evaluados liberan formaldehído, pero la cantidad liberada por AH Plus y TopSeal es mínima comparada con la concentración liberada por AH26 y Endomethasone (54).

Para evaluar el efecto citotóxico de AH26, AH Plus, Diaket y Apexit, Miletic (2000) se realizó un estudio en el que se usaron dos líneas celulares, células HeLa (carcinoma cervical humano y L929 (fibroblastos cutáneos de ratón).

Se prepararon los selladores bajo condiciones asépticas y se cubrieron con suspensión celular. La toxicidad se estimó determinando el número viable de células con un microscopio de luz, así como, el número total de células presentes a las 24, 48 y 120 horas luego de la exposición de las células a los materiales. Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que AH Plus presenta un marcado potencial citotóxico seguido por AH26, mientras que Diaket fue ligeramente menos tóxico que AH26 y Apexit fue el sellador menos tóxico. La reducción del número de células viables fue menor comparado con los demás selladores en todos los períodos de prueba. Los autores adjudican la elevada toxicidad del AH26 a la presencia de formaldehído, que es liberado del AH26 recién mezclado. Además AH26 y AH Plus contienen un componente de resina epóxica que pueden ser otra causa de la citotoxicidad de ambos materiales. Por último, las aminas presentes en la composición de los materiales que aceleran la polimerización puede estar relacionado con la toxicidad de estos selladores (55).

En el 2000, Nasim Gheshlagh evaluó los efectos citotóxicos de un nuevo sellador a base de resinas epoxi (AH-Plus), junto con dos selladores endodónticos de uso común (AH26 y óxido de zinc-eugenol), el estudio se realizó *in vitro* en un cultivo de fibroblastos gingivales humanos, en el cual AH-Plus, exhibió citotoxicidad severa inmediatamente después de la mezcla que mantendrán solamente por 4 hr después.

En su investigación sobre la compatibilidad biológica de cinco selladores endodónticos, Sealapex, Endion, Super-EBA, Ketac-Endo y AH Plus, en el

2000 Willershausen, utilizaron tres líneas celulares para realizar comparaciones entre ellas y analizar el efecto tóxico en un sistema *in vitro* particular. Las células utilizadas fueron fibroblastos nasales, fibroblastos gingivales y células tumorales epiteliales. El crecimiento y la morfología celular, el contenido proteico de las células y la liberación de prostaglandina E2 celular fueron los parámetros utilizados para determinar la citotoxicidad de los selladores estudiados. Las células se dejaron en contacto con los materiales por 6 días, los medios de cultivo se cambiaron cada 2 días. Al analizar las muestras, se encontraron diferencias significativas en los valores proteicos entre los diferentes materiales y se determinó que la compatibilidad biológica de los materiales varía con cada línea celular. Los fibroblastos gingivales demostraron una reducción significativa de los valores proteicos con todos los materiales. Sealapex y SuperEBA demostraron la menor reducción proteica mientras que Ketac Endo y AH Plus mostraron la mayor inhibición de síntesis de proteínas. Un patrón similar se encontró con los fibroblastos nasales. Se encontró un alto contenido proteico para el SuperEBA y Sealapex. AH Plus y Endion redujeron significativamente los valores de contenido proteico (56).

La citotoxicidad del AH26 y el AH Plus fue evaluada por Cohen mediante la prueba de difusión en agar. Se utilizó un monoestrato de fibroblastos L929 y se observó su respuesta a los agentes estudiados luego de 48 horas. El grado de degeneración y malformación celular fue expresada en una escala de 0 (no reactivo) a 4 (severamente reactivo). Se concluyó luego del período de observación, que los cultivos celulares expuestos a los cementos

exhibieron una severa reactividad (grado 4) tanto con el AH26 como con AH Plus. Así mismo, se detectó liberación de formaldehído en ambos selladores aunque el fabricante de AH Plus afirma que está libre de este compuesto. La presencia de formaldehído en AH Plus se debe probablemente a la reacción de la resina epóxica con las aminas para iniciar el fraguado, sin embargo, la cantidad encontrada de formaldehído es mínima. El AH26 contiene hexametilenotetramina que en un ambiente ácido se descompone para liberar amonio y formaldehído (57).

En el año 2005 Miletic evaluó 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, mientras RoekoSeal exhibió citotóxicidad (58).

En un estudio *in vitro*, realizado por Peralta (2006) sobre de la citotoxicidad de tres selladores endodónticos (AH Plus, RoekoSeal, Roth Root) sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929 se observó el cemento RoekoSeal no mostró citotoxicidad, mientras que AH Plus y Roth Root fueron los más citotóxicos(12).

Al comparar diferentes cementos selladores (RoekoSeal, AH Plus, Endorez, Epiphany), Lodiene en el 2008 observó genotoxicidad severa y citotoxicidad del AH Plus inmediatamente después de la manipulación. El AH Plus fue el más citotóxico en periodo más largos 48 y 72 h, especialmente en concentraciones más altas. Lo que impide un análisis de genotoxicidad de estas diluciones a causa de la muerte generalizada (25).

En una revisión realizada por Desai y Chandler en el 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, se reveló leve citotoxicidad, pero su efecto antibacterial es variable. Se requieren estudios adicionales para establecer las propiedades de cementos selladores a base de hidróxido de calcio en tejido sano (59).

En Brasil, Gomes-Filho (2009), realizaron un estudio en el que se evaluó la citotoxicidad de un reciente sellador compuesto de cemento portland llamado Endo-CPM-Sealer y se llegó a la conclusión de que ningún material es considerado citotóxico en cultivos de fibroblastos (60).

En el 2010, Lioni investigó la relación entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad de cementos selladores concluyendo que todos los selladores producen cierto grado de toxicidad sobre los tejidos periapicales.

(13)

Así mismo Bin en el año 2012 estudiaron la citotoxicidad y genotoxicidad de cementos selladores, como el MTA fillapex y AH Plus. Se utilizaron fibroblastos de hámsters 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 como se observó por el a



causa del incremento en la formación de micro núcleos comparado con el grupo control (32).

Silva (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 muestra un pH neutro y significativamente menor que MTA Fillapex (61).

Con base en estos estudios es importante analizar los diferentes tipos cementos selladores tales como son Roeko Seal, AH plus, Sealapex y MTA fillapex ya que estos muestran diferentes niveles de citotoxicidad con diversos tipos de células humanas, esto nos ayudará para saber qué tipo de cemento emplear en la consulta clínica y a su vez confirmar la información que el fabricante nos proporciona en relación a la biocompatibilidad.

