

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**ANÁLISIS DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE
CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS**

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

PRESENTA

CD. MARCELA ANTONIETA BOGARÍN ACKERMAN

PRESIDENTE

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODAL

DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

SINODAL

M.C. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

JUNIO DEL 2022

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**
"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 02 de junio de 2022

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS DE CITOTOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS.**

Propuesto por la C.D. MARCELA ANTONIETA BOGARIN ACKERMAN, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE



DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ
PRESIDENTE

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**
"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 02 de junio de 2022

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS DE CITOTOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS.**

Propuesto por la C.D. MARCELA ANTONIETA BOGARIN ACKERMAN, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE



DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**
"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 02 de junio de 2022

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS DE CITOTOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS.**

Propuesto por la C.D. MARCELA ANTONIETA BOGARIN ACKERMAN, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE



DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 02 de junio de 2022

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS DE CITOTOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS.**

Propuesto por la C.D. MARCELA ANTONIETA BOGARIN ACKERMAN, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE



**M.C. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ
SINODAL**

Ccp.- Archivo.

**ANÁLISIS DE CITOCOMPATIBILIDAD DE SEIS TIPOS DE CEMENTOS
SELLADORES ENDODÓNTICOS.**

PRESENTA

C.D. Marcela Antonieta Bogarín Ackerman

**PRESIDENTE
(DIRECTORA DEL PROYECTO)**

Dra. Ana Gabriela Carrillo Varguéz

**SINODALES
(CO-DIRECTORES DEL PROYECTO)**

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Dr. Luis Jesús Villareal Gómez

Dr. Luis Hernán Carrillo Varguéz

Tijuana, Baja California, 8 de Junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis docentes: Dra. Ana Gabriela Carrillo Varguéz por sus enseñanzas, su amplia paciencia, por responder a todas mis dudas, por apoyarme, por cuidarnos a mi y a todos los que decidimos hacer un posgrado en medio de una pandemia, por empujarnos a mantenernos actualizados y sobre todo por transmitirnos la pasión, dedicación y amor a la endodoncia para siempre realizar la mejor práctica posible a nuestros pacientes.

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez por siempre incitarnos a aspirar a la perfección, por ser un ejemplo a seguir tanto profesional y como persona, por su atención meticulosa a todos los detalles, por apoyarme con células de fibroblastos L929 que sin ellas esta tesis no hubiese sido posible.

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez por su guía durante el proceso de metodología de este proyecto, por su tiempo, su dedicación, por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio de biología celular, por su paciencia, sus enseñanzas y sobre todo por no darse por vencido y ayudarme a cumplir con el objetivo de esta tesis.

M.C. Luis Hernán Carrillo Várguez por apoyarme en la elección de tema de tesis, por sus consejos, por incitarme a seguir estudiando, a tener resiliencia, y a ayudarnos a cumplir nuestras metas.

También agradezco a mis dos más grandes maestros, mis padres. A mi padre el Dr. Marco Antonio Bogarin Varela por todas sus enseñanzas tanto profesionales como lecciones de vida, por presionarme a ser mejor, por impulsarme a cumplir mis metas, por apoyarme con todo lo que necesite tanto económicamente como moralmente, ya que gracias a él soy la profesionalista que soy hoy. A mi madre Cecilia Ackerman García por su cariño, su amor, sus ánimos, su paciencia y su sensibilidad, ya que gracias a ella soy la persona que soy ahora.

A mis hermanas y hermano por su incondicional apoyo y amor.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigas por creer en mí, por escucharme y por apoyarme en momentos de estrés.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada, No. CVU: 1082702.

Agradezco a las instalaciones de UABC por permitirnos realizar este posgrado a pesar de las dificultades que se presentaron mundialmente por la pandemia de Covid-19, por adaptar las instalaciones a la nueva normalidad y hacernos sentir seguros.

Al Laboratorio de Biología Celular de UABC campus Valle de Palmas por todo su equipo y material que nos permitió lograr realizar la metodología.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	iii
CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. PRINCIPIOS DE ENDODONCIA.....	2
Figura 1. Obturación de conducto.....	3
2.2. CEMENTOS SELLADORES	3
Figura 2. Conducto lateral.....	4
<i>2.2.1. Tipos de cementos selladores.....</i>	<i>5</i>
Figura 3. Sellador AH Plus	7
Figura 4. Sealapex.....	8
Figura 5. Silicato de Calcio.....	9
Figura 6. Endosequence.....	10
<i>2.2.2. Características de citotoxicidad.....</i>	<i>11</i>
2.3. LIGAMENTO PERIODONTAL.....	12
Figura 7. Ligamento periodontal.....	13
<i>2.3.1. Fibroblastos.....</i>	<i>15</i>
Figura 8. Fibroblasto.....	15
2.3.2 ESTUDIO MTT.....	16
V. HIPÓTESIS	19

5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	19
5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)	19
5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)	19
VI. OBJETIVOS	20
6.1. OBJETIVO GENERAL	20
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
VII. VARIABLES	21
7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	21
7.2. VARIABLES DEPENDIENTES	21
7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1. TIPO DE ESTUDIO	22
8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO	22
8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL	22
8.4. METODOLOGÍA	23
<i>8.4.1. Preparación de las muestras</i>	23
Figura 9 Preparación de muestras.	23
Figura 10 Tubos Falcon con lixiviados	24
<i>8.4.2 Cultivo celular</i>	24
Figura 11 Medio con fibroblastos	25
<i>8.4.3 Metodología para los ensayos de viabilidad celular MTT</i>	26
Figura 12 Placa de Neubauer	27
Figura 13 Fibroblastos 100% confluencia	27
8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
IX. RESULTADOS	29

Figura 14. Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal a los tiempos de 24 h, 48 h y 72 h.....	30
Figura 15 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 24 h	31
Figura 16 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 48 h	32
Figura 17 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 72 h.	33
Figura 18 Tabla de resultados.....	33
X. DISCUSIÓN	34
XI. CONCLUSIONES	37
XII. RECOMENDACIONES	38
XIII. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obturación de conducto3

Figura 2. Conducto lateral4

Figura 3. Sellador AH Plus7

Figura 4. Sealapex8

Figura 5. Silicato de Calcio9

Figura 6. Endosequence10

Figura 7. Ligamento periodontal.....13

Figura 8. Fibroblasto.....15

Figura 9 Preparación de muestras.23

Figura 10 Tubos falcon con lixiviados24

Figura 11 Medio con fibroblastos25

Figura 12 Placa de neubauer27

Figura 13 Fibroblastos 100% confluencia27

Figura 14. Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal a los tiempos de 24 h, 48 h y 72 h.....30

Figura 15 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 24 h31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 16 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 48 h	32
Figura 17 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 72 h.	33
Figura 18 Tabla de resultados	33

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1:.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Asociación americana de endodoncia
CAH	Hidrato de aluminio de calcio
CSH	Hidrato de silicato de calcio
CO₂	Dióxido de carbono
Ca (OH)₂	Hidróxido de calcio
CBCT	Tomografía computarizada de haz cónico
CSBS	Cemento sellador a base de silicato de calcio
PBS	Solución salina taponada con fosfato
h	Horas
nm	Nanómetros
°C	Grados Centígrados
DMEM	Dulbecco's Modified Tagle Médium, Gibco
SBF	Solución búfer fosfatos

LISTA DE ABREVIATURAS

mL	Mililitros
Ensayo MTT	Ensayo que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
µL	Microlitros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
ZOE	Óxido de zinc y eugenol

I. RESUMEN

Introducción: Para el éxito de un tratamiento endodóntico se debe lograr la limpieza, desinfección y el modelado a fondo del conducto radicular seguido de su obturación hermética. El material de obturación consiste principalmente en gutapercha y un cemento sellador para rellenar los huecos y espacios entre el material principal y las paredes del conducto radicular.

Objetivo: Evaluar la citocompatibilidad de seis diferentes cementos selladores y compararlos en la línea celular de fibroblastos de ratón L929 ATTC-CCL-1.

Metodología: Se prepararon seis muestras de cada cemento sellador Ceraseal (META biomed), BC sealer (Endosequence Brasselier), Bioroot RCS (Septodont), Sealapex (Dentsply sirona), AH plus (Kerr) y Tubli-Seal (Kerr). Posteriormente se realizó el experimento de citotoxicidad por el ensayo MTT, que se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular sobre la línea celular de fibroblastos L929 ATTC-CCL-1.

Resultados: Los cementos selladores biocerámicos presentaron mayor biocompatibilidad con la línea celular siendo Endosequence BC sealer el mas compatible 98%, seguido por Ceraseal 92% y después BioRoot 86%. El cemento sellador provocó una mayor disminución en el crecimiento celular fue Sealapex 49%, seguido de Tubli-Seal 57% y este por AH plus con 68% por lo tanto es Sealapex el considerado más citotóxico, aun siendo que a las 24 horas se mostro muy compatible.

Conclusiones: Los cementos de naturaleza biocerámica han comprobado ser los más citocompatibles por ende estos cementos se deben introducir a la práctica clínica endodóntica.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. PRINCIPIOS DE ENDODONCIA

La endodoncia es la parte de la odontología que se ocupa de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares, así como de su correspondiente tratamiento (1).

Asimismo la asociación americana de endodoncia (AAE) define al tratamiento del conducto radicular como el tratamiento diseñado para eliminar las bacterias del conducto radicular infectado, prevenir la reinfección del diente y salvar el diente natural. Cuando uno se somete a un tratamiento de conducto, la pulpa inflamada o infectada se extrae y el interior del diente se limpia y desinfecta cuidadosamente, posteriormente se obtura y se sella (2).

La clave para lograr un tratamiento endodóntico exitoso a largo plazo es la limpieza y el modelado a fondo del conducto radicular seguido de su obturación hermética a las bacterias. El material de obturación consiste principalmente en gutapercha debido a sus propiedades mecánicas, físicas y biológicas y su capacidad para rellenar las irregularidades del conducto cuando se compacta. Aún así resulta absolutamente necesario utilizar un sellador para rellenar los huecos y espacios entre el material principal y las paredes del conducto radicular (Figura 1). Sin un sellador, los métodos de obturación del conducto radicular en frío y en caliente dan como resultado que los empastes del conducto radicular muestren una mayor filtración (3).

