

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS
CEMENTOS SELLADORES EDGEBIOCERAMIC SEALER Y
ENDOSEQUENCE BC SEALER**

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

PRESENTA

C.D. PAULINA LUNA ALONSO

PRESIDENTE

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODAL

**DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES
HOFMANN SALCEDO**

SINODAL

DR. MANUEL ALATORRE MEDA

SINODAL

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

AGOSTO DEL 2021

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN *IN VITRO*
DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS CEMENTOS SELLADORES
EDGEBIOCERAMIC SEALER Y ENDOSEQUENCE BC SEALER**

Propuesto por la **C.D. PAULINA LUNA ALONSO**, 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

PRESIDENTE

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN *IN VITRO*
DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS CEMENTOS SELLADORES
EDGEBIOCERAMIC SEALER Y ENDOSEQUENCE BC SEALER**

Propuesto por la **C.D. PAULINA LUNA ALONSO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



Dra. María Elena de los Ángeles Hofmann Salcedo

SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN *IN VITRO*
DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS CEMENTOS SELLADORES
EDGEBIOCERAMIC SEALER Y ENDOSEQUENCE BC SEALER**

Propuesto por la **C.D. PAULINA LUNA ALONSO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE


Dr. Manuel Alatorre Meda
SINODAL

Ccp.- Archivo

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN *IN VITRO*
DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS CEMENTOS SELLADORES
EDGEBIOCERAMIC SEALER Y ENDOSEQUENCE BC SEALER**

Propuesto por la **C.D. PAULINA LUNA ALONSO**, 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 Vázquez

SINODAL

Ccp.- Archivo.

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS
CEMENTOS SELLADORES EDGEBIOCERAMIC SEALER Y
ENDOSEQUENCE BC SEALER**

PRESENTA

C.D. PAULINA LUNA ALONSO

PRESIDENTE

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODALES

DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES
HOFMANN SALCEDO

DR. MANUEL ALATORRE MEDA

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

Tijuana, Baja California, 21 de junio de 2021

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi amor y gratitud a las siguientes personas:

Primeramente, a Dios, por darme la salud y guiar mis pasos a seguir para la realización de mis sueños.

A mi equipo: mis papás Carlos y Lupita, que sin ellos nada. Con ellos todo. Por creer en mí y ser luz en mis días. Por impulsarme a cumplir mis metas que me propongo, pero sobre todo por su apoyo incondicional.

A mis hermanas quienes fueron el motor de amor para realizar lo que hago y sus detalles a distancia que nunca faltaron.

A mi abuelita Lupita por sus palabras de aliento en todo momento.

A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez por brindarme la oportunidad de ser parte de su posgrado CUPIS UABC.

A mis directores de tesis por su tiempo, dedicación y su compromiso con mis deseos de ser participe en la aportación a la ciencia.

A todos mis maestros y docentes por ser ejemplos de inspiración en el camino del conocimiento para mi desarrollo profesional.

A mis padrinos de Tijuana Titi y Sr. Juan por su comprensión y amistad.

A mis amigas que siempre me apoyaron y creyeron en mí.

Agradecimientos Institucionales

Quiero agradecer a las siguientes instituciones:

A CONACyT por la beca otorgada, No. CVU: 998284.

A los miembros del Laboratorio de Cultivo Celular y Microscopia Confocal del Instituto Tecnológico de Tijuana, por recibirnos en su Institución y apoyarnos en la realización de la experimentación de este proyecto de investigación.

Finalmente, se agradece a los siguientes proyectos:

Proyecto de CONACyT: INFR-2015-251863 “Fortalecimiento de la infraestructura científica de un laboratorio de cultivo celular para el desarrollo y evaluación biológica de biomateriales poliméricos y nuevas nanoplataformas teragnósticas”.
Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda.

Proyecto de CONACyT: PDCPN-2015-89 “Biomateriales producidos a partir de polímeros naturales para tratamiento regenerativo de úlceras del pie diabético”.
Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ECUACIONES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1. ENDODONCIA.....	3
2.2. TRATAMIENTO DE CONDUCTOS	4
2.2.1. TRIADA ENDODÓNCICA	5
2.2.2. OBTURACIÓN	6
2.2.3. ÉXITO DEL TRATAMIENTO DE CONDUCTOS.....	9
2.2.4. PROBLEMAS DURANTE LA OBTURACIÓN	10
2.2.5. FILTRACIÓN	11
2.3. MICROBIOTA ENDODÓNTICA.....	15
2.3.1 MICROORGANISMOS RESISTENTES EN EL SISTEMA DE CONDUCTOS	15
2.3.2. ENTEROCOCCUS FAECALIS	16
2.4. CARACTERÍSTICAS DE UN CEMENTO SELLADOR IDEAL.....	19
2.5. TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES CONVENCIONALES.....	20
2.5.1. Óxido de zinc y eugenol	20
2.5.2. Selladores de hidróxido de calcio.....	21
2.5.3. Selladores sin eugenol.....	22

2.5.4. Selladores de ionómero de vidrio	22
2.5.5. Selladores de resina.....	23
2.5.6. Selladores de silicona	26
2.5.7. Selladores de silicato de calcio	26
2.5.8. Selladores con productos químicos	27
2.6. CEMENTOS SELLADORES BIOCERÁMICOS	28
2.6.1. VENTAJAS DE CEMENTOS SELLADORES PREMEZCLADOS	29
2.6.2. CEMENTO SELLADOR BIOCERÁMICO ENDOSEQUENCE BC SEALER.....	29
2.6.3. CEMENTO SELLADOR BIOCERÁMICO EDGEBIOCERAMIC SEALER	31
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. HIPÓTESIS.....	34
5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	34
CITOCOMPATIBILIDAD.....	34
5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)	34
5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)	34
VI. OBJETIVOS	35
6.1. OBJETIVO GENERAL	35
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
VII. VARIABLES	36
7.1. VARIABLE INDEPENDIENTE	36
7.2. VARIABLE DEPENDIENTE	36
7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES	36
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	37

8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	37
8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO	37
8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL.....	37
8.4. METODOLOGÍA	39
8.4.1. Preparación de las muestras.....	39
8.4.2. Obtención de lixiviados en condiciones fisiológicas simuladas	41
8.4.3. Evaluación de citocompatibilidad	42
8.4.4. Evaluación de pH	48
8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
9.1. EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR A TRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA A 24 y 48 h	51
9.2. CITOCOMPATIBILIDAD A TRAVÉS DE ENSAYOS ELISA	56
9.3. EVALUACIÓN DEL pH DE LOS CEMENTOS DE ESTUDIO	58
X. CONCLUSIONES	60
10.1. EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA..	60
10.2. EVALUACIÓN DE PH.....	61
XI. RECOMENDACIONES.....	62
XII. BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de obturación en órgano dentario..... 6