De igual manera Seok-Woo Chang en el 2014, compara la citotoxicidad, la respuesta inflamatoria, el efecto osteogénico, y el mecanismo de señalización de estas actividades biológicas de 4 selladores de conductos radiculares, sellador a base de hidróxido de calcio (Sealapex), sellador a base de apatita (ARS ; Dentsply Sankin, Tokio, Japón), (MTA Fillapex) y iRoot SP ( BioCreamix Inc, Vancouver, Canadá) en células del ligamento periodontal humanos. ARS, MTA Fillapex y iRoot SP induce una menor expresión de mediadores proinflamatorios que Sealapex. ARS, MTA Fillapex y iRoot SP mostraron potencial osteogénico superior en

comparación con Sealapex. Se muestran por primera vez que ARS, MTA Fillapex, y iRoot SP inducen una menor expresión de mediadores de la inflamación y mejorar la diferenciación osteoblástica de producción de células del ligamento periodontal a través de la vía de señalización mediada por la integrina en comparación con Sealapex (62).

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

Los cementos selladores empleados en endodoncia provocan inflamación y daño a los tejidos periapicales cuando salen del conducto radicular retardando la reparación o regeneración necesaria de los tejidos, ocasionando el fracaso del tratamiento odontológico.

¿Cuál de los 4 cementos selladores: Roeko Seal (Silicona), Sealapex (hidróxido de calcio), MTA Fillapex (MTA) o AH Plus (Resina) es más biocompatible sobre fibrocartilago?

## **IV. JUSTIFICACIÓN**

Nuestro grupo de investigación, ha encontrado que algunos cementos selladores causan daño a los fibroblastos del ligamento periodontal, lo cual podría desencadenar una reacción dañina que retarde la reparación o regeneración necesaria de estos tejidos periapicales, esto conlleva a un inminente fracaso del tratamiento endodóntico.

Debido a la ausencia de reportes en la literatura de pruebas de biocompatibilidad de materiales nuevos en el mercado como son MtaFillapex y RoeKoseal, así como de los mayormente utilizados como son AH Plus y Sealapex se plantea evaluar el efecto de dichos cementos selladores, sobre cultivos de fibrocartílago.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto *in vitro* de cuatro cementos selladores de conductos radiculares sobre la viabilidad de fibrocartílago

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

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

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El presente trabajo es una investigación experimental, *in vitro*, longitudinal, prospectiva.

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

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

### **6.3. CEMENTOS SELLADORES**

Los cementos selladores usados para este estudio fueron 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 número original	Cuantitativa	Discreta		Células
Tratamiento	Cemento	Cualitativa	Discreta	1.RoekoSeal 2.Sealapex 3.MTA Fillapex 4. AH Plus	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 con los laboratorios de inmunología y microbiología molecular de la en el Laboratorio de 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 fueron evaluados (10 y 40 mg/mL). Para esto los cementos, espátulas y materiales a utilizar se colocaron 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, RoekoSeal (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 (63).

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 colocó inmediatamente en la alícuota de 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 vortex (select vortexer) durante un min. Se incubaron por 10 min 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 células de fibrocartilago 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, se realizó 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 µL del medio preparado a las diferentes condiciones y controles.

### **6.6.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD**

Se usó el protocolo descrito por Key, Rahemtulla (64). 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 µL de azul tripano (0.4%), un colorante vital, y 10µL 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 µL 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 toma 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  $p < 0.05$  (65). Todos los datos se analizaron con el programa IBM SPSS v20 (IL, USA).

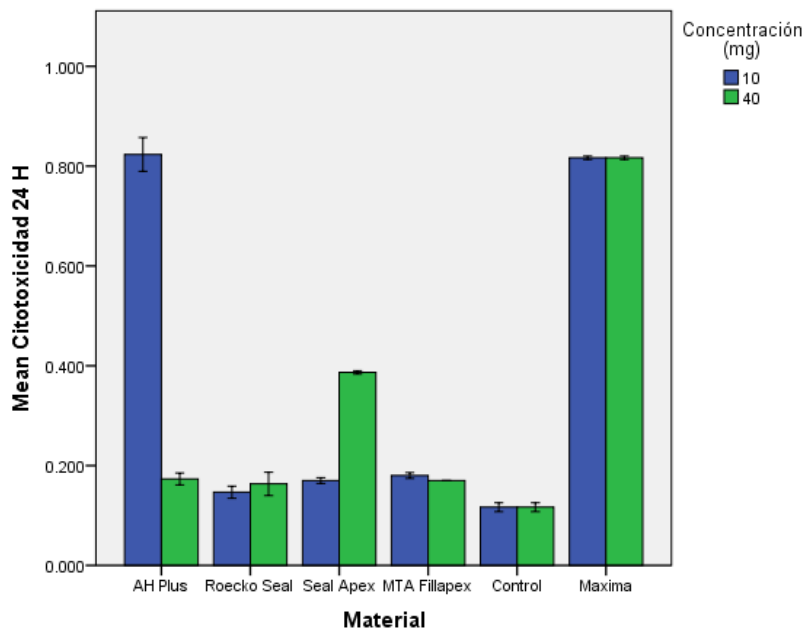
## **VII. RESULTADOS**

### **7.1. VIABILIDAD CELULAR**

El porcentaje de viabilidad observado a las 24 h. es de 90.90 % y a las 72 h, hay una disminución con un porcentaje de 85.71 % y por último a las 96 h se observó un aumento en la viabilidad en un porcentaje de 91.30 %.