El propósito del tratamiento del conducto radicular es eliminar la infección y obturar completamente el espacio del conducto radicular. Los materiales más utilizados son la gutapercha y el sellador. Un requisito importante para los selladores de conductos radiculares es la compatibilidad biológica, porque permanecen en estrecho contacto con los tejidos periapicales vivos durante un largo período de tiempo. Todos los materiales usados tienen ingredientes potencialmente tóxicos y pueden interferir con el proceso de curación o pueden causar reacciones alérgicas (4).

II. INTRODUCCIÓN

La elección de la línea celular para los ensayos de detección de citotoxicidad in vitro sigue siendo controvertida, ya que la citotoxicidad aparente de un material puede verse significativamente afectada por la línea celular seleccionada para la prueba. Los usos de la información de citotoxicidad dependen del grado de capacidad del ensayo de cultivo celular para simular las respuestas de las poblaciones de células orales. El uso de líneas celulares permanentes, como los fibroblastos de ratón transformado (clon L-929), proporciona una buena reproducibilidad para el cribado de citotoxicidad in vitro (4).

Por lo tanto en este estudio se pretende evaluar la citotoxicidad de los cementos selladores mas utilizados hoy en día a través de un ensayo utilizado para evaluar la viabilidad celular (5).

Este estudio se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (ensayo MTT) y se realizará sobre la línea celular L-929.

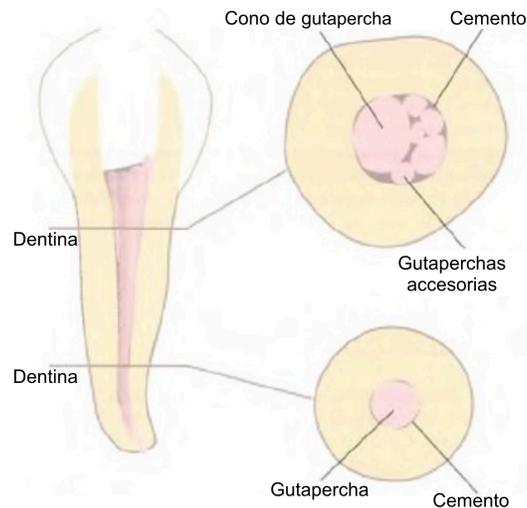


Figura 1. Obturación de conducto.

En la figura se observa la obturación de conductos en un corte sagital y transversal, mostrando la importancia del sellado de cemento y gutapercha (1).

2.2. CEMENTOS SELLADORES

II. INTRODUCCIÓN

Los cementos del conducto radicular son necesarios para sellar el espacio entre la pared dentinaria y la interfaz del núcleo obturador. Los selladores también llenan los huecos e irregularidades en el conducto radicular, los conductos laterales y accesorios (Figura 2), y los espacios entre los puntos de gutapercha utilizados en la condensación lateral. Los selladores también sirven como lubricantes durante el proceso de obturación. Grossman describió las propiedades de un sellador ideal indicando que un cemento ideal debe de: ser pegajoso durante la mezcla, para proporcionar buena adherencia con la pared del conducto una vez fraguado, proporcionar un sellado hermético, ser radiopaco, para poder verlo en las radiografías, ser polvo muy fino, para poder mezclarlo fácilmente con el líquido, no contraerse al fraguar, no teñir la estructura dental, ser bacteriostático, o por lo menos no favorecer la proliferación bacteriana, fraguarse lentamente, ser insoluble en los fluidos tisulares, ser tolerado por los tejidos; es decir, no producir irritación del tejido perirradicular y ser soluble en un disolvente común, si se precisa eliminar la obturación del conducto radicular (1).



Figura 2. Conducto lateral

Figura que muestra la imagen obtenida de un estudio CBCT mostrando una obturación en la que el sellado del cemento obtura el conducto lateral (6).

En la actualidad, ningún sellador satisface todos los criterios. Los selladores deben ser biocompatibles y bien tolerados por los tejidos perirradiculares. Todos los selladores exhiben toxicidad cuando están recién mezclados; sin embargo, su toxicidad se reduce

en gran medida al fraguar. Los selladores son reabsorbibles cuando se exponen a tejidos y fluidos tisulares. La curación y reparación de tejidos generalmente no parecen verse afectadas por la mayoría de los selladores, siempre que no haya productos de degradación adversos del sellador con el tiempo (1).

Sin embargo, se ha informado la incidencia de huecos en la obturación del conducto radicular independientemente de la técnica; esto puede resultar en la proliferación de bacterias residuales y comprometer el resultado a largo plazo del tratamiento del conducto radicular (7).

Los productos de degradación de los selladores pueden tener un efecto adverso sobre la capacidad proliferativa de las poblaciones de células perirradiculares. Como resultado, los selladores no deben colocarse de forma rutinaria en los tejidos perirradiculares como parte de una técnica de obturación. Aunque se ha observado una respuesta osteogénica con los selladores de conductos radiculares a base de hidróxido de calcio, se ha cuestionado la capacidad de estos selladores para mantener un pH alto a lo largo del tiempo (1).

2.2.1. Tipos de cementos selladores

Los selladores más populares son las formulaciones de óxido de zinc-eugenol, selladores de hidróxido de calcio, selladores de ionómero de vidrio, selladores a base de resina (resina epoxi o resina de metacrilato) y los selladores a base de silicato de calcio de reciente introducción. Independientemente del sellador seleccionado, todos exhiben toxicidad hasta que se han asentado. Por esta razón, se debe evitar la extrusión de selladores en los tejidos perirradiculares (1).

Para esta tesis analizaremos los cementos a base de resina (AH Plus de Dentsply), cementos a base de hidróxido de calcio (Sealapex de Sybronendo), cementos a base de óxido de zinc-eugenol (Tubli-Seal de Kerr) y cementos a base de silicato tricalcico (Ceraseal de META Biomed, Bioroot RCS de Septodont y Endosequence BC Sealer de Brasseler).

2.2.1.1. AH plus

AH Plus es un sistema a base de resina epoxi-amina que viene en dos tubos (Figura 3). El tubo de pasta A de epóxido contiene un diepóxido (bisfenol A diglicidil éter) y materiales de relleno como ingredientes principales, mientras que el tubo de pasta B de amina contiene una monoamina primaria, una diamina secundaria, aceite de silicona y materiales de relleno como ingredientes principales. Presenta un tiempo de trabajo de aproximadamente 4 horas (8).

Su radiopacidad y su adhesividad son muy satisfactorias. Posee un alto corrimiento, lo que exige un conducto con buen tope apical (8).

En un estudio por Meletic y colaboradores AH Plus mostró un fuerte efecto citotóxico en la línea celular L929 inmediatamente después de la mezcla y después de períodos de fraguado de 24 y 48 h. Después de 7 y 30 días de incubación, no se observó destrucción dentro de las poblaciones celulares después de la aplicación directa de AH Plus. Según el fabricante, AH Plus es una fórmula mejorada de AH 26 y el material ya no libera formaldehído, que podría estar relacionado con la citotoxicidad. Sin embargo, las aminas, que aceleran la polimerización en la composición de AH Plus, podrían ser la razón de una fuerte toxicidad inicial (4).

A pesar del obvio defecto de destrucción celular del sellador AH Plus, este producto se usa comúnmente en la práctica clínica. Los estudios experimentales en animales que han examinado el efecto de la exposición de tejidos vitales, informaron una destrucción celular más limitada, seguida de una actividad de reparación de tejidos. La incapacidad de replicar los factores de obturación del conducto con el ensayo de cultivo celular es probablemente una de las principales razones por las que las evaluaciones de biocompatibilidad del tejido oral in vitro no han coincidido con las pruebas en animales in vivo (4).

La actividad inflamatoria junto con el suministro de sangre intacto en el proceso de reparación de tejidos podría eliminar la toxicidad inicial del material. Es importante señalar que un material que es peligroso in vitro puede no ser necesariamente tóxico in

II. INTRODUCCIÓN

vivo. Por lo tanto, para obtener una evaluación de riesgo precisa, el modelo de prueba in vitro debe reflejar la situación clínica lo más fielmente posible (4).



Figura 3. Sellador AH Plus

Figura que muestra presentación de cemento resinoso AH Plus, para este sellador se deben mezclar 2 pastas con misma proporción para tener la consistencia deseada (8).

2.2.1.2. Sealapex

Los componentes activos son: óxido de calcio, y resinas de trimetilolpropano, silicilato de neopentilglicol y salicilato de isobutilo. Para prepararlo se usan porciones iguales de la base y el catalizador (Figura 4). Es un sellador con tiempo de trabajo y de endurecimiento muy prolongados (8).

Su plasticidad, corrimiento y radiopacidad son adecuados. Posee alta solubilidad, que lo torna un sellador de poca estabilidad. Esa solubilidad es la que le permite liberar el hidróxido de calcio en el medio en que se encuentra (8).

Según Chang y colaboradores los selladores a base de hidróxido de calcio pueden promover la formación de tejido duro y disminuir la osteoclastogénesis, pero tienden a disolverse con el tiempo y, por lo tanto, pueden comprometer el sello endodóntico (9).



Figura 4. Sealapex

Figura que muestra la presentación de cemento Sealapex a base de hidróxido de calcio (8).

2.2.1.3. Ceraseal

Sellador de conductos radiculares biocerámico a base de silicato de calcio. Sus beneficios son que es antimicrobiano, biocompatible, buena capacidad de sellado y estable. Aún con su pH alto (12.73), se ha comprobado que tiene una alta biocompatibilidad (10).

Desde la primera formulación clínicamente aprobada de agregado de trióxido mineral (MTA), se han desarrollado varios productos para su uso en procedimientos clínicos, incluidos los selladores de endodoncia. Se han propuesto nuevas formulaciones y aditivos para mejorar problemas como el tiempo de trabajo, el costo y las dificultades de manipulación. Estos nuevos selladores, denominados selladores a base de silicato de calcio (CSBS), también facilitan la biomineralización, el proceso mediante el cual un organismo vivo sintetiza una sustancia mineral (Figura 5). Un desafío importante al que se enfrenta la endodoncia en la actualidad es precisamente la correcta formación del tejido mineral duro (11).