Figura 2. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de pared del conducto radicular..... 18

Figura 3. Cemento sellador óxido de zinc y eugenol..... 20

Figura 4. Cemento sellador hidróxido de calcio Sealapex..... 21

Figura 5. Cemento sellador sin eugenol..... 22

Figura 6. Cemento sellador de ionómero de vidrio Ketac - Endo..... 22

Figura 7. Cementos de resina epoxídica AH Plus..... 23

Figura 8. Cemento sellador de resina de metacrilato EndoREZ..... 24

Figura 9. Cemento sellador de resinas de metacrilato 3era. generación..... 25

Figura 10. Cemento sellador de resinas de metacrilato metaSEAL..... 25

Figura 11. Cemento sellador de silicona RoekoSeal..... 26

Figura 12. Cemento sellador de silicato de calcio..... 26

Figura 13. Cemento sellador con productos químicos, Endomethasone..... 27

Figura 14. Cemento sellador biocerámico EndoSequence BC Sealer..... 29

Figura 15. Cemento sellador biocerámico EndoSequence BC Sealer..... 31

Figura 16. Fotografía de las muestras de cementos preparadas para su incubación..... 40

Figura 17. Incubación de las muestras por 24 h..... 41

Figura 18. Fotografía de la muestra en contacto con medio de cultivo celular para la obtención de los lixiviados..... 42

Figura 19. Células en placas de 96 pocillos..... 43

Figura 20. Fotografía de placa de 96 pocillos montada en la platina de microscopio óptico..... 44

Figura 21. Obtención de los lixiviados..... 45

Figura 22. Lavado de los lixiviados con solución de cristal violeta..... 46

Figura 23. Agitación orbital de caja de 96 pocillos..... 47

Figura 24. Lector de placas para determinar la citocompatibilidad de las muestras..... 47

Figura 25. Estandarización de muestras de cemento en microbalanza analítica. .	49
Figura 26. Medición de pH.	49
Figura 27. Morfología de las células sin teñir después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 24 h.....	52
Figura 28. Morfología de las células sin teñir después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 48 h.....	53
Figura 29. Morfología de las células teñidas con cristal violeta después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 24 h.	54
Figura 30. Morfología de las células teñidas con cristal violeta después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 48 h.	55
Figura 31. Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer a las 24 y 48 h.	57
Figura 32. Valores de pH.	59

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Citocompatibilidad (%)..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca.	Aproximadamente
CBCT	Tomografía Computarizada de Haz Cónico (por sus siglas en inglés)
CO₂	Dióxido de carbono
Cols.	Colaboradores
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Ensayos ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
h	Horas.
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTA	Agregado Trióxido Mineral (por sus siglas en inglés).
NiTi	Níquel – Titanio
nm	Nanómetros

LISTA DE ABREVIATURAS

nM	Nanómetros
pH	Potencial hidrógeno
pH	Potencial hidrogeno
s	Segundos
UV visible	Espectroscopia de ultravioleta visible
μL	Microlitros
μm	Micras

I. RESUMEN

Introducción: El éxito del tratamiento endodóntico se lleva a cabo realizando la triada endodóntica (desbridamiento, desinfección exhaustiva y obturación). La obturación por ser el último paso en la triada endodóntica en donde se procede a llenar el espacio del conducto radicular se utilizan cementos selladores que cumplen con los requisitos necesarios para poder llevar a cabo el papel importante que desempeña dentro del sistema de conductos. Hoy en día, para mayores porcentajes de éxito en el tratamiento de conductos se utilizan cementos selladores biocerámicos que, además de cumplir con capacidades de ser bioinertes, bioactivos y biogradables, es importante evaluar la citocompatibilidad de estos cementos debido a que se encuentran en contacto con los tejidos adyacentes al periapice.

Objetivo: Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la citocompatibilidad de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer por ensayos *in vitro* a distintos tiempos. **Método:** Se incubaron las muestras (n=6) por 24 h para su completo fraguado por lo que se utilizaron células MDA-MB-231 para la realización de los ensayos de citocompatibilidad colocándolas en placas de cultivo de 96 pocillos con medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) complementándolo con agregado de tinción celular de solución cristal violeta al 0.1% para registrar los resultados que fueron arrojados en un lector de microplacas iMark, BIO-RAD operado a una longitud de onda de 595 nm y para su referente evaluación de la morfología celular se empleó un microscopio invertido (Olympus CKX53). Para 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 un factor en conjunto con el método Post-hoc de Tukey. Los valores de pH de las muestras de cementos de estudio fueron evaluados tras su inmersión en agua destilada durante 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 8 y 16 días a temperatura ambiente. **Resultados:** Los resultados por ensayo ELISA demostraron un porcentaje de citocompatibilidad de los cementos de estudio alrededor del 96% (EdgeBioceramic Sealer) y 83% (EndoSequence BC Sealer) a las 24 h de incubación, con diferencia

estadísticamente significativa a las 48 h del cemento EndoSequence BC Sealer que desplegó un decremento ligero en su citocompatibilidad arrojando un valor de 64%, lo que corresponde a una reactividad o citocompatibilidad moderada, a diferencia del cemento EdgeBioceramic Sealer (91%). Con respecto a la morfología y densidad celular observada no hubo cambios evidentes. Finalmente, los valores de pH de las muestras de los cementos de estudio presentaron resultados similares entre ellos a los distintos tiempos a temperatura ambiente. **Conclusiones:** Los ensayos ELISA confirmaron de forma cuantitativa alta citocompatibilidad de ambos cementos superando niveles superiores al 70% tras 24 h de cultivo celular ($p < 0.05$), mientras que a las 48 h de cultivo existió un ligero decremento de 63% en el cemento EndoSequence BC Sealer ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos de la evaluación del pH mantuvieron valores constantes aproximadamente de 12 en periodos superiores a 24 h.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. ENDODONCIA

La historia de la endodoncia en odontología es tan escaso e indocumentado como el de la historia temprana de la odontología en sí. El desarrollo científico de la endodoncia se desarrolla en la tercera década de este siglo, desde entonces ha tenido numerosos avances y desarrollos, produciéndose alcances continuamente (1).

La endodoncia fue practicada desde el siglo 1, cuando Arquígenes describe por primera vez que el “tratamiento para la pulpitis” se debía al proceso de extirpación de la pulpa para conservar el diente (1).

Con el paso de los siglos y los hallazgos, se descubrió que, para poder hablar de endodoncia, se debía de describir sucesos terapéuticos que incluyeran evitar el dolor y eliminar microorganismos dentro del diente que conllevaran a un diente en mal estado de salud (2).