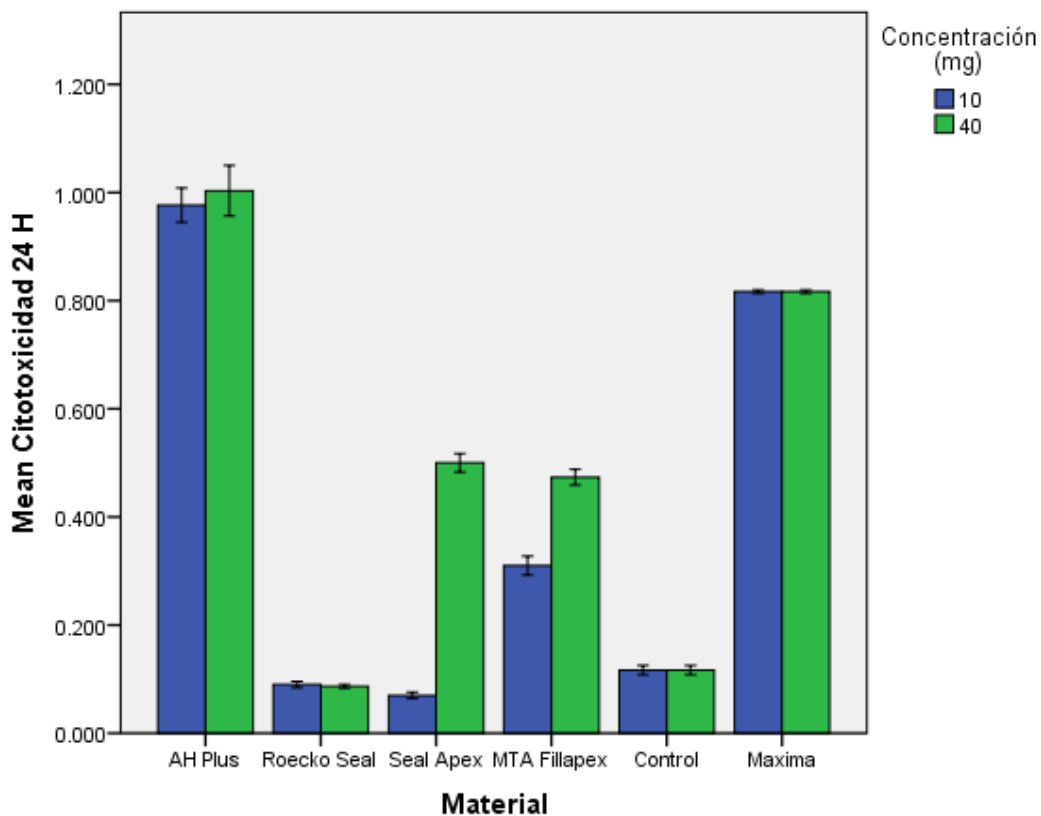
## 7.2. CITOTOXICIDAD

Las células de fibrocartílago presentaron una citotoxicidad similar al control 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 generó una citotoxicidad comparable con la del control de máximo daño celular a las 24 h de interacción  $0.823 \pm 0.034$  y  $0.817 \pm 0.003$ , respectivamente (Fig. 1). A concentraciones de 40 mg de los selladores, fue el Sealapex el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.387 \pm 0.003$ ) en comparación al control ( $0.117 \pm 0.009$ ) y los demás cementos en esta misma concentración a las 24 h de interacción.



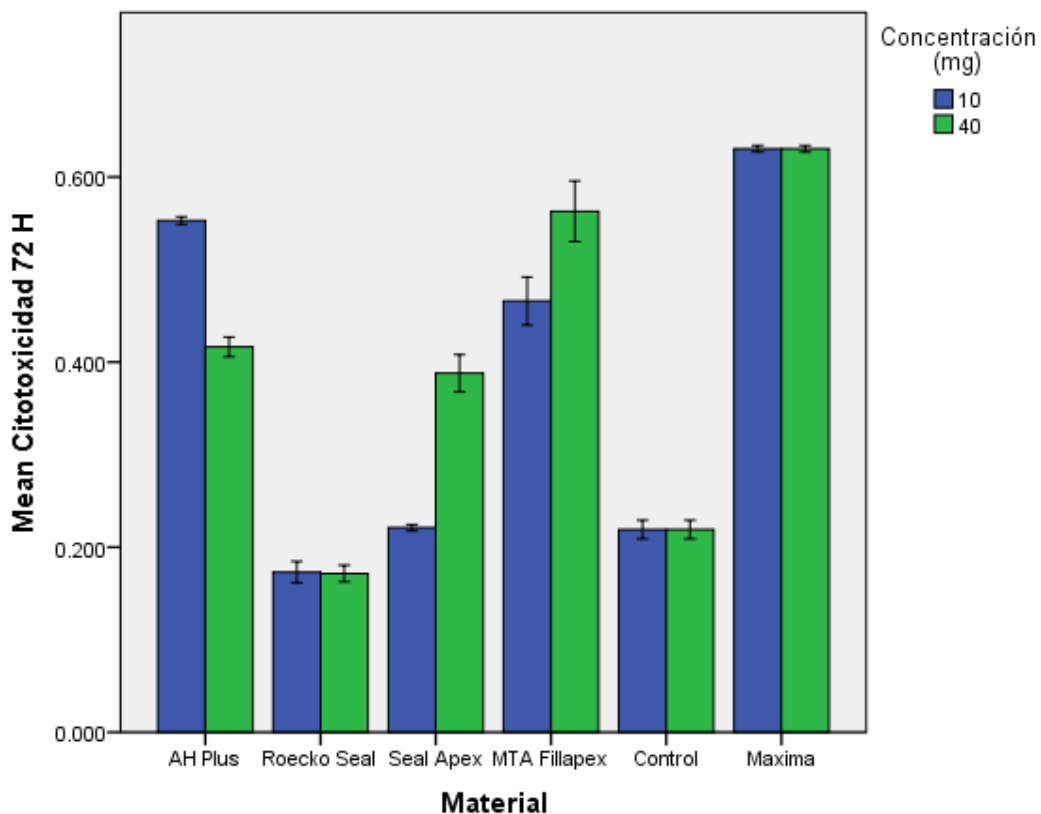
**Figura 1.** Gráfica de Citotoxicidad a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

Las células de fibrocartílago presentaron una citotoxicidad similar al control al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 m. 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  $0.977 \pm 0.032$  y  $0.817 \pm 0.003$ , respectivamente (Fig. 2). A concentraciones de 40 mg de los selladores el AH Plus mostró la más alta citotoxicidad ( $1.003 \pm 0.047$ ) en comparación al control ( $0.117 \pm 0.009$ ) y los demás cementos en esta misma concentración a las 24 h de interacción.



**Figura 2.** 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.

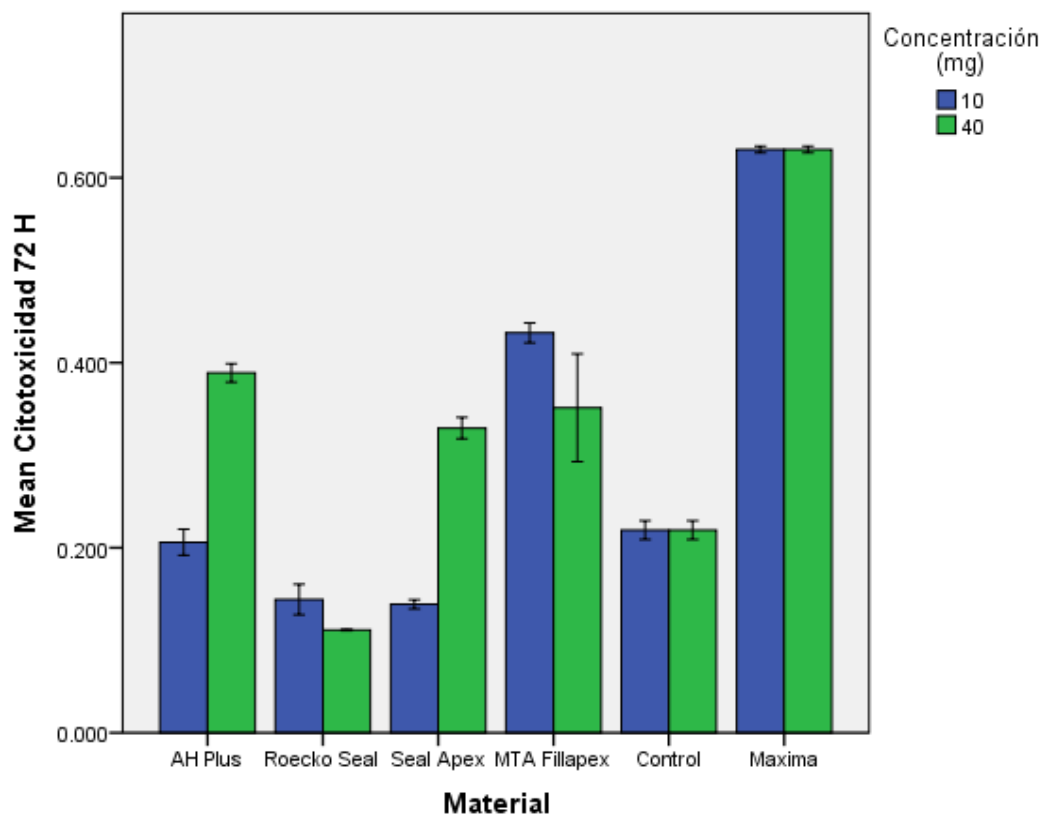
Las células de fibrocartilago presentaron una citotoxicidad similar al control al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador AH Plus que mostró una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 72 h. de interacción  $0.553 \pm 0.032$  y  $0.631 \pm 0.003$ , respectivamente (Fig. 3). A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el MTA Fillapex el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.563 \pm 0.033$ ) en comparación al control ( $0.219 \pm 0.010$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 3.** Gráfica de Citotoxicidad a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