Para conseguirlo, es fundamental que los materiales utilizados en los tratamientos de endodoncia sean bioactivos. La bioactividad implica la síntesis de depósitos de fosfato de calcio en la superficie del material colocados en un fluido corporal imitador, por ejemplo, una solución tampón con una concentración de iones similar a los valores encontrados en el plasma sanguíneo humano (11).

II. INTRODUCCIÓN

Las modificaciones de la composición podrían alterar las características biológicas y fisicoquímicas de CSBS y finalmente su bioactividad. Para predecir y dilucidar los comportamientos clínicos potenciales de dichos materiales, su biocompatibilidad y citocompatibilidad generalmente se prueban tanto en modelos in vivo como in vitro. Como se supone que los materiales bioactivos interactúan directamente con la pulpa y / o las células periapicales, o mediante la difusión de componentes dentro del tejido perirradicular vivo, es fundamental evaluar su biocompatibilidad para determinar su influencia potencial en las respuestas reparadoras / regenerativas. (11).

Ceraseal (Meta Biomed Co., Cheongju, Corea) es un sellador endodóntico premezclado recientemente lanzado que contiene silicatos de calcio, óxido de circonio y agente espesante. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado estudios que utilicen este nuevo sellador endodóntico (11).

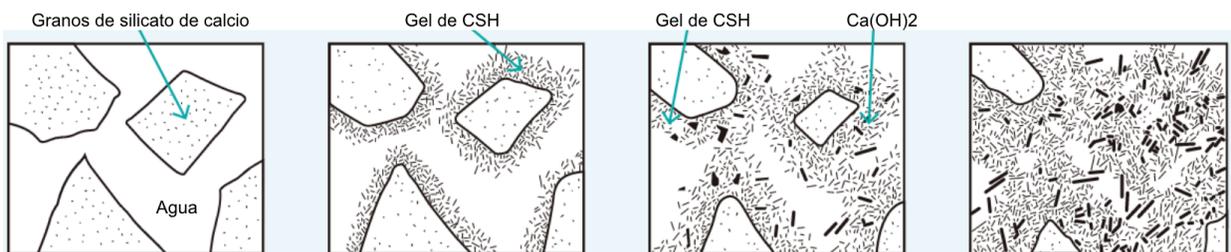


Figura 5. Silicato de Calcio

Figura que muestra la secuencia de el silicato de calcio cuando produce el gel CAH (hidrato de aluminato de calcio) y el gel CSH (hidrato de silicato de calcio) al absorber la humedad de los tejidos circundantes en el conducto radicular y algo de cristalización de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) (1).

2.2.1.4. Endosequence

Recientemente se introdujo en endodoncia un sellador de conductos radiculares a base de biocerámica (EndoSequence BC Sealer) como un sellador de conductos radiculares alternativo que promete características biológicas y fisicoquímicas superiores. Se ha demostrado que el sellador EndoSequence BC Sealer tiene una mejor biocompatibilidad con significativamente menos citotoxicidad y genotoxicidad en

II. INTRODUCCIÓN

comparación con otros selladores endodónticos. Debido a su naturaleza bioactiva, EndoSequence BC Sealer puede exhibir un efecto positivo sobre la deposición de tejido duro al formar hidroxiapatita. Además, es radiopaco, fácil de manipular, hidrófilo, se expande después del fraguado, insoluble y posee propiedades antimicrobianas (12).

Según López-García y colaboradores EndoSequence BC Sealer (BC; Brasseler EE. UU., Savannah, GA, EE. UU.) es un nuevo cemento sellador a base de silicato de calcio (CSBS) inyectable premezclado, cuyos componentes principales incluyen silicatos tricálcicos, silicatos dicálcicos, hidróxido de calcio, óxido de circonio y agentes espesantes (Figura 6). Como sellador, posee una buena biocompatibilidad y actividades antimicrobianas, es fácil de manejar y tiene la capacidad de promover la diferenciación osteoblástica de las células del ligamento periodontal, aunque nuestro conocimiento de este sellador aún es limitado (11).

Se ha demostrado que este sellador eliminó todas las bacterias dentro de los dos minutos posteriores al contacto. Su potente efecto antibacteriano podría deberse a una combinación de su alto pH, naturaleza hidrofílica y difusión activa del hidróxido de calcio. El endurecimiento del sellado ocurre en un lapso de tres o cuatro horas, lo que le da al manipulador tiempo suficiente para usarlo en aplicaciones quirúrgicas y no quirúrgicas (13).

De acuerdo a Carrillo-Vázquez y colaboradores, el uso de BC Sealer proporciona una efectiva adhesión a los conductos radiculares (14).



Figura 6. Endosequence

Figura que muestra la presentación del cemento sellador biocerámico Endosequence BC Sealer (1).

2.2.1.5 Bioroot RCS

Recientemente introducido en la práctica clínica BioRoot RCS (BRCS; Septodont, Saint-Maurdes-Fosses, Francia) es un sellador a base de silicato tricálcico. Se demostró que la citocompatibilidad de BRCS es mejor que la de otros selladores a base de silicato de calcio cuando se probó en células madre del ligamento periodontal (15).

El sellador es significativamente menos citotóxico que MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil), un sellador de conductos radiculares de resina de salicilato a base de agregados de trióxido mineral, y SimpliSeal (Kerr Dental, Orange, CA), un sellador de resina a base de epoxi. Curiosamente, BRCS no modificó la proliferación de células madre de la pulpa dental y presentó una citotoxicidad muy limitada y ninguna genotoxicidad. Además, indujo una respuesta celular positiva, con biomineralización por contacto directo. Su presentación es de 1 x 15 g polvo en frasco, 35 x envases unidos (16).

2.2.1.6 Tubli-Seal

Los cementos selladores de óxido de cinc-eugenol (ZOE) se han usado con éxito durante mucho tiempo. Estos cementos selladores experimentan reabsorción si pasan a los tejidos perirradiculares. Tienen un tiempo de fraguado largo, se contraen al fraguar, se pueden disolver y pueden teñir la estructura dental (17).

Tubli seal es un cemento sellador de óxido de cinc-eugenol con un catalizador, que se mezcla sin dificultad, pero que tiene un tiempo de fraguado más corto que los cementos selladores en forma de polvo/liquido (18).

2.2.2. Características de citotoxicidad

La citotoxicidad se define como la capacidad de un material para impactar en la viabilidad celular. Por lo tanto, las pruebas de citotoxicidad son pruebas primarias de biocompatibilidad que determinan la lisis de las células, la inhibición del crecimiento celular y otros efectos sobre las células causados por las sustancias de prueba. Varios de estos métodos de prueba se han combinado para establecer normas (normas ISO).

El objetivo es mejorar la comparabilidad de los datos generados en diferentes laboratorios de prueba, así como ahorrar costos y probar animales al evitar la duplicación de pruebas (15).

Los selladores de conductos radiculares ideales deben ser biocompatibles y bien tolerados por los tejidos perirradiculares; sin embargo, todos los selladores recién mezclados exhiben un grado de toxicidad que debe reducirse considerablemente al fraguar. Aunque la aplicación de selladores endodónticos está destinada a confinarse dentro del sistema del conducto radicular, con frecuencia se extruyen a través de la constricción apical durante los procedimientos de obturación. Cuando los selladores están en contacto íntimo con los tejidos periapicales durante períodos prolongados de tiempo, sus productos de degradación pueden obstaculizar la curación periapical inhibiendo la capacidad proliferativa de la población de células periapicales y, en particular, de los osteoclastos. Afortunadamente, algunos de los selladores más comunes en el mercado no parecen causar mutagenicidad en fibroblastos gingivales humanos (19).

La citotoxicidad de diferentes selladores ha sido evaluada previamente. Sin embargo, hay poca información disponible sobre la biocompatibilidad de EndoSequence BC Sealer, BioRoot RCS, Ceraseal META biomed, AH plus, Tubli-Seal y Sealapex en un entorno experimental con fibroblastos (19).

2.3. LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal es el tejido conjuntivo celular blando y muy vascularizado que rodea las raíces de los dientes y une el cemento radicular con la pared del alvéolo. En sentido contornal, el ligamento periodontal continúa con la lámina propia de la encía y está delimitado de la encía por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz (fibras de la cresta alveolar) (20).

El ligamento periodontal se halla en el espacio situado entre las raíces de los dientes y la lámina dura o el hueso alveolar propiamente dicho (Figura 7). El hueso alveolar

rodea al diente desde el ápice hasta aproximadamente 1 mm por apical de la unión amelocementaria (20).

El espacio del ligamento periodontal tiene forma de reloj de arena y es más angosto en la mitad de la raíz. El espesor del ligamento periodontal es aproximadamente 0.25 mm (entre 0.2 y 0.4 mm), la presencia de un ligamento periodontal permite que las fuerzas ejercidas durante la función masticatoria y otros contactos dentarios se distribuyan sobre la apófisis alveolar y sean absorbidas por la apófisis alveolar por vía del hueso alveolar propiamente dicho. El ligamento periodontal también es esencial para la movilidad de los dientes. La movilidad dentaria esta determinada en buena medida por el espesor, la altura y la calidad del ligamento periodontal (20).

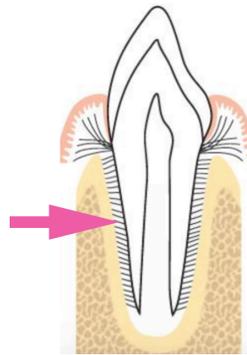


Figura 7. Ligamento periodontal

Figura que muestra los haces de fibras del ligamento periodontal, que se hayan en constante remodelación (20).

El diente esta unido al hueso mediante haces de fibras colágenas que pueden ser clasificadas en los siguientes grupos, conforme a su disposición: fibras crestalveolares, fibras horizontales, fibras oblicuas, fibras apicales (20).