Fue entonces, que tras la fabricación del primer instrumento endodóncico por Edwin Maynard, de Washington, D.C., en 1838, partiendo de una cuerda de reloj, se dio hincapié a la capacidad de poder realizar tratamientos dentales dentro de la pulpa dental (2).

La pulpa dentaria es uno de los tejidos más ricamente inervados del organismo, siendo capaz de transmitir los estímulos desde el sistema nervioso central, realizando una respuesta sensorial que posee la capacidad de manifestar alteraciones en el comportamiento del organismo (3).

Esto se debe a que el complejo dentino-pulpar está envuelto, en la corona, por esmalte dentario, y en la raíz, por cemento, ligamento periodontal y hueso. La armonía del complejo dentino-pulpar puede ser comprometida si los tejidos

circundantes sufren alguna forma de agresión, que puede llegar a la pulpa por el sistema de conductos radiculares y por el sistema.

de túbulos dentinarios. Por otro lado, las patologías pulpares de naturaleza inflamatoria o degenerativa pueden afectar de igual manera a sus tejidos circundantes (3).

Es por esta búsqueda exhaustiva del conocimiento y funcionamiento del complejo dentino-pulpar que a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, la endodoncia se denominada “Terapia de conductos radiculares” o “Patodoncia” y gracias al Dr. Harry B. Johnson, de Atlanta, Georgia, quién fue el primer profesional que limitó su ejercicio a la endodoncia y acuñó el término “endodoncia” (del griego **endo**; dentro y **odontos**; diente: proceso de trabajo dentro del diente), por lo cual, tuvo un cambio radical dentro de la práctica odontológica (1).

Al paso del tiempo, en 1943, un grupo de profesionales de Chicago formaron la organización Asociación americana de endodoncia y esta reconoció a la endodoncia como especialidad en 1963, con una definición más sólida de ser la rama de la odontología encargada del estudio de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental humana, así como de los tejidos perirradiculares. El objetivo final de la terapia endodóncica es mantener o devolver la salud a los tejidos circundantes del diente, es decir, prevenir o revertir cuadros inflamatorios e infecciosos (4).

2.2. TRATAMIENTO DE CONDUCTOS

Por ser de vital importancia la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del complejo dentino-pulpar y sus manifestaciones periapicales, la asociación americana de endodoncia, en el 2016, definió como “tratamiento de conductos” a la remoción completa de la pulpa dental vital. Este tratamiento dental se realiza para la preservación del órgano dental dentro de la cavidad bucal (5).

El funcionamiento de la pulpa dental actúa dinámicamente porque el complejo dentino-pulpar al ser un sistema microcirculatorio, su flujo sanguíneo es

fundamental para la supervivencia de este órgano. Dependiendo de la variedad de factores, el complejo dentino-pulpar es un sistema sensorial exquisitamente sensible, siendo esta característica de gran importancia, debido a lo cual es significativo para su diagnóstico (6).

El tejido pupar puede verse comprometido por una variedad de factores, de los cuales bacterias y sus productos tóxicos son lo más común, en formar de penetración de caries a través de el diente, con posterior invasión de la pulpa dental (3).

Es por esta razón, que el profesionalista extrae la pulpa enferma a través de una cavidad de acceso creada en la superficie oclusal o lingual del órgano dentario, con ayuda de la utilización de instrumentos finos de acero inoxidable en tamaños graduados estandarizados llamándole a este paso como: “Preparación biomecánica”. Así mismo, se incorporan diversos agentes químicos al régimen de tratamiento, irrigando el sistema de conductos radiculares. El espacio conformado en el conducto radicular limpio se sella con gutapercha (un material similar al caucho) y un cemento sellador no irritante para finalizar el tratamiento radicular (7).

Cuando el espacio del conducto radicular se ha sellado y se ha creado esta zona aséptica, el proceso patológico periapical se resolverá a través de las modalidades habituales de reparación y / o regeneración de tejidos duros y blandos (7).

2.2.1. TRIADA ENDODÓNCICA

El tratamiento endodóncico por ser tan íntegro en todas sus etapas, su objetivo principal se dirige a una serie de objetivos específicos: curar o prevenir la periodontitis apical siendo como objetivo final que los pacientes conserven sus dientes naturales dentro de la cavidad bucal otorgándoles su natural estética (8).

Por lo tanto, a lo largo de los años han existido investigaciones científicas en donde se proponen una serie de pasos sobre el seguimiento que se debe de llevar a cabo para realizar un buen tratamiento de conductos y conducir al órgano dental a un pronóstico favorable. Para que exista el éxito endodóncico del 85% - 90%, Ingle

(1958) señaló que deberá llevarse a cabo *“la triada endodónica”* basada en el desbridamiento, desinfección exhaustiva y obturación, todos estos tratándose con la misma importancia (9).

Por consiguiente, considerando estos principios y enfocándonos de primera instancia en la etapa de **limpieza y conformación** del conducto radicular, se deben de cumplir objetivos tanto mecánicos como biológicos, los cuales nos proporcionarán un conducto aceptable y considerable dando paso a las soluciones de irrigación para que se realice una desinfección adecuada desde el acceso hasta la zona apical del órgano dental, conservando de igual manera la integridad de las estructuras radiculares para que así, al momento de la colocación del material que se alojara en este espacio, se adapte a la forma y curvatura originales del conducto radicular (10).

2.2.2. OBTURACIÓN

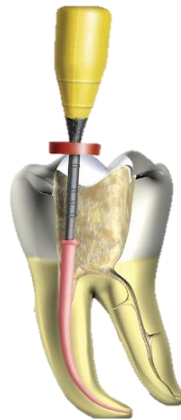


Figura 1. Ejemplo de obturación en órgano dentario.

Hoy en día, para que éxito del tratamiento de conductos se lleve a cabo de manera eficaz, se sustenta en principios más amplios de lo que solamente se basó Ingle en 1958, que incluyen el diagnóstico y la planificación del tratamiento, el conocimiento de la anatomía y la morfología, los conceptos tradicionales del desbridamiento, desinfección exhaustiva y como último paso pero no menos importante la obturación (11).

Gracias al estudio clásico de Ingle, en donde se desarrolló la importancia sobre el éxito y fracaso en la endodoncia, mostrando que un 58% de los fracasos se debían a una obturación incompleta, despertó el interés en el desarrollo de materiales y técnicas para obturar el espacio de los conductos radiculares (12).

Por consiguiente, la obturación, por ser el último paso en la triada endodóntica es en donde se procede a llenar el espacio del conducto radicular conformado y desbridado con un material de relleno temporal o permanente (Figura 1) (13).

Para que la obturación pueda llevarse a cabo, es necesario observar algunas condiciones:

- a) El diente no debe presentar dolor espontáneo ni provocado; la presencia de dolor indica inflamación de los tejidos periapicales y la obturación podría exacerbar el cuadro.
- b) El conducto debe estar limpio y conformado de manera correcta.
- c) El conducto debe estar seco: la presencia de exudado contraindica la obturación.
- d) El conducto conformado no debe quedar abierto a la cavidad bucal por ruptura de la restauración provisoria.