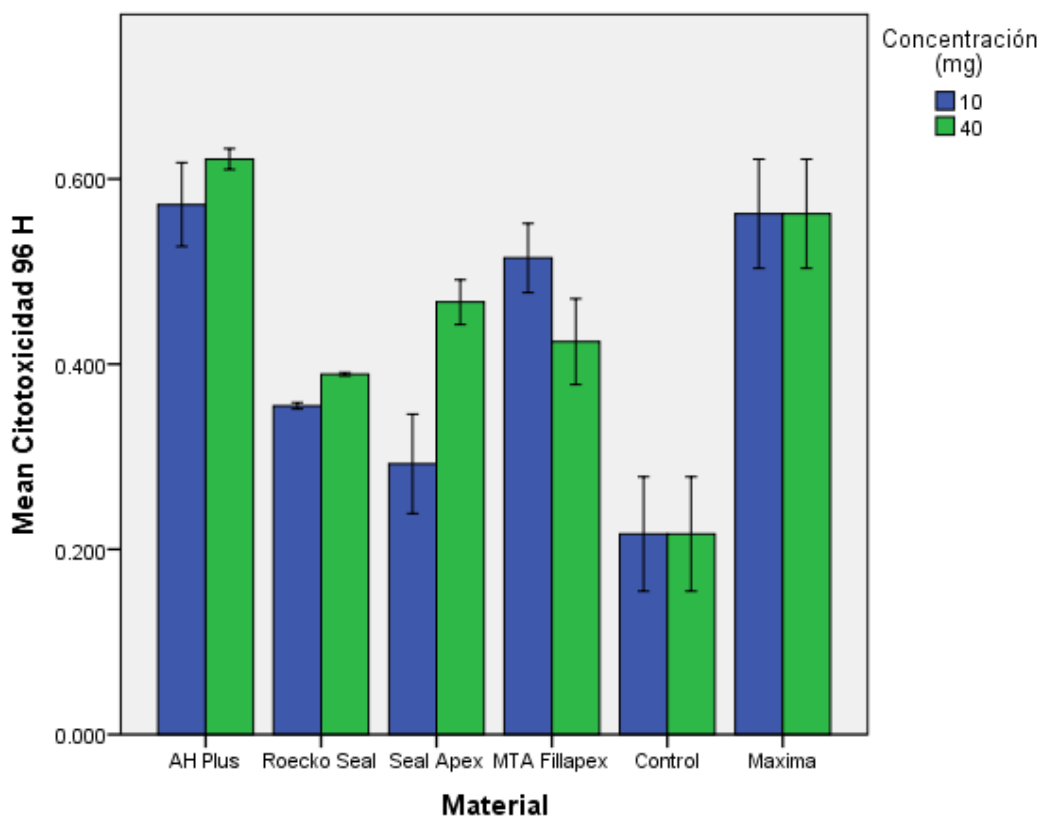


Las células de fibrocartílago presentaron una citotoxicidad similar al control al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo excepto para el sellador MTA Fillapex que presentó una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 72 h de interacción  $0.432 \pm 0.011$  y  $0.631 \pm 0.003$ , respectivamente (Fig. 4). A concentraciones de 40 mg de los selladores el AH Plus mostró la más alta citotoxicidad ( $0.389 \pm 0.010$ ) en comparación al control ( $0.219 \pm 0.010$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



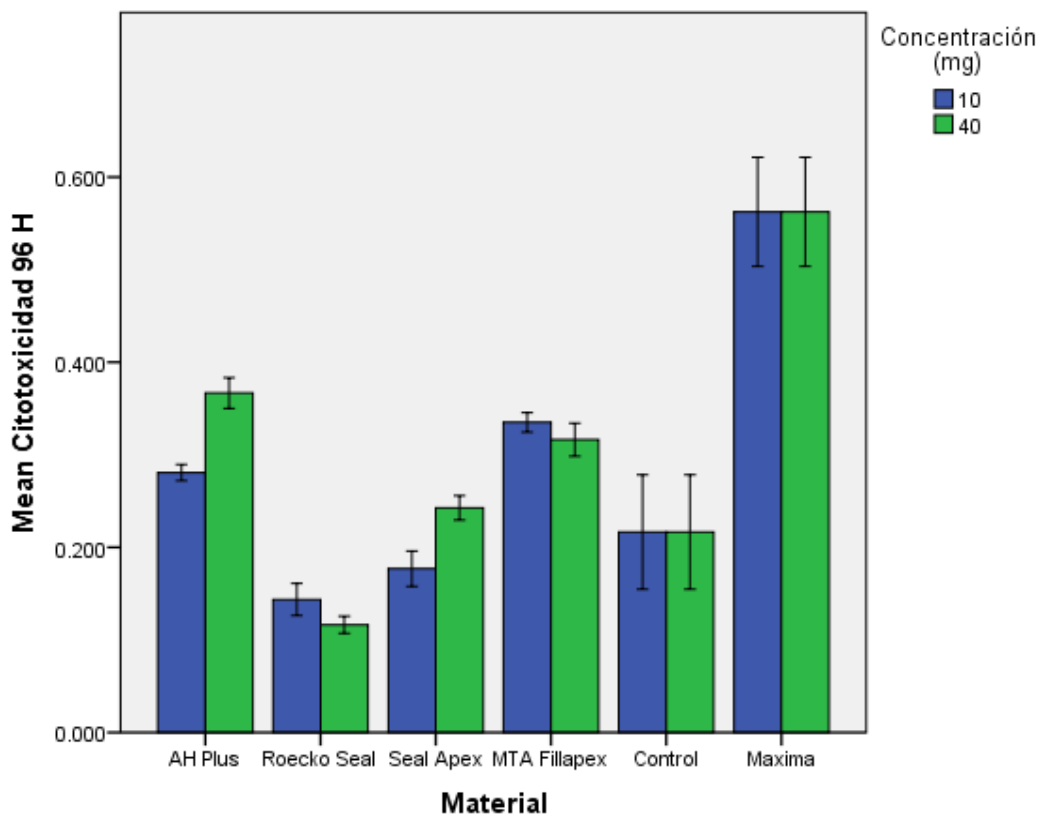
**Figura 4.** Gráfica de Citotoxicidad a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

Las células de fibrocartilago presentaron una citotoxicidad similar al control al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo, excepto el sellador AH Plus que presentó una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 96 h de interacción  $0.572 \pm 0.045$  y  $0.563 \pm 0.059$ , respectivamente (Fig. 5). A concentraciones de 40 mg de los selladores nuevamente el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.621 \pm 0.011$ ) en comparación al control ( $0.217 \pm 0.062$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 5.** 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.