El ligamento periodontal y el cemento radicular se desarrollan a partir del tejido conjuntivo laxo (el folículo) que rodea al germen dentario y este se forma simultáneamente con el desarrollo de la raíz y la erupción del diente. El germen dentario se forma en una cripta de hueso. Durante su proceso de maduración, las fibras

II. INTRODUCCIÓN

de colágenas que producen los fibroblastos en el tejido conjuntivo laxo quedan incluidas en el cemento neoformado inmediatamente por apical a la unión amelocementaria. Estos haces de fibras se orientan hacia la parte coronaria de la cripta ósea y más adelante formarán el grupo de fibras dentogingivales, el grupo de fibras dentoperiósticas y el grupo de fibras transeptales que pertenecen a las fibras gingivales orientadas (20).

Las fibras genuinas del ligamento periodontal, las fibras principales, se forman al unísono con la erupción del diente. En primer término, es factible identificar las fibras cuando penetran en la porción más marginal del hueso alveolar. Después pueden verse haces de fibras colágenas orientadas más apicalmente. La alteración de las fibras colágenas es constante durante la fase de erupción del diente. Primero, cuando el diente entra en oclusión y funciona de manera correcta, las fibras del ligamento periodontal se reúnen en grupos de fibras de colágenas, bien orientadas. Estas estructuras de colágeno se hallan en constante remodelación. Es decir, resorción de fibras viejas y formación de nuevas, formando: Fibras dentogingivales, fibras dentoperiósticas, fibras horizontales, fibras oblicuas, fibras apicales y fibras crestalveolares (20).

Las fibras que nacen en el cemento aumentan después su longitud y su espesor y se fusionan dentro del espacio periodontal con las fibras provenientes del hueso alveolar. Después de la erupción, cuando el diente ocluye y empieza a funcionar, las fibras principales se organizan en haces que discurren sin solución de continuidad desde el hueso hacia el cemento. El diámetro de las fibras principales incluidas en el cemento (fibras de Sharpey) es menor que el de las incluidas en el hueso alveolar propiamente dicho, pero son más numerosas que estas últimas. El ligamento periodontal contiene también unas pocas fibras elásticas asociadas con los vasos sanguíneos, fibras de oxitalano (20).

Las células del ligamento periodontal son: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos y asimismo células epiteliales y fibras nerviosas. Los fibroblastos se

alinean paralelos a las fibras principales mientras que los cementoblastos recubren la superficie del cemento y, los osteoblastos, la superficie del hueso (20).

2.3.1. Fibroblastos

Los fibroblastos son células predominantes en el tejido conjuntivo (65% del total de la población celular). Los fibroblastos se ocupan de la producción de diversos tipos de fibras que se hallan en el tejido conjuntivo, pero también intervienen en la síntesis de la matriz del tejido conjuntivo (20).

Derivadas del mesénquima y especializadas en la síntesis de fibras colágenas y de las glucoproteínas de la sustancia fundamental amorfa. Son células de forma ahusada o estrellada con núcleo ovalado (Figura 8) que contiene uno o más nucléolos, y un citoplasma basófilo, con abundantes ribosomas libres, vesículas secretoras con los precursores del colágeno en su interior y aparato de Golgi y retículo endoplasmático muy desarrollados. Los fibroblastos son células poco móviles y se disponen por lo general en la proximidad de las fibras colágenas (20).

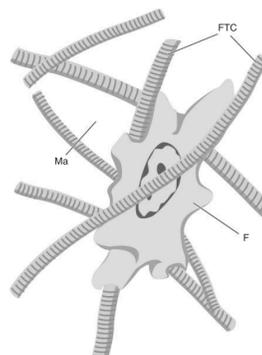


Figura 8. Fibroblasto

Figura que representa un fibroblasto (F) ubicado dentro de una red de fibras de tejido conjuntivo (FTC). El espacio entre estos elementos está ocupado por la matriz (AM) que constituye el “medioambiente” de la célula (20).

Se ha publicado un gran número de estudios in vitro sobre la biocompatibilidad de los selladores de conductos radiculares. La mayoría de ellos ha utilizado ensayos de

cultivo celular. Aunque se publican varios enfoques experimentales, la citotoxicidad observada de los selladores de conductos radiculares varía con cada estudio. A menudo es difícil comparar los resultados de los ensayos de cultivo celular debido a la variación en las condiciones experimentales, como el tipo de célula, el método de contacto del material celular, el tiempo de exposición y la condición del material (21).

2.3.2 ESTUDIO MTT

El ensayo de viabilidad celular CyQUANT MTT utiliza el reactivo MTT bien establecido y ampliamente utilizado para medir la actividad metabólica de las células de los mamíferos como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán púrpura fuertemente pigmentados por células metabólicamente activas.

Las células viables contienen enzimas oxidorreductasa dependientes de NAD(P)H que reducen el MTT a formazán. Los cristales de formazán insolubles se disuelven usando una solución de solubilización y la solución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 500-600 nm utilizando un espectrofotómetro de pozos múltiples, o' después de la solubilización, la absorbancia del formazán puede medirse con un lector de absorbancia para microplacas. Cuanto más oscura sea la solución, mayor será el número de células viables y metabólicamente activas (22).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La existencia de cementos selladores de diferentes composiciones y marcas, hace que el profesional tenga un reto al momento de elegir el cemento sellador a usar, entre estos están los selladores a base de resina epóxica como el AH plus, los cementos a base de hidróxido de calcio como el Sealapex, los cementos a base de óxido de zinc y eugenol como Tubli-Seal y los biocerámicos a base de silicato de calcio como lo son Ceraseal, Bioroot RCS y Endosequence BC sealer.

Todos los cementos claman que cumplen con las propiedades necesarias para ser un cemento ideal, por ende nos resulta de suma importancia analizar cada uno de ellos.

Por ello nos preguntamos ¿Los cementos estudiados exhibirán diferencias en su citocompatibilidad derivado de su naturaleza?

IV. JUSTIFICACIÓN

El desempeño óptimo de un cemento endodóntico no solo se relaciona con capacidad de sellado, sino también con la posible respuesta que pueda tener en los tejidos circundantes.

Considerando lo anterior, en este estudio se plantea la caracterización de la citocompatibilidad de seis cementos selladores de distinta naturaleza aplicados en la práctica clínica.

Debido a que no existen estudios en nuestro medio que evidencien la citocompatibilidad del nuevo cemento sellador biocerámico, Ceraseal, Bioroot RCS y Endosequence BC sealer motiva investigar la existencia de esta característica.

Probando la citocompatibilidad en la línea celular de fibroblastos de ratón en crecimiento y confluente L929 ATTC-CCL-1.

Asimismo compararlos con otros selladores a base de resina epóxica AH plus (Dentsply/Maillefer), a base de óxido de zinc y eugenol llamado Tubli-Seal (Kerr) y para complementar este estudio añadir el cemento actualmente más usado, a base de hidróxido de calcio Sealapex (Septodont) para enriquecer este estudio.

V. HIPÓTESIS

5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La caracterización biológica planteada en este trabajo de investigación nos permitirá identificar diferencias -si las hay- en la citocompatibilidad de los cementos selladores Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, AH plus, Tubli-Seal y Sealapex.

5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)

No existirá diferencia estadísticamente significativa al comparar la viabilidad de las células cultivadas en presencia y ausencia de los cementos objeto de estudio, con un nivel de confianza del 95%.

5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Existirá diferencia estadísticamente significativa al comparar la viabilidad de las células cultivadas en presencia de cualquiera de los cementos objeto de estudio, ya sea con respecto a las células sin tratar o con respecto a las células cultivadas en presencia de otro cemento, con un nivel de confianza del 95%.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad de los cementos selladores Ceraseal, Endosequence BC sealer, Bioroot RCS, AH plus, Tubli-Seal y Sealapex a través de ensayos *in vitro*.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar pastillas de los cementos selladores objeto de estudio.

Obtener lixiviados de los cementos objeto de estudio.

Cultivar las células fibroblastos L929 en presencia de los lixiviados obtenidos.

Evaluar la citotoxicidad de los cementos objeto de estudio a 24, 48 y 72 h a través del ensayo MTT.

Llevar a cabo análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Determinar cual cemento sellador posee mejor citocompatibilidad.

VII. VARIABLES

7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Tipo de cemento (Ceraseal, Endosequence BC sealer, Bioroot RCS, AH plus, Tubli-Seal y Sealapex).

7.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Citocompatibilidad

7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES

La citotoxicidad se evaluara con el porcentaje de supervivencia de fibroblastos después de 24, 48 y 72 horas en contacto con los 6 cementos selladores.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio es experimental. El experimento de citocompatibilidad se realiza por ensayo MTT, que se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular sobre la línea celular de fibroblasto L929.

8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

- Sistema 1: Lixiviados del cemento sellador Ceraseal.
- Sistema 2: Lixiviados del cemento sellador Endosequence BC sealer.
- Sistema 3: Lixiviados del cemento sellador AH plus.
- Sistema 4: Lixiviados del cemento sellador Sealapex.
- Sistema 5: Lixiviados del cemento sellador BioRoot RCS.
- Sistema 6: Lixiviados del cemento sellador Tubli-Seal.

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

Los materiales de prueba utilizados en este estudio son Ceraseal (META Biomed Vina Vietnam), BC sealer (Endosequence BRASSELIER USA), AH plus (Densply De Trey GMBH Konstanz Alemania), Sealapex (SybronEndo Glendora CA, USA), BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maurdes-Fosses, France) y Tubli-Seal (Sybron Endo Kerr, Orange, CA).

Incubadora de CO₂, campana de flujo laminar, microscopio invertido, hojas de bisturí, cámara de Neubauer, cubreobjetos, tubos Ependorf estériles, tubos Falcon estériles, 8 pinzas para hacer muestras, cajas Petri de 100x15 mm estériles, torundas de

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

algodones prefabricadas estériles, losetas de papel estériles, 2 placas de pocillos y micropipetas de 20-200 μL y 100-1000 μL .

Fibroblastos L929 ATTC-CCL-1 (CCL 1, Colección Americana de Cultivo) se obtuvieron de laboratorio del Instituto Tecnológico de Tijuana campus Otoy, se utilizaron para examinar la citotoxicidad de los materiales de prueba, tripsina-edta. El medio DMEN (glutamina, aminoácidos, bicarbonato de sodio), suero fetal bovino, antibiótico (penicilina y streptomycin), placas de cultivo de tejidos de pocillos múltiples, solución salina balanceada de Hank (HBSS), rojo fenol y MTT [bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazolio] se obtuvieron de laboratorio de UABC, facultad de ciencias de la ingeniería y tecnología, valle de palmas, Tijuana, Baja California.