Cuando el diente presenta todos estos requisitos, es posible proceder a la obturación del conducto radicular (3).

2.2.2.1. Objetivos de la obturación

La obturación refleja la limpieza y conformación, pues su objetivo principal es la eliminación de todas las vías de filtración desde la cavidad oral o tejidos perirradiculares hacia el interior del sistema de conductos. Al ocupar el espacio creado por la conformación del conducto radicular, la obturación impide la supervivencia de microorganismos, evita el estancamiento de líquidos y ofrece las condiciones para que se produzca la reparación o no interfieran con este (14). Es por esto, que la obtención de un “*Sellado hermético*” es un tema muy frecuente como un objetivo fundamental en el tratamiento de conductos; su término *hermético*

significa sellado contra la entrada o salida del aire, ya que se debe evitar cualquier filtración de fluidos y evitar la supervivencia de las bacterias. Es importante tener un buen sellado tanto en la región apical como en la región coronal (14).

2.2.2.2. *Materiales de obturación*

Para poder obtener el sellado hermético entre la pared dentinaria y el material de obturación dentro del conducto radicular, la literatura nos muestra trabajos en donde se presentan investigaciones en donde se evalúa el empleo de la utilización de conos de gutapercha y cemento sellador para poder lograr la obturación ideal (3).

Los conos de gutapercha presentan en su composición; gutapercha, óxido de zinc, radiopacificador y resinas o ceras, por estas adecuadas propiedades físicas, químicas y biológicas es el material más utilizado a lo largo de años. Este material, de igual manera puede presentar variaciones gracias a los calibres que conlleva (11).

Por otro lado, Grossman señaló que, los cementos selladores, independientemente de su tipo, tendrían que reunir los siguientes requisitos: : i) ser de fácil manipulación, ii) ser dimensionalmente estable, iii) que se adapte a la anatomía interna, iv) no causar irritación a los tejidos, v) ser impermeable a la humedad, vi) no ser poroso, vii) no teñir la estructura dental, viii) ser estéril, ix) fácil de retirar, x) poseer actividad antibacteriana y xi) no presentar corrosión ni oxidación (15).

Los cementos selladores del conducto radicular son necesarios para sellar el espacio entre la pared dentinaria y material obturador, también llenan los huecos e irregularidades del conducto radicular ya que en estos pueden quedar residuos de barrillo dentinario que no fueron eliminados en el desbridamiento mecánico y/o desinfección exhaustiva que podría actuar desfavorablemente en el éxito del tratamiento de conductos. Por esta razón, es importante resaltar que el cemento sellador debe poseer actividad antibacteriana para incrementar el pronóstico favorable del tratamiento de conductos. Además los cementos selladores deben actuar como lubricante durante la obturación, ser biocompatibles y bien tolerados

por los tejidos perirradiculares; entre las formulaciones más populares podemos encontrar las de óxido de zinc-eugenol, hidróxido de calcio, ionómeros de vidrio y resinas (16).

2.2.3. ÉXITO DEL TRATAMIENTO DE CONDUCTOS

Para poder concluir que la terapia endodóncica ha conllevado a un éxito para el órgano dentario tratado, existen diferentes variables que juegan un papel muy importante.

Históricamente el éxito o fracaso se basaba en la necesidad de “esterilización” del sistema de conductos radiculares, seguido del sellado hermético de la zona apical. Estas teorías fueron basadas en los conceptos de “infección focal” en 1919 por Hunter’s y que hasta la fecha se siguen sugiriendo para que por medio del sellado hermético pueda ser de fácil desbridamiento y neutralización de los microorganismos existentes y se eviten así, resultados inflamatorios en el sistema de conductos radiculares para que la obturación completa muestre mejores resultados al finalizarse el tratamiento endodóncico (17).

En las últimas dos décadas se han desarrollado avances significativos en tecnología, como materiales y procedimientos de tratamiento endodóncico que conllevan a incrementar porcentajes de éxito en la terapia endodóncica, incluyendo microscopía, instrumentos rotatorios de NiTi, utilización de ultrasonidos, soluciones y tecnologías de irrigación mejoradas, radiografía digital, imágenes tridimensionales CBCT, así como el uso de materiales biocerámicos para la obturación, entre otros. Mejorando la calidad del tratamiento endodóncico e incrementando la tasa de éxito clínico (18).

Indudablemente, para poder conllevar al éxito a la terapia endodóncica, se debe de auxiliar con una serie de tomas radiográficas, sin embargo, no es posible evaluar por completo el sellado establecido durante la obturación solamente con esto, y es importante recordar que ningún material ni ninguna técnica evitan totalmente la filtración. De hecho, la obtención de un sellado impermeable puede no resultar

posible por la estructura tubular porosa que presenta la dentina y las irregularidades del conducto radicular (11).

La etiología de la enfermedad pulpar y perriradicular es bacteriana (17). Por eso como parte de otro factor para poder considerar el éxito en un tratamiento de conductos radiculares es el poder combatir con este tipo de microorganismos que se adhieren a las paredes del conducto provocando una contaminación. Los restos de pulpa, el tejido necrótico, las bacterias y los productos metabólicos bacterianos que permanecen en áreas inaccesibles de un sistema de conductos limpio y con conformación pueden iniciar y/o perpetuar una lesión si los mecanismos de defensa del hospedador son incapaces de eliminarlos (19).

En conclusión, el mejor pronóstico para el tratamiento endodóncico se basa en una adecuada instrumentación y obturación homogénea en todo el sistema de conductos radiculares y el peor pronóstico está relacionado con la instrumentación y obturación más allá de esta (19).

Por lo tanto, el éxito del tratamiento endodóncico depende de la calidad de la terapia del conducto radicular a corto plazo y de la calidad de la restauración coronal resultante a largo del tiempo. Sí las preparaciones mínimamente invasivas, la irrigación que juega un papel importante a la desinfección del conducto radicular, y la restauración post-endodóncica se llevan a cabo de manera adecuada, dará lugar a un tratamiento endodóncico exitoso, sin embargo, en general, el control microbiano durante y después del tratamiento de conductos sigue siendo la principal razón de éxito a largo plazo para los órganos dentarios tratados endodóncicamente (20).

2.2.4. PROBLEMAS DURANTE LA OBTURACIÓN

Por ser parte del último paso para concluir el tratamiento de conductos radiculares, la obturación, puede conllevar al fracaso del tratamiento si no se limitan algunas contraindicaciones que se deben tener en cuenta y evitar así problemas durante la obturación.