Las células de fibrocartílago presentaron una citotoxicidad similar al control al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo excepto el sellador MTA Fillapex que presentó una citotoxicidad comparable con el control de máximo daño celular a las 96 h de interacción  $0.335 \pm 0.010$  y  $0.563 \pm 0.059$ , respectivamente (Fig. 6). A concentraciones de 40 mg de los selladores, fue el AH Plus el que mostró la más alta citotoxicidad ( $0.367 \pm 0.017$ ) en comparación al control ( $0.217 \pm 0.062$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.

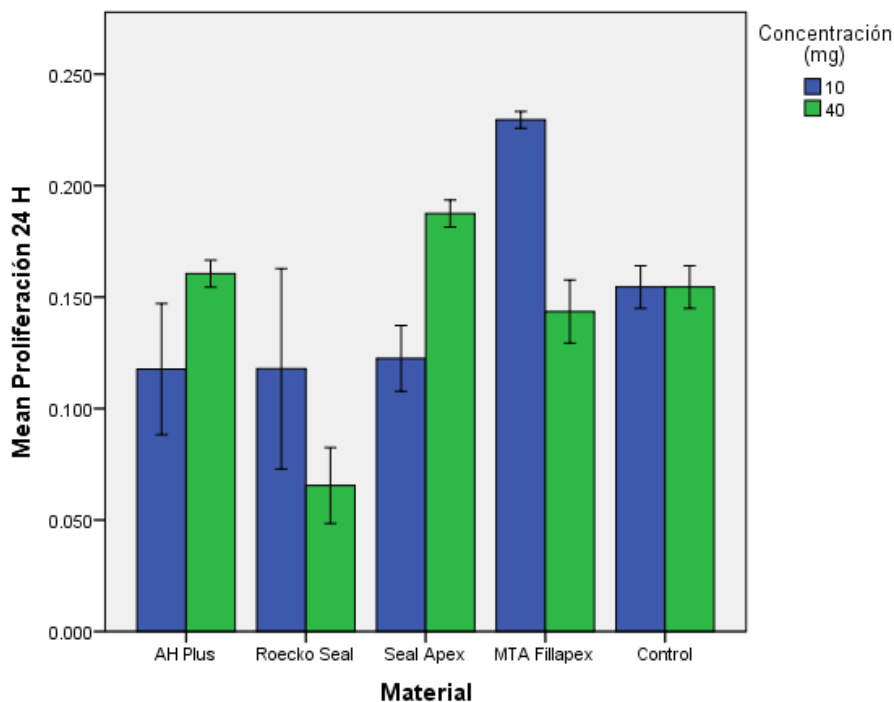


**Figura 6.** Gráfica de Citotoxicidad a las 96 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

### 7.3. PROLIFERACIÓN

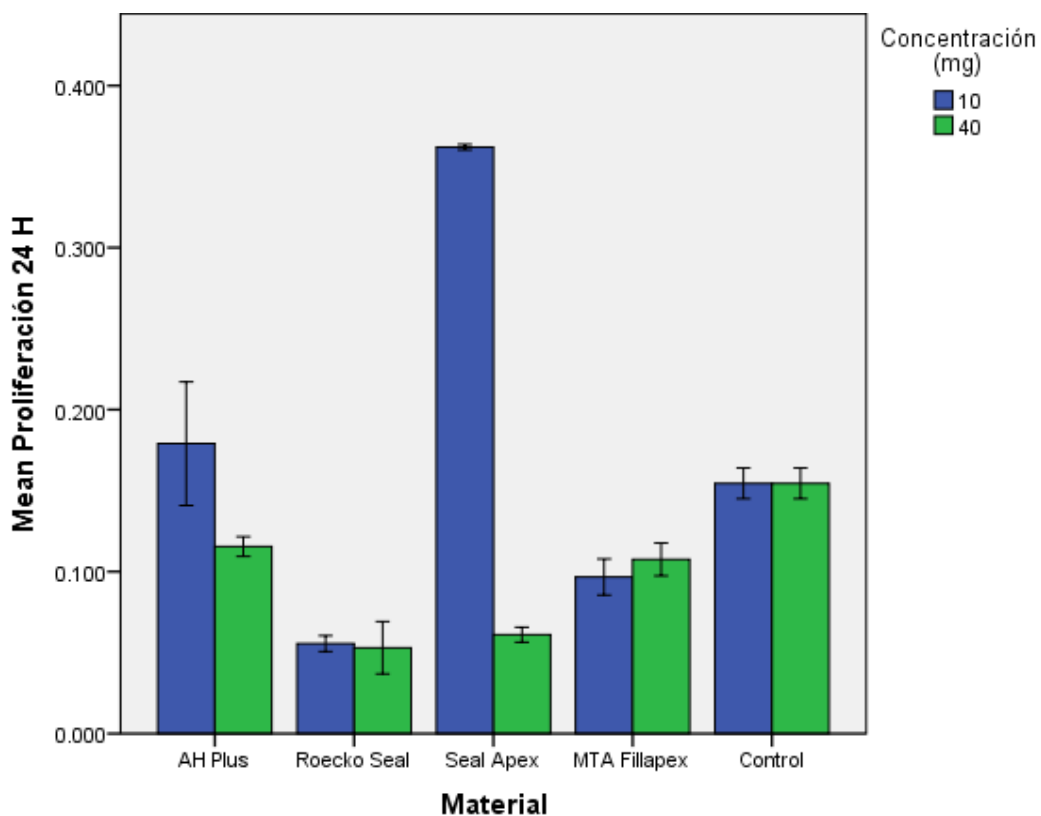
Las células de fibrocartilago presentaron una proliferación al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo siendo el sellador MTA Fillapex el que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 24 h de interacción.  $0.229 \pm 0.004$  y  $0.155 \pm 0.010$  respectivamente (Fig. 7) A concentraciones de 40 mg de los selladores el Sealapex fue el que generó la más alta proliferación ( $0.188 \pm 0.006$ ) en comparación al control ( $0.155 \pm 0.010$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.