8.4. METODOLOGÍA

8.4.1. Preparación de las muestras

Preparación de las muestras: Se mezclara en un ambiente estéril cada cemento según las indicaciones del fabricante, posteriormente se colocaron en portaobjetos estériles cada cemento en una caja Petri, asimilando la humedad en boca con 3 torundas de algodón húmedas y se deja fraguar por 24 h a 37 °C, 100% de humedad (Figura 9).



Figura 9 Preparación de muestras.

En la figura se muestran cada cemento sellador en su respectiva caja Petri sellados con parafilm, en su proceso de fraguado.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Al transcurrir las 24 h cada pastilla se pesa en una microbalanza estandarizada a 30 mg. y se prepara lixiviados de cada una.

Los lixiviados se prepararan agregando las pastillas a un tubo Falcon con 3 mL de medio de cultivo completo (Figura 10) y se lleva a incubadora por 3 a 7 días a 37 °C.

Pasados los días se elimina la pastilla y nos quedamos con la muestra de cada cemento sellador.

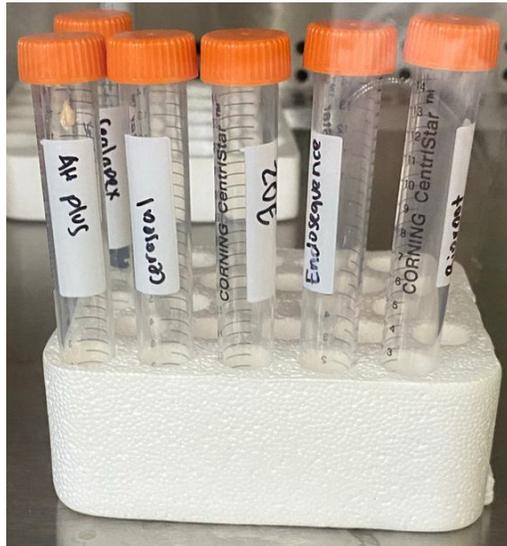


Figura 10 Tubos Falcon con lixiviados

En la figura se pueden observar los tubos Falcon con lixiviados de cada cemento sellador donde se colocaron pastillas con medio de cultivo en tubos Falcon y se encubaron por 7 días.

8.4.2 Cultivo celular

Para evaluar la citotoxicidad de los lixiviados de los selladores endodónticos, se cultivó la línea celular L929 ATTC-CCL-1 fibroblastos de ratón. Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) con rojo fenol y 10% de Suero Fetal Bovino, en condiciones de esterilidad e incubadas a 37 °C, con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tercer día utilizando tripsina-EDTA, y fueron cultivadas hasta llegar al 100% de confluencia celular. Las células se cultivaron en 15

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

mL de (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Médium, Gibco) sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina, Hepes 10 mM y NaHCO₃ (Figura 11). Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora bajo una atmósfera con 5% CO₂. Las monocapas celulares se lavaron con una solución salina tamponada SBF (solución búfer fosfatos) y se tripsinizaron con tripsina-EDTA (ácido tetraacético etilen-dinitrilo) durante cinco minutos a 37°C para separarlas de la placa. Luego se añadió medio completo para neutralizar la reacción de tripsinización. Las células se concentraron mediante centrifugación para eliminar así la tripsina y luego se añadió nuevo medio. Se resuspendieron las células y se contabilizaron por medio de un hematocitómetro. Finalmente, se realizaron las diluciones necesarias a partir de las células totales para obtener la cantidad de células por pozo deseada (10,000 células por pozo) (Norma española UNE-EN ISO 10993-5, Nalge Nunc International Corp.).

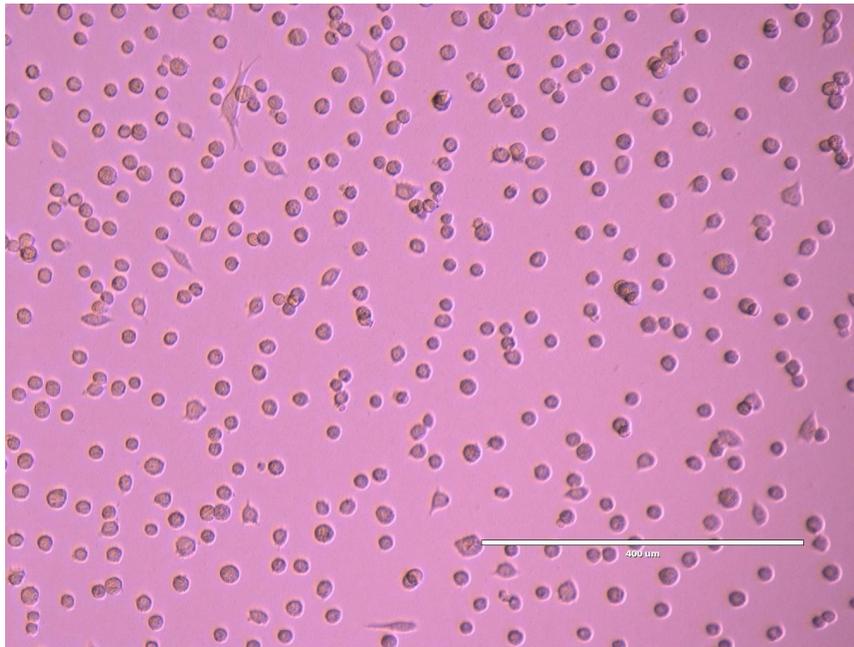


Figura 11 Medio con fibroblastos

En la figura se puede observar una micrografía óptica de las células L929 sembradas en la placa con en el medio de cultivo.

8.4.3 Metodología para los ensayos de viabilidad celular MTT

Para el ensayo MTT se llevó al 100% de confluencia (Figura 13) en frascos T75 y se tripsinizaron para ser contados (Figura 12) y ser llevados a un volumen final de 20 mL de medio DMEM con suero. Las células fueron contadas con la ayuda de un hematocitometro (Cole-Parmer). Para el ensayo MTT la línea celular fue sembrada en 4 placas de pocillos con 100 μ L de suspensión celular en cada pozo y se dejaron las células por 20 h.

Posteriormente se colocaron los lixiviados de los cementos selladores radiculares, los diferentes lixiviados fueron colocados por triplicado, así mismo se sembraron las células en pozos que no contenían ningún material para ser usados como control negativo o SC (-) y el cual representaron el crecimiento normal celular, de igual forma, se utilizaron por triplicado solo la suspensión celular para el ensayo MTT. Los lixiviados en contacto con las células se incubaron por 24, 48 y 72 h, 37°C y 5% CO₂. Al transcurrir los 3 diferentes tiempos de exposición, se añadieron 10 μ L del reactivo MTT, se mezclaron bien y se incubaron por 4 h a 37 °C y 5% CO₂ . Posteriormente se colocaron 100 μ L de dimetil sulfóxido en cada pozo, se mezclaron bien por pipeteo y se incubaron por 15 minutos a 37 °C y 5% CO₂ . Finalmente, todas las células expuestas fueron llevadas a leer en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570/590 nm para el ensayo MTT.(23)

Una vez que se obtienen las lecturas de absorbancia se procede a calcular la viabilidad celular con la siguiente ecuación.

Ecuación 1:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \frac{\text{Densidad óptica promedio de la muestra}}{\text{Densidad óptica promedio control negativo}} \times 100$$

Se calculó el promedio y la desviación estándar y se identificó en nivel de citotoxicidad con base a las ISO 10993 (24) donde se destaca la clasificación de citotóxicidad con base a el porcentaje de viabilidad celular: niveles sobresalientes de viabilidad celular es

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

de 100-70%: considerado como no citotóxico, con niveles de reactividad leve 69-50%: Ligeramente citotóxico, con niveles de reactividad moderada 49-25%: Moderadamente citotóxicos, considerados niveles de reactividad severa 24-0%: Severamente citotóxico (25).

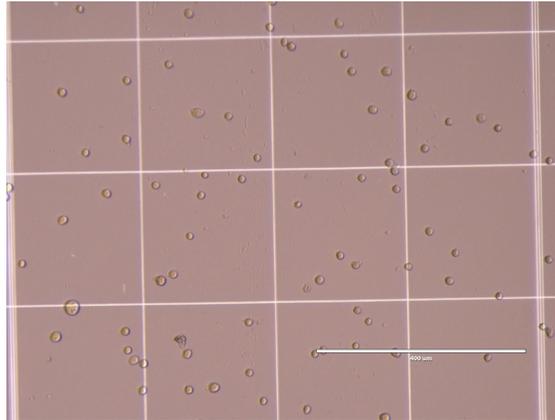


Figura 12 Placa de Neubauer

En la figura se puede observar una micrografía óptica de las células L929 en la cámara de Neubauer para su conteo.

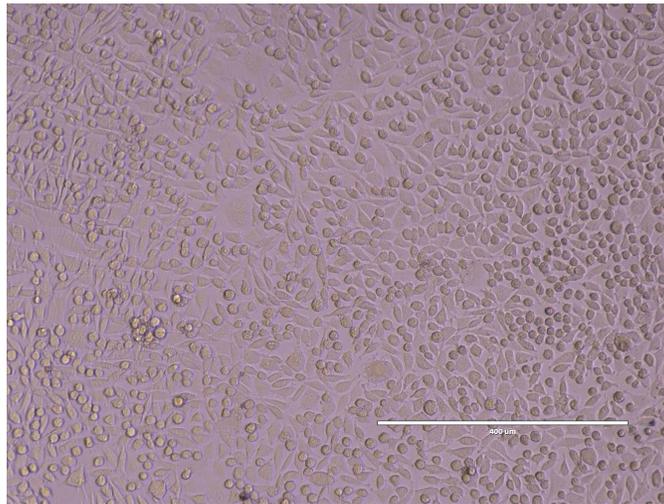


Figura 13 Fibroblastos 100% confluencia

En la figura se observan una micrografía óptica de las células L929 sembradas en la base de placa de 96 posillos previo de la aplicación de lixiviados.