Los problemas durante la obturación como lo son, una longitud inadecuada, formación de huecos, eliminación insuficiente de los materiales de obturación y cronología inadecuada, pueden corregirse si se realizan de manera adecuada las estipulaciones a seguir durante este paso (11).

Es importante recalcar entonces, que se deben de realizar de manera ordenada y obligatoria los objetivos para llenar por completo el sistema de conductos radiculares una vez finalizado el proceso de limpieza y conformación del conducto, para que así, eliminado el espacio anteriormente ocupado por la pulpa dentaria, impedir que se transforme este espacio, en el refugio ideal para los microorganismos (11).

Todos los espacios del conducto radicular ya preparado, deben llenarse correctamente, evitándose así, una posible recontaminación y es por esto que en la literatura se encuentran numerosos trabajos donde han investigado los problemas que puede ocasionar que no lleve a cabo una buena obturación en el tratamiento de conductos, como el trabajo de Holland y colaboradores, en donde se comprobó, con tubos de dentina implantados en tejido conjuntivo, una reacción inflamatorio intensa, cuando había espacios vacíos de 4 – 8 mm (21).

Estas zonas que no han sido llenadas de manera correcta en el proceso de la obturación, pueden llenarse de microorganismos y de líquidos de los tejidos y representar agentes irritantes para los tejidos periapicales (21).

2.2.5. FILTRACIÓN

Durante el proceso de limpieza y conformación, existe la posibilidad de que queden restos de materiales orgánicos de la pulpa y restos inorgánicos de la dentina, donde se acumulan en la pared del conducto y producen una capa de barrillo dentinario irregular y amorfo. Como se demostró en un estudio, la capa de barrillo dentinario es superficial, con un espesor de 1 a 5 μm , y estos detritos superficiales pueden ser empaquetados en los túbulos dentinarios hasta distancias variables (22).

Sí quedan estos restos, estarán presentes en el barrillo dentinario y como consecuencia pueden constituir al sustrato para el crecimiento de las bacterias que se propaguen en cuestión de tiempo (23). Se ha analizado que esta capa impide la adhesión ideal entre el cemento sellador con la pared del conducto radicular al momento de que se realice una obturación, y permite así, las filtraciones (22).

Otro estudio señaló que la acción capilar y la dinámica de los fluidos interpretaban un papel importante en la introducción de restos en los túbulos dentinarios (24). Así como otra investigación encontró una penetración media de 479 μm después de un periodo de incubación de 28 días demostrando la modificación del éxito endodóncico (25).

De igual manera, al no eliminarse estos restos de barrillo dentinario en el sistema de conductos, crean la posibilidad de reinfección de los túbulos dentinarios si se producen filtraciones (26).

Anteriormente se mencionó que el papel de la obturación es impedir la colonización e invasión de microorganismos en los tejidos adyacentes y controlar su potencial de virulencia (11). En el espacio conformado para el material que se colocará, debe impedir la presencia de fluido tisular y de microorganismos. Así, en conjunto, este fluido, en contacto con el cemento endodóncico, puede solubilizarlo y permitir la infiltración en el sistema de conductos (20).

2.2.5.1. Fracaso endodóncico

Al no respetarse la anatomía del conducto radicular al momento de limpieza y conformación del sistema de conductos o no llevarse a cabo las medidas necesarias para poder obturar de manera adecuada y concluir el tratamiento de conductos, se puede llevar al fracaso de la pieza dental, conduciéndolo a la patología de periodontitis apical (20).

La respuesta de los tejidos perriradiculares a las distintas agresiones por causa de que no se lleve a cabo una buena desinfección del conducto radicular o no se lleve a cabo cualquiera de las tres fases de la triada endodóncica es similar a los otros

tejidos conjuntivos de otras partes del cuerpo. La respuesta se manifiesta como una reacción inflamatoria regulada por mecanismos inmunitarios innatos y de adaptación. Aunque la infección microbiana de la pulpa en los conductos radiculares es la causa más importante de la periodontitis apical, los cambios histopatológicos que presentan los tejidos subyacentes no suelen ser de microorganismos, si no de toxinas y productos metabólicos nocivos desintegrados, siendo estas, capaces de producir una respuesta inflamatoria muy variadas a los tejidos (4).

La periodontitis apical puede tener un carácter protector o destructor, y dependerá de la interacción entre las bacterias y la defensa del huésped en los tejidos periapicales (20).

Sí se eliminan eficazmente los microorganismos del sistema de conductos radiculares o se sepultan con el material de obturación dentro del conducto radicular, y se sella adecuadamente el sistema de conductos para protegerlo de microfiltraciones, se repararán los tejidos perirradiculares y conllevarán al éxito a la terapia endodóncica. Sin embargo, la presencia de periodontitis apical postratamiento puede deberse a la persistencia de bacterias a lo que ha conllevado a muchísimas investigaciones científicas hablar con respecto este tema (4).

En un estudio epidemiológico se demostró que la prevalencia de la periodontitis apical varía entre los pacientes de 20-30 años (33%), 30-40 años (48%), 50-60 años (75%) y mayores de 60 años (62%) (27).

Sin embargo, la etiología, patogenia y la anatomía patológica de la periodontitis apical son muy variables, a pesar de que se deben a una infección bacteriana e implican cambios histopatológicos en las zonas adyacentes como lo son el hueso alveolar, el ligamento periodontal y cemento radicular (28).

La periodontitis apical puede deberse a factores exógenos y endógenos. Entre los factores exógenos cabe destacar las bacterias y sus toxinas y sus subproductos metabólicos nocivos, los agentes químicos, la irritación mecánica, los cuerpos extraños y los traumatismos. Entre los factores endógenos destacan los productos

metabólicos del huésped, como los cristales de urato y colesterol, así como las citocinas y otros mediadores inflamatorios que activan los osteoclastos. Estos irritantes pueden inducir a respuestas inmunoinflamatorias innatas y adaptativas, respectivamente (28).

Es entonces donde se entiende que la patogenia de la periodontitis apical, aparte de implicar respuestas innatas y adaptativas, induce a una respuesta de los nervios sensitivos de los tejidos periapicales (29).

La entrada en los tejidos periapicales de toxinas, enzimas y subproductos metabólicos nocivos bacterianos o a la invasión directa de los tejidos periapicales por microorganismos son procedentes del sistema de conductos radiculares (30). Conforme la inflamación pulpar se va desarrollando e invadiendo tejidos adyacentes a este, empiezan a alterarse la fisiología de los tejidos periapicales (31).

La simple presencia de bacterias y colonización de estas no solamente en los conductos radiculares, si no, que conlleven a estar presentes en los tejidos perirradiculares no implica una infección perirradicular, sin embargo, esta depende tanto de la virulencia como del número y combinaciones específicas de microorganismos presentes en los tejidos periapicales (32).