Además en concentraciones de 40 mg del sellador RoekoSeal inhibió la proliferación ( $0.118 \pm 0.045$ ) en comparación al control ( $0.155 \pm 0.010$ )



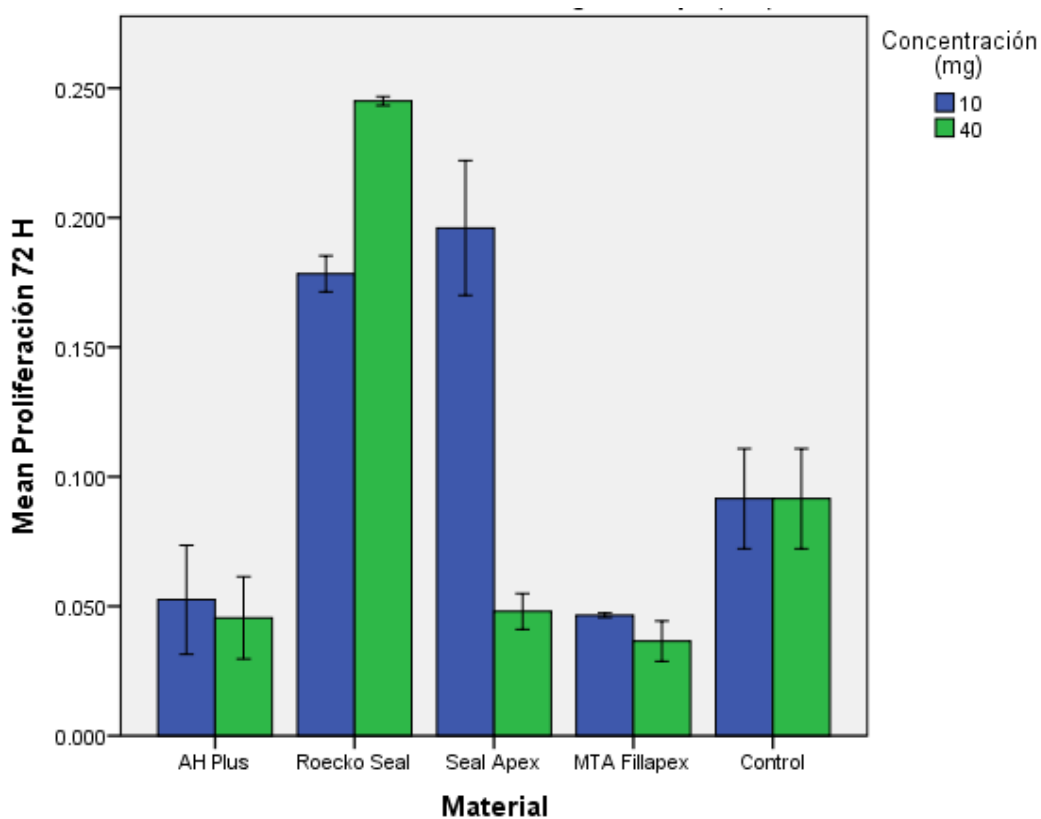
**Figura 7.** Gráfica de proliferación a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

Las células de fibrocartílago presentaron una proliferación al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo siendo para el sellador Sealapex que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 24 hrs. de interacción.  $0.362 \pm 0.002$  y  $0.155 \pm 0.010$  respectivamente (Fig. 8) A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el AH Plus fue el que genero la más alta proliferación ( $0.116 \pm 0.006$ ) en comparación al control ( $0.155 \pm 0.010$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



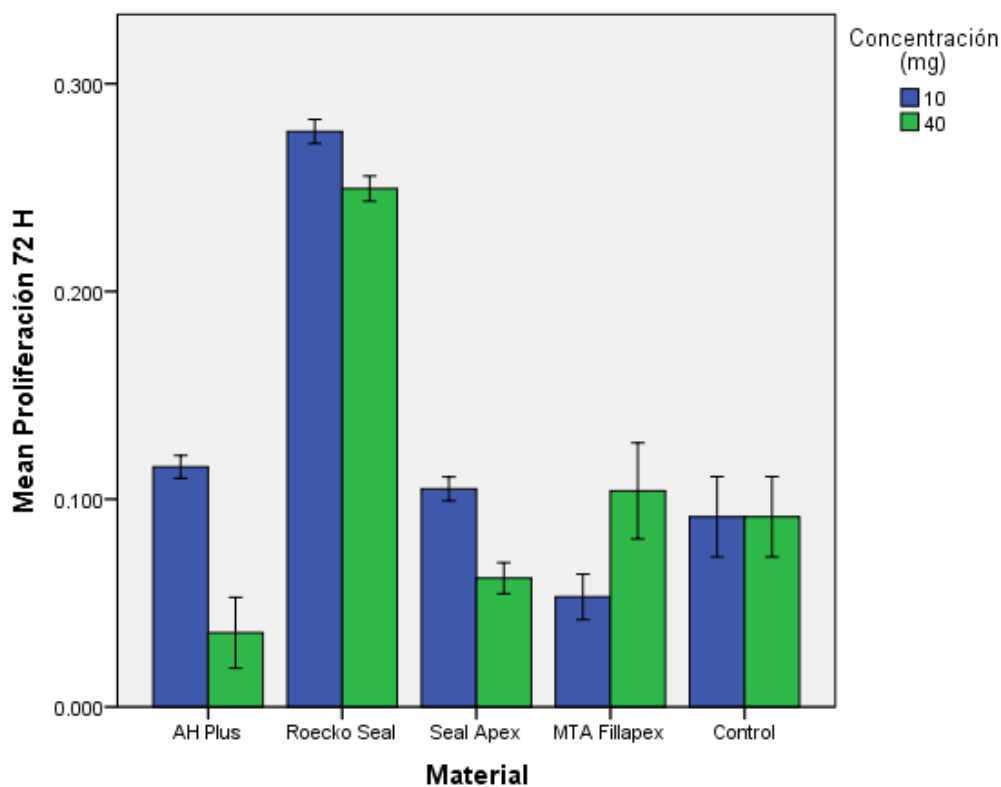
**Figura 8.** Gráfica de proliferación a las 24 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

Las células de fibrocartilago presentaron una proliferación al aplicarse 10mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo siendo para el sellador Sealapex el que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 72 h de interacción.  $0.105 \pm 0.006$  y  $0.092 \pm 0.019$  respectivamente (Fig. 9) A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el Roeko Seal fue el que generó la más alta proliferación ( $0.245 \pm 0.002$ ) en comparación al control ( $0.092 \pm 0.019$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