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el método de Análisis de la Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía en conjunto con los métodos post hoc Bonferroni y Tukey. La diferencia se considerará como significativa a $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

Para evaluar la citocompatibilidad de los cementos selladores Ceraseal, Endosequence BC sealer, Bioroot RCS, AH plus, ZOE y Sealapex se obtuvieron lixiviados a partir de pastillas de los cementos. Los lixiviados fueron puestos en contacto con las células cultivadas de fibroblastos L929 durante 24, 48 y 72 h y se evaluó la citocompatibilidad a través del ensayo MTT. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 14-18.

A partir de la figura 14 en general, se puede observar una biocompatibilidad deseada por parte de todos los selladores estudiados. No se presenta una toxicidad importante en los lixiviados de todos los selladores a 24 h. En los lixiviados de los selladores AH Plus, Sealapex y ZOE se puede observar una disminución en la proliferación celular en los fibroblastos L929 conforme los días de exposición a los lixiviados aumentan.

A partir de la figura 15 se observa que a 24 h después de la exposición de las células con los lixiviados de los selladores, Sealapex es el que presenta mejor biocompatibilidad con un $96\pm 6\%$ de proliferación y ZOE es el que presenta menor biocompatibilidad ($78\pm 5\%$) comparado con todos los selladores evaluados.

A partir de la figura 16 se observa que después de 48 h de exposición, el sellador EndoSequence es el que presenta mejor biocompatibilidad con un $96\pm 11\%$ de crecimiento celular, seguido de Bioroot RCS con un $90\pm 6\%$, y Bioroot RCS con un $90\pm 6\%$, siendo los tres cementos biocerámicos. En este caso Sealapex y ZOE disminuyen su biocompatibilidad en casi un 65% en ambos casos. Por último, a las 72 h de exposición EndoSequence BC sealer y Ceraseal parecen haber disminuido su citotoxicidad en los fibroblastos aumentando un $98\pm 4\%$ y $92\pm 14\%$, respectivamente. Sealapex, provocó una disminución en el crecimiento celular por debajo del 50% (Figura 17).

En lo que respecta en el análisis estadístico de los resultados se observó que hubo diferencia significativa del cemento AH plus de las 24 h a las 48 h y de las 24 h a las 72 h. Con el cemento Sealapex se observó que hubo diferencia significativa de las 24h a

las 48 h y de las 24 h a las 72 h. Con el cemento ZOE se observó que hubo diferencia significativa de las 24 h a las 48 h, de las 48 h a las 72 h de las 24 h a las 72 h. De los cementos biocerámicos Ceraseal, Bioroot RCS y Endosequence BC sealer no se encontraron diferencias significativas (Figura 14).

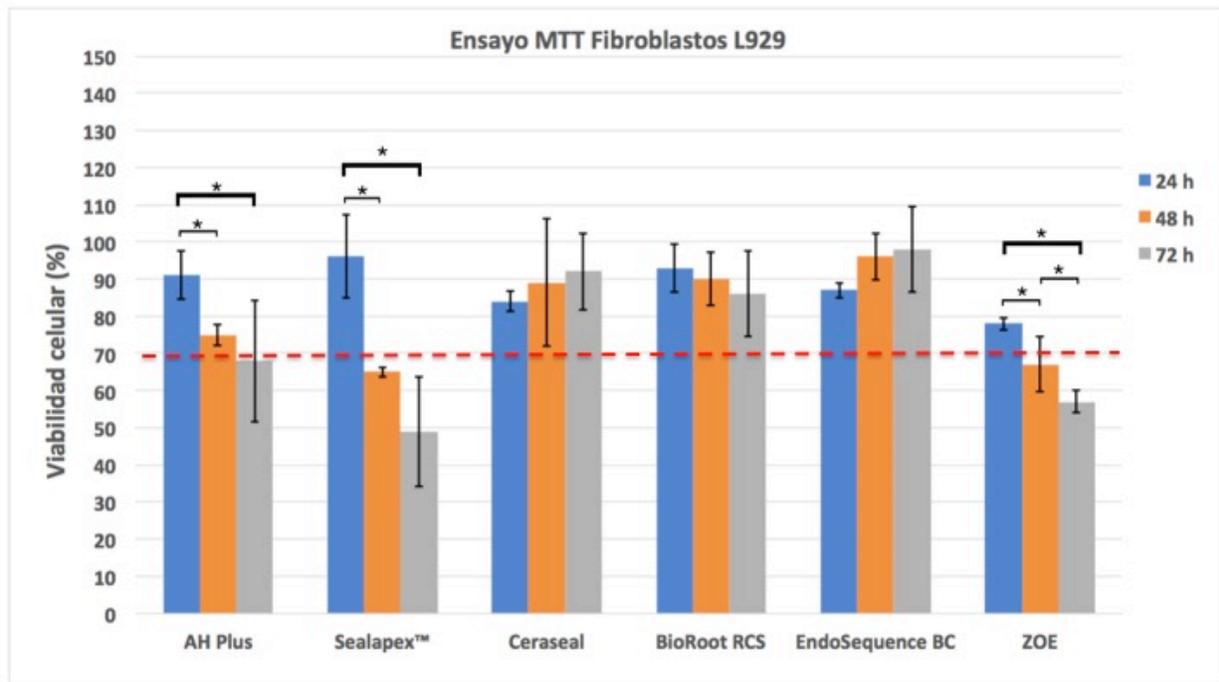


Figura 14. Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal a los tiempos de 24 h, 48 h y 72 h.

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$), de acuerdo con la ecuación de viabilidad celular. Los asteriscos representan los casos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa tras las comparaciones ($* p < 0.05$).

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos a las 24 h demostraron que hubo diferencia significativa entre los cementos Sealapex $96 \pm 6\%$ y Ceraseal $84 \pm 4\%$, y entre los cementos Ceraseal $84 \pm 4\%$ y Endosequence BC sealer $87 \pm 8\%$.

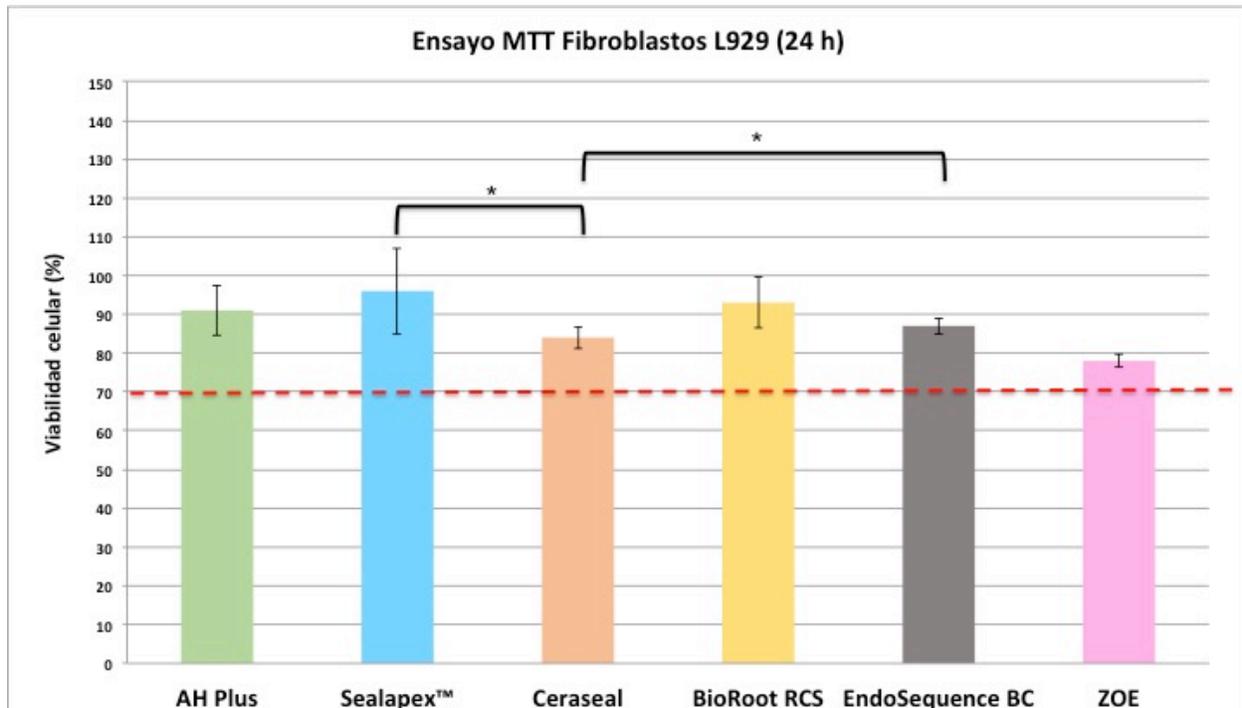


Figura 15 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 24 h

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$), de acuerdo con la ecuación de viabilidad celular. Los asteriscos representan los casos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa tras las comparaciones ($* p < 0.05$).

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos a las 48 h demostraron que hubo diferencia significativa entre cemento resinoso AH plus $75 \pm 8\%$ y los tres cementos biocerámicos: Ceraseal $89 \pm 12\%$, Bioroot RCS $90 \pm 6\%$ y Endosequence BC sealer $96 \pm 11\%$. Asimismo se demostró una diferencia significativa entre cemento a base de hidróxido de calcio Sealapex $65 \pm 5\%$ y los tres cementos biocerámicos. Igual que cemento a base de óxido de zinc y eugenol (ZOE) Tubli seal $67 \pm 9\%$ que demostró diferencia significativa con cementos biocerámicos. Observando que no se encontró una diferencia significativa entre cada uno de los cementos biocerámicos.