Las agresiones físicas (exceso de instrumentación, sobreobtención) y químicas (irrigantes, medicación intraconducto, materiales de obturación radicular) y los daños traumáticos sufridos por los tejidos periapicales pueden causar también periodontitis apical. De igual manera, se ha comprobado que los cuerpos extraños como material de obturación en los tejidos adyacentes pueden presentar inflamación periapical persistente conduciendo a problemas de abscesos o trayectos sinusales de drenaje (33).

Se ha demostrado histológicamente que la enfermedad periodontal podría causar enfermedad inflamatoria pulpar y periapical (34).

2.3. MICROBIOTA ENDODÓNTICA

La periodontitis apical, es, esencialmente una enfermedad inflamatoria de etiología microbiana que se debe principalmente a una infección del sistema del conducto radicular (35).

A pesar de la existencia de algunos factores químicos y físicos que pueden desarrollar este tipo de problemas, los datos científicos demuestran que la infección endodóntica es esencial para que se desarrolle la periodontitis apical (36).

Se ha observado en diferentes estudios que la principal presencia de microorganismos, como lo son las bacterias, y estas habitan en el sistema de conductos radiculares, se propagan alrededor de los tejidos adyacentes del órgano dental infectado causando la periodontitis apical y su posterior exhaustiva lucha entre estos para combatirlos y dejar un ambiente libre de bacterias (37–39).

A medida que se va desarrollando el proceso infeccioso endodóntico dentro del conducto radicular, se pueden observar colonias de bacterias organizadas en forma de biopelículas localizándose adheridas en las paredes del conducto (40).

De primera instancia, las bacterias entran en contacto con los tejidos perirradiculares por medio de forámenes apicales o laterales de la raíz radicular. Después, las bacterias tienen un encuentro con la defensa del huésped y producen reacciones inflamatorias, dando paso al desarrollo de la periodontitis apical (41).

2.3.1 MICROORGANISMOS RESISTENTES EN EL SISTEMA DE CONDUCTOS

Por ser la cavidad oral un lugar en donde se albergan las más altas acumulaciones de microorganismos en el cuerpo humano, se calculan en estudios unos 10,000 millones de células bacterianas y que dan paso a tener afectaciones en el sistema de conductos radiculares contaminándolo (42).

Así mismo, las infecciones endodónticas se desarrollan en un lugar previamente estéril que no contiene una microbiota normal, generalmente dependiendo del estado en el que se encuentre la pulpa dental proporcionara a las bacterias un

entorno húmedo, caliente, nutritivo y anaerobio en el que se podrán desarrollar adecuadamente en un ambiente favorable para su crecimiento y propagación alrededor del sistema de conductos radicular (43).

Por ser este, un proceso dinámico, dominan diferentes especies en cada una de sus fases, siendo los microorganismos que se localizan en la región apical los más resistentes en el sistema de conductos ya que esta zona cuenta con características significativas; como el no contar con tanta tensión de oxígeno y ser una zona menos accesible a las medidas del tratamiento endodóncico, favoreciendo a las condiciones para que habiten las bacterias de carácter anaerobio (43).

Aunque en el conducto radicular pueden encontrarse bacterias planctónicas suspendidas en una fase líquida e integradas en el tejido pulpar necrótico, la mayoría de las bacterias que colonizan el sistema de conductos radiculares suelen proliferar en biopelículas de múltiples especies sésiles adheridas a las paredes de la dentina. Es frecuente ver como las bacterias que se encuentran en este estado penetren los túbulos dentinarios produciendo posteriormente infección hasta en un 70 – 80 % de los casos presentados con lesiones de periodontitis apical (40).

Se ha demostrado que son varios los posibles patógenos endodóncicos que pueden penetrar en los túbulos de dentina in vitro, como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israeli*, *Propionibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y *Streptococcus* (44–46).

2.3.2. ENTEROCOCCUS FAECALIS

A pesar de la exhaustiva limpieza y conformación del conducto radicular, aún puede ser insuficiente para eliminar por completo las bacterias existentes en el sistema de conductos.

Existe un número bastante amplio de cocos gran positivos catalasa- negativos reconocidos como patógenos del ser humano y estos a su vez, han aumentado en el número de apariciones en los conductos radiculares como el *Enterococcus*

Faecalis. Estos, son los aislados que más a menudo y con mayor frecuencia se ven implicados en combatirlos dentro de los tratamientos endodóncicos por cumplir con características de ser resistentes a ambientes sin oxígeno, y por su localización son de difícil eliminación (47).

A lo largo de los distintos estudios epidemiológicos que se encuentran en revisiones científicas, se ha encontrado a esta especie, *E. faecalis*., como la especie más frecuente en el conducto radicular y los dientes tratados, con prevalencias que elevan hasta el 90% de los casos (48–51).

El conducto radicular sin tratarse endodóncicamente y los dientes tratados tienen nueve veces más probabilidades de contener esta especie que los casos con infecciones, lo que nos conlleva a entender que se podría inhibir por un conjunto de especies bacterianas mixtas que habitualmente se observan en las infecciones y cuya supervivencia no sería un impedimento ambiental dentro del sistema de conductos obturados (48).

Esta especie, por ser encontrada en dientes donde endodóncicamente han sido ya tratados, indica que puede ser un invasor secundario que tiene éxito a la hora de colonizar el conducto y es resistente al tratamiento endodóncico (52).

El *E. faecalis* se considera una especie transitoria en la cavidad oral; su fuente puede ser el alimento (53).

De igual forma, tiene la capacidad de penetrar en los túbulos dentinarios, a veces hasta zonas muy profundas en donde se muestra resistente a los procedimientos de desinfección y preparación biomecánica dentro del conducto radicular y así se adapta a ese nuevo medio de supervivencia donde, además, tiene capacidad de formar biopelícula, siendo este un factor muy importante para su resistencia y persistencia después de los procedimientos antimicrobianos intraconducto (54). También otra de las características que muestra el *E. faecalis* es su resistencia al hidróxido de calcio (55). Esta capacidad de resistencia a los valores incrementados de pH está en relación con una bomba de protones funcionante que dirige a estos

hacia la célula con el potencial de acidificar su citoplasma. En otros estudios se ha encontrado al *E. faecalis* resistente a entornos con escasez de nutrientes y después vuelve a proliferar cuando se restablece la fuente de nutrientes (56). Asimismo, se han encontrado recuperados después de un estado prolongado de ayuno en los conductos ya obturados, lo que indica que las células de esta especie quedan sepultadas en el momento de obturación del conducto radicular, pero con la capacidad de crear un nicho de supervivencia a largo plazo, conduciendo una futura infección (Figura 2) (57).