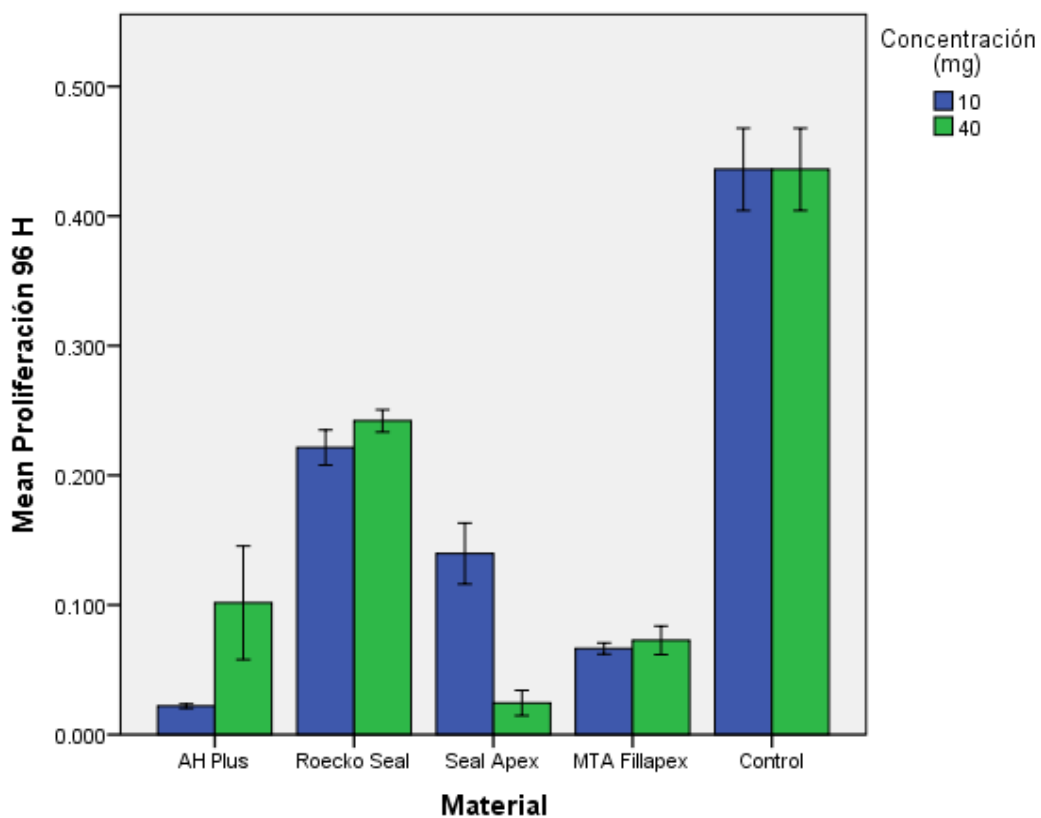
**Figura 9.** Gráfica de proliferación a las 72 h de interacción con 10 y 40 mg de los cementos selladores por 10 min de liberación. Medias  $\pm$  Error Estándar.

Las células de fibrocartilago presentaron una proliferación al aplicarse 10 mg de los cementos selladores por 480 min de liberación en el medio de cultivo siendo para el sellador Roeko Seal el que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 72 h de interacción.  $0.277 \pm 0.006$  y  $0.092 \pm 0.019$  respectivamente (Fig. 10) A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el Roeko Seal fue el que generó la más alta proliferación ( $0.250 \pm 0.006$ ) en comparación al control ( $0.092 \pm 0.019$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 10.** 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.

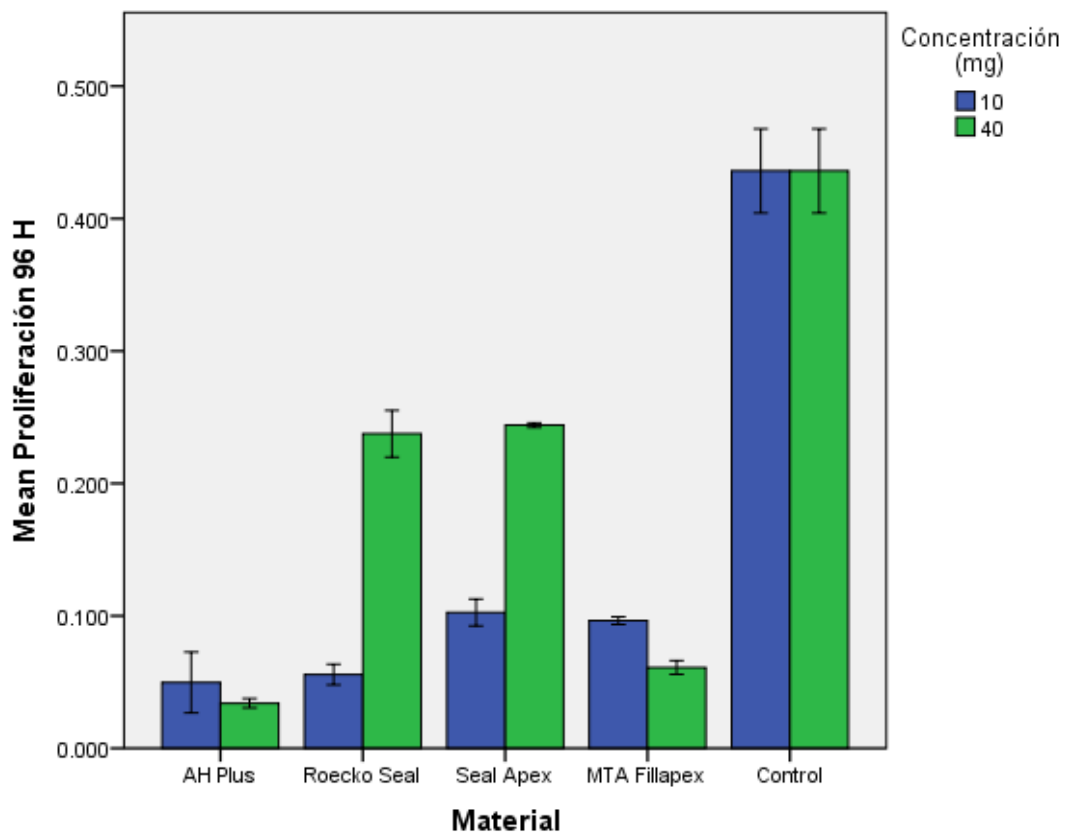
Las células de fibrocartilago presentaron una proliferación al aplicarse 10mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo siendo para el sellador Roeko Seal el que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 96 hrs. de interacción.  $0.222 \pm 0.014$  y  $0.436 \pm 0.032$  respectivamente (Fig. 11) A concentraciones de 40 mg de los selladores fue el Roeko Seal fue el que generó la más alta proliferación ( $0.242 \pm 0.009$ ) en comparación al control ( $0.436 \pm 0.032$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 11.** 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.



Las células de fibrocartilago presentaron una proliferación al aplicarse 10mg de los cementos selladores por 10 min de liberación en el medio de cultivo siendo para el sellador Sealapex el que indujo una proliferación mayor comparable con el control a las 96 hrs. de interacción.  $0.103 \pm 0.010$  y  $0.436 \pm 0.032$  respectivamente (Fig. 12) A concentraciones de 40 mg de los selladores fue Sealapex fue el que generó la más alta proliferación ( $0.244 \pm 0.002$ ) en comparación al control ( $0.436 \pm 0.032$ ) y los demás cementos en esta misma concentración.