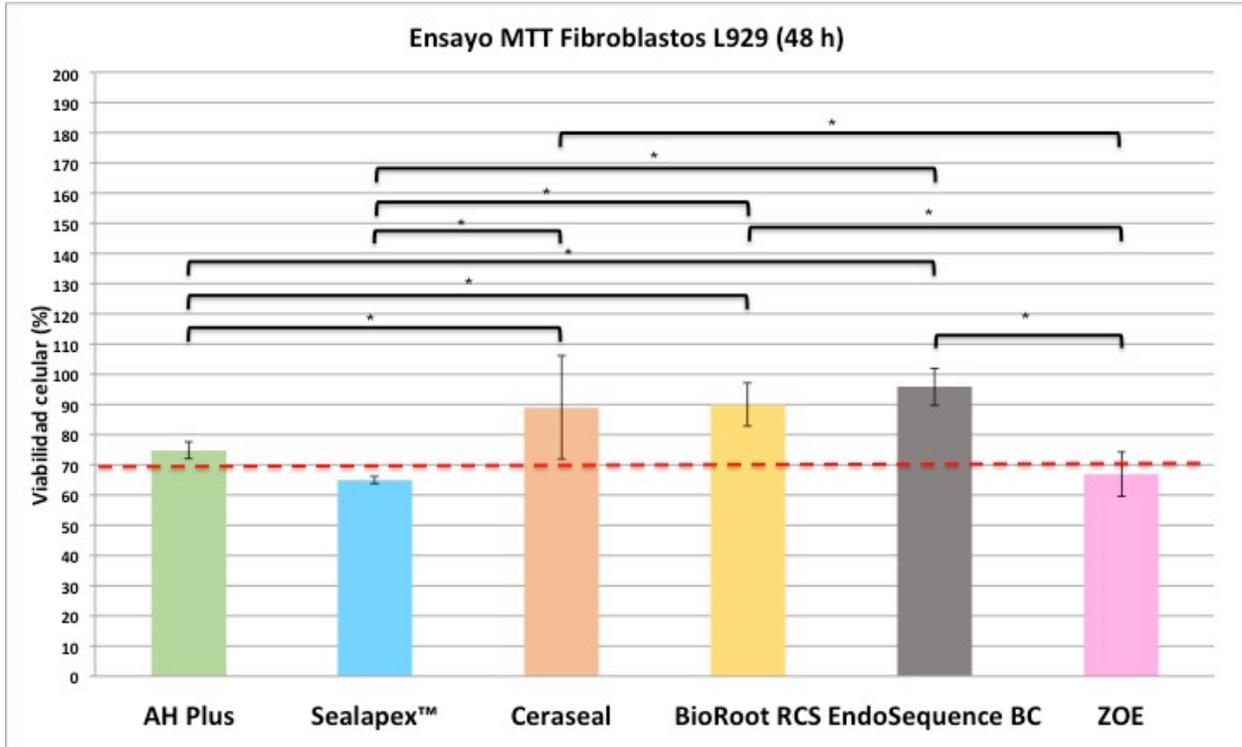


Figura 16 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 48 h

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$), de acuerdo con la ecuación de viabilidad celular. Los asteriscos representan los casos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa tras las comparaciones ($* p < 0.05$).

En la figura 17 se observan los resultados obtenidos a las 72 h demostrando que hubo diferencia significativa entre AH plus $68 \pm 6\%$ y el resto de los cementos selladores. Asimismo se encontró diferencia significativa entre Sealapex $49 \pm 7\%$ y los tres cementos selladores biocerámicos (Ceraseal $92 \pm 14\%$, Bioroot RCS $86 \pm 4\%$ y Endosequence BC sealer $98 \pm 4\%$). El cemento ZOE demostró diferencia significativa $57 \pm 13\%$ con Endosequence BC sealer $98 \pm 4\%$ y AH plus $68 \pm 6\%$ como ya se había mencionado previamente.

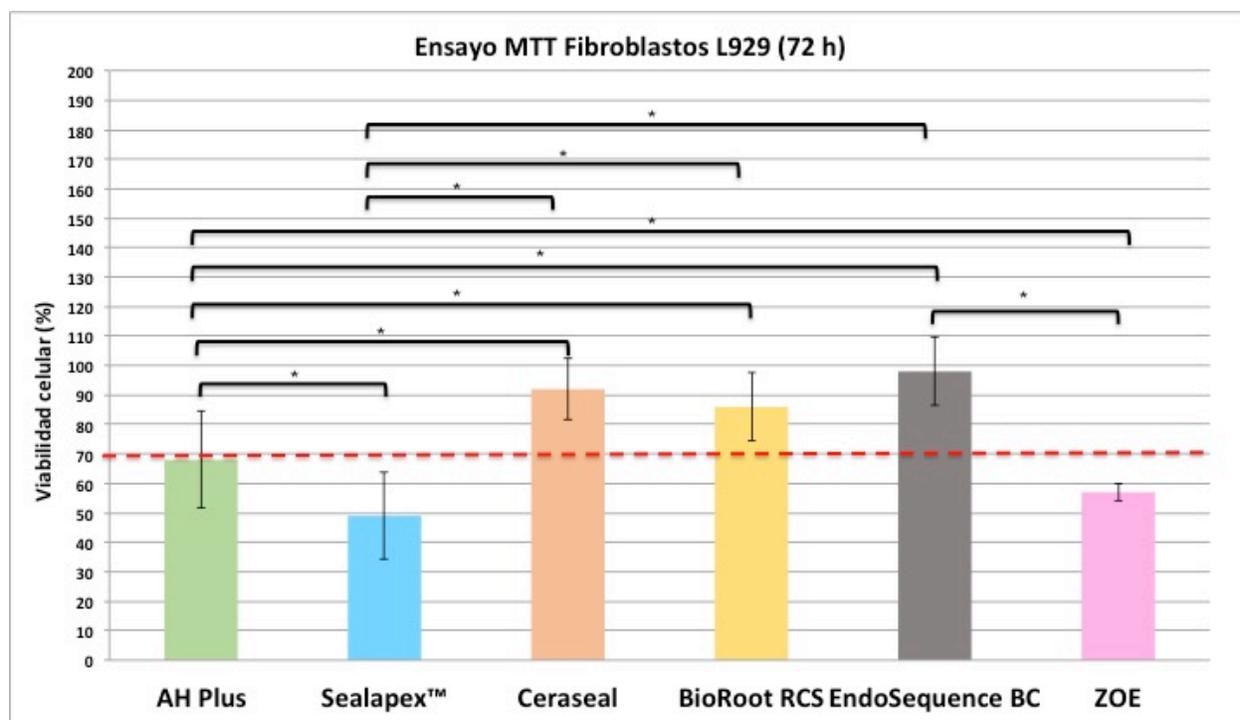


Figura 17 Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos AH plus, Sealapex, Ceraseal, Bioroot RCS, Endosequence BC sealer, ZOE Tubilseal al tiempo de 72 h.

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$), de acuerdo con la ecuación de viabilidad celular. Los asteriscos representan los casos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa tras las comparaciones ($* p < 0.05$).

Sellador Radicular	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
AH Plus	91±18	75±8	68±6
Sealapex™	96±6	65±5	49±7
Ceraseal	84±4	89±12	92±14
BioRoot RCS	93±7	90±6	86±4
EndoSequence BC	87±8	96±11	98±4
ZOE	78±5	67±9	57±13

Figura 18 Tabla de resultados

En la tabla de resultados se observan porcentajes de viabilidad celular en fibroblastos L929 de lixiviados de selladores radiculares..

X. DISCUSIÓN

Teixeira y colaboradores en 2017, los cementos selladores AH Plus y Sealapex por 24 y 48 h. Ambos selladores no demostraron citotoxicidad significativa a 24 h de exposición. Después de las 48 h se logró observar una reducción en el metabolismo celular de un 25% en ambos selladores. Estos resultados son comparables con los de nuestro estudio donde los selladores de AH Plus y Sealapex, no mostraron una toxicidad significativa (ANOVA) con respecto al crecimiento celular de la línea celular de fibroblastos L929 y posteriormente con respecto va avanzando el tiempo la viabilidad celular disminuye considerablemente (26).

Arun y colaboradores en 2017, encontraron que el sellado Tubli-Seal, el cual se encuentra basado en óxido de zinc y eugenol, exhibió significativamente mayor toxicidad que los cementos selladores Sealapex y AH Plus. Esta citotoxicidad se atribuye al eugenol libre que queda en la mezcla fresca, así como al liberado debido a la hidrólisis de la mezcla, que interfiere con la membrana citoplasmática e inhibe la respiración celular, cuando la mezcla del sellador se disuelve entra en contacto con los fluidos tisulares. Esto se ha reportado que ocurre principalmente con materiales que se endurecen en una base ácida como el Tubli-Seal. La liberación de ácido metil salicílico, alcohol bencílico, iones de zinc y colofonia del sellador Tubli-Seal también podrían contribuir a su naturaleza citotóxica. La viabilidad de celular de fibroblastos L929 medida a través del ensayo MTT después de 24 h de exposición a los selladores estudiados son del $77.90 \pm 0.36\%$ para de Tubli-Seal, $86.93 \pm 0.76\%$ para AH Plus y $94.13 \pm 0.83\%$ para Sealapex, respectivamente. En nuestro estudio un patrón similar puede apreciarse entre nuestras muestras donde Sealapex demostró una menor citotoxicidad comparados con AH Plus y Tubli-Seal a las 24 h de exposición (18).

Las observaciones mostradas en AH Plus en nuestro estudio también es confirmada por Al-Hiyasat y colaboradores en 2010, donde este sellador no presentó una evidente toxicidad a las 48 h de exposición en fibroblastos Balb C 3T3 (27).

Por otro lado, Poggio y colaboradores en 2017, observaron que conforme los días de exposición a los lixiviados de los cementos selladores aumentaban, la proliferación de las células de fibroblastos de la gingiva humana disminuía en AH Plus y Sealapex, dicho fenómeno también fue observado en nuestro estudio. En este estudio la proliferación de AH Plus a las 24 h fue de $92.95 \pm 3.23\%$, a las 48 h de $42.57 \pm 7.22\%$ y a las 72 h $24.54 \pm 5.56\%$, siendo este comportamiento muy semejante a nuestro trabajo. En el caso contrario de Sealapex, en nuestro estudio la biocompatibilidad fue del 96% a las 24 h que corresponde al trabajo de Arun y colaboradores en 2017, pero contraria al trabajo de Poggio y colaboradores en 2017, donde la citotoxicidad a las 24 h fue del 48%. Estas diferencias pueden deberse a la manera de preparación de las muestras, ya sea por la elución de la muestra y el tipo de línea celular utilizada, ya que la susceptibilidad en la citotoxicidad en lixiviados difiere entre fibroblastos humanos y de ratón (5).