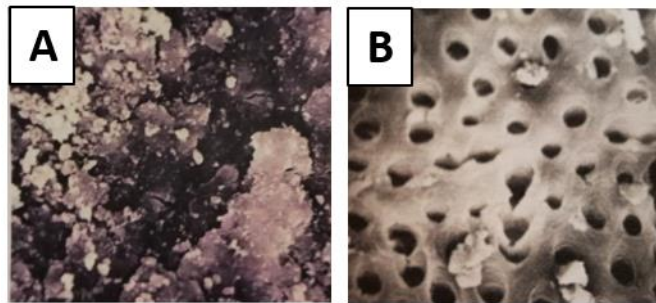


Figura 2. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de pared del conducto radicular.

*El análisis SEM muestra los túbulos dentinarios cubiertos de capa de barrido irregular y amorfo con partículas de *E. faecalis* (A), mientras que una vez que se realiza la desinfección del conducto radicular (B) se observan la apertura de los mismos de 1-5 μm (11).*

En conjunto, todas estas características explican la prevalencia de encontrarse con esta especie en el sistema de conductos radiculares y los dientes ya tratados endodómicamente. Su causa aún es desconocida, pero gracias a estudios epidemiológicos se ha comprobado de ser el principal causante de los fracasos endodóncicos (58).

2.4. CARACTERÍSTICAS DE UN CEMENTO SELLADOR IDEAL

Después de la preparación biomecánica del conducto radicular, el cemento sellador desempeña un papel muy importante, ya que, gracias a este, es capaz de sellar las irregularidades que existan entre el material obturador (gutapercha) y las paredes del conducto radicular. Es importante que el cemento sellador, cumpla con los requisitos necesarios para poder llevar a cabo el papel importante con el que debe actuar dentro del sistema de conductos, y así mismo seguir con los postulados de Grossman (1987); los cuales son los siguientes:

1. Debe ser homogéneo, al ser manipulado, para suscitar buena adhesividad entre él y las paredes del conducto, una vez endurecido.
2. Debe producir un sellado hermético.
3. Debe ser radiopaco, para ser visualizado en la radiografía.
4. Las partículas del polvo deben ser bien finas, para que se mezclen fácilmente con el líquido.
5. No debe experimentar contracción después de su endurecimiento.
6. No debe manchar la estructura dentinaria.
7. Debe endurecer lentamente.
8. Debe ser bacteriostático o, por lo menos, no facilitar el desarrollo bacteriano.
9. Debe ser insoluble ante los fluidos bucales.
10. Debe ser bien tolerado por los tejidos, o sea, no debe provocar irritación de los tejidos periapicales.
11. Debe ser soluble a los solventes comunes, en caso de que sea preciso remover la obturación del conducto radicular (3).

La unión de diferentes propiedades en un mismo material, específicamente la adhesividad y la compatibilidad biológica, aún representa un ideal prometedor. Es por esta razón que los diferentes tipos de cementos selladores para la obturación de un tratamiento endodóncico han sido analizados desde varios aspectos, y se han visto reflejado en diferentes estudios científicos sus capacidades del comportamiento biológico, así como su aspecto físico- químico, los aspectos

antimicrobianos y clínicos para poder concluir cual es el más favorable de entre ellos (59).

2.5. TIPOS DE CEMENTOS SELLADORES CONVENCIONALES

Los cementos selladores más populares y clásicos que han sido utilizados a lo largo de los años son de formulaciones de óxido de zinc-eugenol, hidróxido de calcio, ionómeros de vidrio y resinas (epoxídicas o de metacrilato). A continuación, se harán mención de cada uno de estos.

2.5.1. Óxido de zinc y eugenol



Figura 3. Cemento sellador óxido de zinc y eugenol.

Este tipo de cementos selladores se han utilizado durante mucho tiempo y han demostrado una gran eficacia en la terapia endodóncica.

Se caracterizan por experimentar reabsorción si pasan a los tejidos perirradiculares, lo cual esto es de gran ventaja al momento de seleccionar el material ideal para la obturación del sistema de conductos. También demuestran tener un tiempo de fraguado largo (60), se contraen al fraguar y muestran disolverse (61), sin embargo, una desventaja que se le pudiera atribuir a este grupo de cementos selladores es la capacidad de teñir la estructura dental (62).

Este tipo de cementos selladores ha sido de gran utilidad por contribuir de manera favorable a poseer gran capacidad de actividad antimicrobiana (63,64).

Rickert y Dixon introdujeron uno de los primeros cementos selladores a base de óxido de zinc-eugenol (Figura 3). Este producto se presentó en forma de polvo y de

líquido y contenía partículas de plata para aportar radiopacidad, es por esto que, si no se eliminaba por completo el material, presentaba consecuencias de teñir la estructura dental (65).

Posterior a esta presentación, Grossman modificó en 1958 la composición e introdujo una formulación que no producía tinción (cemento sellador de Roth) lo cual, dio mejores resultados al momento de su utilización (1).

2.5.2. Selladores de hidróxido de calcio



Figura 4. Cemento sellador hidróxido de calcio Sealapex.

En su creación de este tipo de cementos selladores, su enfoque de diseño se realizó para ofrecer actividad terapéutica (66). Se creía que este tipo de material podrían tener actividad antimicrobiana y quizá podrían tener potencial osteógeno – cementógeno (Figura 4). Pero por desgracia estas acciones no han sido demostradas. Como desventaja que en este tipo de sellador se observa es la necesidad de solubilidad para liberación de hidróxido de calcio y así este pueda mantener su actividad, por lo que es una propiedad que está en desacuerdo con el objetivo de los cementos selladores (67).

2.5.3. Selladores sin eugenol



Figura 5. Cemento sellador sin eugenol.

Su desarrollo parte de un apósito periodontal, Nogenol es un sellador del conducto radicular, sin los efectos irritantes del eugenol (Figura 5). La base contiene óxido de zinc, sulfato de bario y oxiclورو de bismuto (64).

2.5.4. Selladores de ionómero de vidrio

En este tipo de cementos selladores, se han aconsejado su uso para la obturación del sistema de conductos debido a sus propiedades de adhesión a la dentina. Estos, permiten la adhesión entre el material y la pared del conducto (Figura 6). También es difícil tratar adecuadamente las paredes dentinarias en los diferentes tercios que el sistema de conductos radiculares presenta, es por eso que muestran como desventaja la eliminación del mismo si es necesario repetir el tratamiento (68).

Otro inconveniente es que presenta una actividad antimicrobiana mínima. En un estudio de filtración bacteriana que comparaba el sellador de ionómero de vidrio Activ GP, Resilon/Epiphany y gutapercha (GP) / AH Plus no halló diferencias estadísticamente significativas a los 65 días (69).



Figura 6. Cemento sellador de ionómero de vidrio Ketac - Endo.