**Figura 12.** 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

En el presente estudio fueron evaluados 4 cementos selladores *in vitro*, los materiales utilizados fueron cementos a base de hidróxido de calcio (Sealapex), resina epóxica (AH Plus), silicona (Roeko Seal), MTA (MTA Fillapex).

En nuestro estudio coincidimos con Lioni (13), ya que reporta que todos los cementos selladores producen cierto grado de toxicidad sobre los tejidos periapicales.

Existen numerosos estudios *in vitro* que reportan la citotoxicidad de materiales a base resina epoxica. Algunos investigadores como Miletic en su estudio realizado en el 2000 (55), reportaron que la citotoxicidad de estos cementos selladores puede ser causada por aminas presentes en la composición de los materiales que aceleran la polimerización y ésta puede estar relacionado con la citotoxicidad de los selladores, en concordancia con lo reportado previamente, nuestros resultados muestran que el sellador AH Plus, fue más citotóxico.

En un estudio realizado por Miletic en el 2005 (58), se evaluó la citotoxicidad de Roeko Seal y AH Plus siendo Roeko Seal el que mostró menor citotoxicidad, y AH Plus resultó con mayor citotoxicidad a las 24 y 48 hrs, coincidiendo con este estudio ya que en nuestros resultados los selladores a base de resina epoxi como AH Plus, causan una citotoxicidad mayor en comparación de los demás cementos.

Lodiene (25), observó genotoxicidad severa y citotoxicidad de AH Plus inmediatamente después de manipularlo, siendo este citotóxico en periodos más largos 48 h y 72 h especialmente en concentraciones más altas, coincidiendo con nuestro estudio ya que nuestros resultados muestran mayor citotoxicidad a las 72 h y 96 h siendo éste citotóxico en ambas concentraciones al entrar en contacto con las células.

Seok-Woo (62), comparó la citotoxicidad, la respuesta inflamatoria, el efecto osteogénico, y el mecanismo de señalización de 4 selladores de conductos radiculares, sellador a base de hidróxido de calcio (Sealapex), sellador a base de apatita (ARS ; Dentsply Sankin, Tokio, Japón), (MTA Fillapex) y iRoot SP (BioCreamix Inc, Vancouver, Canadá) en células del ligamento periodontal humanos. En el cual se mostró por primera vez que ARS, MTA Fillapex, y iRoot SP inducen una menor expresión de mediadores de la inflamación y mejorar la diferenciación osteoblástica y producción de células del ligamento periodontal a través de la vía de señalización mediada por la integrina en comparación con Sealapex, Nuestros resultados concuerdan en relación a que el cemento MTA Fillapex presenta menor citotoxicidad en comparación con el cemento Sealapex.

Gomes- Filho (33) reportaron que ningún material es considerado citotóxico con lo cual diferimos ya que nuestro estudio reportó citotoxicidad en todos los cementos selladores estudiados.

Gheshiaghi (66) evaluó la citotoxicidad de un nuevo cemento a base de resina epóxica. Sus resultados muestran que AH Plus induce una significativa citotoxicidad en las primeras fases del tratamiento, la cual

desaparece después de 4 h En nuestro estudio AH Plus presentó citotoxicidad a tiempos prolongados.

En nuestro estudio AH Plus muestra citotoxicidad a las 24 h 72 h y a las 96 h comparado con el control, por lo cual difiere con Silva (67) reportó que AH Plus exhibe citotoxicidad leve en condiciones frescas y que después de 2 semanas, se convierte en no citotóxico.

Esto difiere de lo encontrado en nuestro estudio ya que AH plus mostró citotoxicidad a las 24,72 y 96 h.

## **IX. CONCLUSIONES**

En conclusión, los resultados de este estudio mostraron que Siendo el cemento sellador a base de silicona Roeko Seal de primera elección para el tratamiento de conductos por mostrar baja citotoxicidad. AH Plus mostró ser el más citotóxico, seguido de MTA Fillapex, Sealapex.

## 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, Ørstavig 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 miitagenicity 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. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas MdSP. TEJIDOS CARTILAGINOSO Y ÓSEO La Habana. Available from: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/tejidoconjuntivoseo4.pdf>.
40. Montalvo Arenas CE. TEJIDO CARTILAGINOSO Universidad Nacional Autónoma de México 2010. Available from: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2010TEJIDO\\_CARTILAGINOSO.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2010TEJIDO_CARTILAGINOSO.pdf).

41. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *Journal of Endodontics*. 1990;16(12):589-95.
42. TROWBRIDGE HO, EMLING, R.C. Inflamação: uma revisão do processo. . 4. ed. ed. Quintessence, editor1996.
43. Shafer W HM, Levy B, Tomisch C. Cicatrización de las lesiones bucales.  
Tratado de patologia bucal. 4ta ed. mexico1986.
44. R MRC. Regeneracion celular, fibrosis y cicatrización de las heridas. 6ta ed. kumar V CR, Robbins S, editor1997.
45. Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1996;82(6):594-606.
46. Siqueira- Jr JF DC. Inflamação: aspectos biodinâmicos das respostas inflamatórias e imunológicas. . Rio de Janeiro,1996.
47. Wong MEK, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1996;82(5):475-92.
48. Ryan G MG. Inflammation the healing phase. inflammation, editor. USA Upjohn; 1977.
49. . Buenos Aires1992. diccionario ilustrado de odontologia; p. 1004-9.

50. Wound HJ. Contemporary oral and maxillofacial surgery. 3eraa ed.
51. Garther L HJ. Cartilago Y hueso. Mexico: Texto atlas de histologia; 2002.
52. Koulaouzidou EA, Papazisis K, Beltes P, Geromicholos GD, Kortsarls AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. Dental Traumatology. 1998;14(4):182-5.
53. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan E, Jr. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. Journal of Endodontics.25(11):728-30.
54. Mário Roberto Leonardo D, Léa Assed Bezerra da Silva, DDSb, Mário Tanomaru Filho, DDSc, Roberto Santana da Silva, DDSd. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 1999;88(2):221-5.
55. Miletic I, Anic I, Karlovic Z, Maršan T, Pezelj-Ribarić S, Osmak M. Cytotoxic effect of four root filling materials. Dental Traumatology. 2000;16(6):287-90.
56. Willershausen BB, B.; Schäfer, D.; Schulze, R.; . Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. J. . J Endod. 2000;26(12):703-7.
57. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An In Vitro Study of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers. Journal of Endodontics.26(4):228-9.

58. 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.
59. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide–Based Root Canal Sealers: A Review. *Journal of Endodontics*. 2009;35(4):475-80.
60. 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.
61. 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.
62. Chang S-W, Lee S-Y, Kang S-K, Kum K-Y, Kim E-C. In Vitro Biocompatibility, Inflammatory Response, and Osteogenic Potential of 4 Root Canal Sealers: Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics*. 2014;40(10):1642-8.
63. 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.
64. 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.
65. 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.

66. 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.

67. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of Cytotoxicity and Physicochemical Properties of Calcium Silicate-based Endodontic Sealer MTA Fillapex. *Journal of Endodontics*. 2013;39(2):274-7.