En el caso de Bioroot RCS en nuestro estudio, presentó excelente biocompatibilidad independientemente de los días de exposición, caso similar a Vouzara y colaboradores en 2018, donde el sellador Bioroot BC fue expuesto por 24 y 72 h, y no provocó una disminución en la proliferación celular en células NIH/3T3 (28).

De acuerdo con Collado-González y colaboradores en 2017, BioRoot RCS, promueve la proliferación celular, preserva la viabilidad celular, promueve la migración celular y permite unión celular suficiente (19).

Así mismo, Dimitrova-Nakov y colaboradores en 2015, discute que BioRoot RCS no compromete la viabilidad celular, la morfología celular, la expresión de marcadores odontoblásticos, o la capacidad de diferenciación osteodontogénica de células madre pulpares (29).

Por último, Camps y colaboradores en 2015, observaron que BioRoot RCS es no solo citocompatible sino también potencialmente bioactivo porque indujo la secreción de factores osteogénicos y angiogénicos de periodontal células del ligamento (22).

Similar a nuestro estudio, Oh y colaboradores en 2020, reportó que Ceraseal posee mayor biocompatibilidad que AH Plus, sin embargo, dicho estudio fue realizado utilizando citometría de flujo en células madre periodontales humanas, implicando diferencias entre los resultados de ambos estudios (30).

López-García y colaboradores en 2020, reportó una bioactividad y un aumento en la proliferación celular mucho más pronunciada que nuestro trabajo, al pasar los días entre los 24, 48 y hasta 72 h cuando células madre de ligamento periodontal humano (hPDLSCs) son expuestas a los selladores EndoSequence BC y Ceraseal (11).

A pesar, de que nuestro estudio presentó un tendencia similar a este estudio, las diferencias son ligeras. Este estudio discute que ambos selladores promueven la viabilidad celular, unión celular, tasas de migración celular y tasas de liberación de iones (11).

XI. CONCLUSIONES

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la citotoxicidad de los cementos selladores Ceraseal, Endosequence BC sealer, Bioroot RCS, AH plus, Tubli-Seal y Sealapex a través de ensayos *in vitro*.

Tras el análisis estadístico se reflejó que existió diferencia estadísticamente significativa al comparar la viabilidad de las células cultivadas en presencia de cementos selladores biocerámicos, con cementos selladores resinosos, a base de óxido de zinc y eugenol y a base de hidróxido de calcio siendo los biocerámicos los que presentaron mayor biocompatibilidad con la línea celular.

Se encontró que Endosequence BC sealer es el más compatible 98%, seguido por Ceraseal 92% y después BioRoot 86%, siendo estos tres cementos del grupo de biocerámicos. Así confirmamos que según las reglas ISO10993 estos cementos son no citotóxicos ya que entran en el rango 100-70% por lo tanto introducir cementos biocerámicos a nuestra práctica clínica es lo más recomendable y sano para nuestros pacientes.

El cemento sellador que provocó una mayor disminución en el crecimiento celular fue Sealapex 49%, seguido de Tubli-Seal 57% y este por AH plus con 68% por lo tanto es Sealapex el considerado más citotóxico, aun siendo que a las 24 horas se mostro muy compatible. Con estos datos podemos concluir que los cementos a base de resina epoxi y a base de óxido de zinc y eugenol entran dentro del rango de cementos selladores levemente citotóxicos (69-50%), los cementos selladores a base de hidróxido de calcio entran al rango de moderadamente citotóxico (49-25%).

Con base en los resultados obtenidos se comprueba la Hipótesis alternativa (H1) de este trabajo de investigación.

XII. RECOMENDACIONES

Se recomienda introducir en nuestra práctica los cementos selladores biocerámicos para el tratamiento de conductos, ya que nos ayudará a causar menor dolor postoperatorio, menos probabilidad de provocar reacciones alérgicas y tener un mayor éxito en nuestros tratamientos.

Teniendo en cuenta que el cemento sellador Sealapex representó un rango de citotoxicidad más alto, se recomienda utilizar menos este cemento.

Se recomienda probar más cementos y aumentar el tiempo de contacto ya sea con esta línea celular u otra línea celular.

Asimismo también se recomienda evaluar la capacidad antimicrobiana con alguna cepa de bacteria o fungí para complementar con pruebas adicionales y así poder respaldar con mayores argumentos cual es el cemento es en sí el cemento sellador ideal.

Para futuros experimentos con la línea celular de fibroblastos L929 se recomienda tener presente que estas células son adherentes y por lo tanto se deben de tratar de la manera correspondiente.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen. Pathways of the Pulp - 10th edition. Vasa. 2011.
2. AAE special committee of full-time educators. Glossary of Endodontic Terms 2016. Gloss Endod Terms. 2015;9:43.
3. Beltes P, Keki P, Kodonas K, Gogos C, Economides N. Effect of Heat Application on Adhesion of Epoxy Resin Sealer. J Endod. 2008;34(11):1378–80.
4. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of Roekoseal and AH plus compared during different setting periods. J Endod. 2005;31(4):307–9.
5. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. J Clin Exp Dent. 2017;9(4):e574–8.
6. Hicks ML. Comparison of laterally condensed .06 and .02 tapered gutta-percha and sealer in vitro. J Endod. 2001;27(12):786–8.
7. Kharouf N, Arntz Y, Eid A, Zghal J, Sauro S. Physicochemical and Antibacterial Properties of Novel , Premixed Calcium Silicate-Based Sealer Compared to Powder – Liquid Bioceramic Sealer. 2020;
8. Soares I, Goldberg F. Endodoncia: técnica y fundamentos. In: Endodoncia: técnica y fundamentos. 2002.
9. Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC. 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. J Endod [Internet]. 2014;40(10):1642–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.04.006>
10. Mahardhini S. Journal of International Dental and Medical Research ISSN 1309-

- 100X <http://www.jidmr.com> Root Canal Sealer on Fiber Post Adhesion Swesty Mahardhini and et al. :173–9.
11. Myong-hyun B, Lozano A, Forner L, Llena C. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. 2019;
 12. Bukhari S, Ms BDS, Karabucak B, Ms DMD. The Antimicrobial Effect of Bioceramic Sealer on an 8-week Matured *Enterococcus faecalis* Bio fi Im Attached to Root Canal Dentinal Surface. *J Endod* [Internet]. 2019;1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.04.004>
 13. Carrillo Varguez A, Santana Basoco BI, González Vizcarra B, Villarreal Gómez LJ, Jaramillo Fernández D, Rentería Aguilera N, et al. Comparative in vitro Study of the Bond Strength on Dentin of Two Sealing Cements: BC-SEALER and AH-PLUS. *Rev Mex Ing Biomed*. 2016;37(2):115–22.
 14. Gabriela Carrillo-Varguez A, Bustamante-Reynoso T, Hernan Carrillo-Varguez L, Angel Cadena-Alcantar M, Gonzalez-Vizcarra B, Valdez-Castro R, et al. In vitro Comparative Study of Adhesion Force in Dentin of Three Cement Sealers BC-Sealer, AH-Plus and MTA Fillapex. *J Res Med Dent Sci*. 2018;6(4):6–11.
 15. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, et al. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J*. 2017;50(9):875–84.
 16. Heran J, Khalid S, Albaaj F, Tomson PL, Camilleri J. The single cone obturation technique with a modified warm filler. *J Dent*. 2019;89(July).
 17. Al-Khatib ZZ, Baum RH, Morse DR, Yesilsoy C, Bhambhani S, Furst ML. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1990;70(6):784–90.
 18. Arun S, Sampath V, Mahalaxmi S, Rajkumar K. A Comparative Evaluation of the

- Effect of the Addition of Pachymic Acid on the Cytotoxicity of 4 Different Root Canal Sealers—An In Vitro Study. *J Endod* [Internet]. 2017;43(1):96–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.004>
19. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2018;44(1):126–32.
 20. Lang L. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 6th ed. Panamericana, editor. Buenos Aires; 2017. 30–45 p.
 21. Araki K, Suda H, Sp LSW. Indirect Longitudinal Cytotoxicity of Root Canal Sealers on L929 Cells and Human Periodontal Ligament Fibroblasts. 2002;20(2):67–70.
 22. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod* [Internet]. 2015;41(9):1469–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.011>
 23. Telli C, Serper A, Dogan AL, Guc D. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. *J Endod*. 1999;25(12):811–3.
 24. Assad M, Jackson N. Biocompatibility Evaluation of Orthopedic Biomaterials and Medical Devices: A Review of Safety and Efficacy Models [Internet]. Vols. 1–3, *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Elsevier; 2019. 281–309 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11104-3>
 25. Sotolongo-García R, Rodríguez-Velázquez E, Alatorre-Meda M, Oropeza-Guzmán MT, Tirado-Guizar A, Pina-Luis G. Optimizing the efficiency of a cytocompatible carbon-dots-based fret platform and its application as a riboflavin sensor in beverages. *Nanomaterials*. 2021;11(8):1–18.
 26. Teixeira L, Basso FG, Hebling J, De Souza Costa CA, Mori GG, Silva-Sousa

- YTC, et al. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers using an in vitro experimental model with roots. *Braz Dent J.* 2017;28(2):165–71.
27. Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J.* 2010;43(2):148–53.
28. Vouzara T, Dimosiari G, Koulaouzidou EA, Economides N. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J Endod [Internet].* 2018;44(5):849–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.01.015>
29. Dimitrova-Nakov S, Uzunoglu E, Ardila-Osorio H, Baudry A, Richard G, Kellermann O, et al. In vitro bioactivity of Bioroot™ RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. *Dent Mater [Internet].* 2015;31(11):1290–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.163>
30. Oh H, Kim E, Lee S, Park S, Chen D, Shin SJ, et al. Comparison of biocompatibility of calcium silicate-based sealers and epoxy resin-based sealer on human periodontal ligament stem cells. *Materials (Basel).* 2020;13(22):1–14.