2.5.5. Selladores de resina

Los cementos selladores a base de resina, se han utilizado desde mucho tiempo atrás, ya que proporcionan adhesión y no contienen eugenol. En este tipo de cementos, existen dos categorías principales los cuales se describirán a continuación:

2.5.5.1. Selladores de resinas epoxídicas



Figura 7. Cementos de resina epoxídica AH Plus.

AH-26 es una resina epoxídica de fraguado lento que libera formaldehído al fraguado (Figura 7). Sin embargo, años después se introdujo en el mercado AH Plus, que tenía una modificación de no liberar formaldehído (70). Sus propiedades parecen ser comparables. Ambos cementos selladores tienen un tiempo de trabajo de 4 horas, pero AH Plus es un sistema a base de amina y resina epoxídica, que, al momento de dar lugar al fraguado, no libera ningún producto de modo que los componentes de la reacción se consumen completamente (71). Estudios científicos a largo plazo muestran buenos resultados de biocompatibilidad en este cemento (36).

2.5.5.2. Selladores de resinas de metacrilato

En este tipo de cementos selladores, a lo largo del tiempo se han comercializado cuatro generaciones a base de resinas de metacrilato para su uso comercial:

2.5.5.2.1. Primera generación: Hydron

Apareció en los años setenta, cuando las bases científicas para la unión de resina estaban en sus fases iniciales de desarrollo. Fue diseñada para la obturación de

raíces (72). A lo largo de los años, este tipo de cementos selladores adherentes de los conductos han sido objeto de una agresiva promoción comercial, con la propiedad deseable de la realización de monobloques en el espacio del conducto radicular. El término monobloque alude al escenario propio en el que el espacio del conducto se obtura perfectamente con una masa sólida sin huecos formada por diferentes materiales e interfaces, con las supuestas ventajas de mejorar el sellado y ofrecer al mismo tiempo resistencia a la fractura en los conductos obturados (73).

2.5.5.2.2. Segunda generación: Hidrófilo y sin grabado.



Figura 8. Cemento sellador de resina de metacrilato EndoREZ.

En este tipo de cementos selladores, no es necesario el grabado ni el uso auxiliar de un adhesivo de dentina para su funcionalidad. Por su diseño de facilidad de fluidez en los conductos accesorios y túbulos dentinarios, ayudan a facilitar la formación de interdigitaciones de resina para la retención del sellado después de la completa desinfección y trabajo biomecánico dentro del sistema de conductos (71). Por la propiedad del EndoREZ de ser hidrófilo, hace que se pueda reutilizar en el entorno húmedo del sistema de conductos radiculares y ser muy eficaz a la hora de penetrar en los túbulos dentinarios y formar largas interdigitaciones de resina (Figura 8) (74).

Un estudio clínico y radiológico retrospectivo en donde se evaluó los resultados terapéuticos tras la utilización de este tipo de cementos selladores a lo largo de 10 años, comunico una posibilidad de éxito acumulada del 92.1% después de 10 años tras la realización del tratamiento de conductos (75).

2.5.5.2.3. Tercera generación: Imprimadores de autograbado



Figura 9. Cemento sellador de resinas de metacrilato 3era. generación.

Esta generación de cementos selladores se popularizó después de la introducción del Resilon, un material termoplástico de obturación radicular a base de policaprolactona que contiene dimetacrilato, al igual que estos que constan de una aplicación del imprimador de autograbado y metacrilato hidrófilo, así como también contiene un disolvente resinoso para ajustar la viscosidad del sellador (Figura 9) (76).

2.5.5.2.4. Cuarta generación: MetaSEAL, RealSeal SE (autoadhesivos)



Figura 10. Cemento sellador de resinas de metacrilato metaSEAL.

Estos cementos selladores disponen de una combinación de un grabador, un imprimador y un sellador en un producto adhesivo único autoadhesivo y de autograbado, lo cual hacen que su utilización sea muy beneficiaria, ya que reduce el tiempo de aplicación y los errores que pueden producirse en cada etapa de unión (Figura 10) (77).

2.5.6. Selladores de silicona



Figura 11. Cemento sellador de silicona RoekoSeal.

RoekoSeal es un polivinilsiloxano que se expande ligeramente al fraguar (Figura 11) (78). Las pruebas que se han realizado a la utilización de estos cementos selladores sugieren que el material llena las irregularidades del conducto con consistencia y es biocompatible, aunque el tiempo de fraguado podría alentarse por la acción de la irrigación final con un hipoclorito de sodio. La capacidad de sellado es comparable a otras técnicas en algunos estudios e inferior en otros (79,80).

2.5.7. Selladores de silicato de calcio



Figura 12. Cemento sellador de silicato de calcio.

Desde fechas recientes, se ha dispuesto realizar este cambio en la familia de los cementos selladores convencionales y dar un giro en una nueva categoría basada en agregado de trióxido mineral (MTA), lo que hace llamativo a este tipo de material es que se basan en silicato de tricalcio, un polvo hidráulico (fraguado en agua) que se utiliza en diversos tratamientos quirúrgicos y de la pulpa vital (Figura 12).

También se ha encontrado atractivo este tipo de cementos ya que son de carácter hidrófilo (81).

Gracias a la publicación del Dr. Witte, en 1878, empleo cemento Portland para obturar los conductos radiculares. Los materiales a base de silicato de tricalcio no se hicieron comunes en la práctica hasta los noventa, cuando se introdujo el MTA (82).

El MTA es un polvo activo hidráulicamente compuesto de silicato de tricalcio, silicato de dicalcio y un polvo radiopaco, a menudo óxido de bismuto. Debido a la tinción de la dentina coronal que este último material provoca, se ha sustituido por otros. De igual manera, es importante este componente ya que sin el, no se podría apreciar fácilmente en una radiografía el material empleado en el tratamiento (83).

El tiempo de fraguado de los cementos de silicato de tricalcio es largo, 165 minutos para el fraguado inicial, mientras que consta de 6 horas para el final, lo que ha desfavorecido su uso en algunas indicaciones, pero no para su empleo como sellador (81).

En la actualidad existen cuatro selladores comunes en el mercado de silicato de tricalcio: MTA Fillapex (84), iRoot SP (conocido también como EndoSequence BC) (83), Endo CPM Sealer (85), y MTA Plus (86).

2.5.8. Selladores con productos químicos



Figura 13. Cemento sellador con productos químicos, Endomethasone.

Su característica principal en este tipo de cementos selladores es su contenido de paraformaldehído, lo cual están contraindicados en endodoncia. Este tipo de cementos selladores no están aprobados por la Food and drug Administration estadounidense y son inaceptables en todas las circunstancias en el tratamiento clínico debido a los efectos tóxicos graves y permanentes sobre los tejidos perirradiculares (87). Por ser de naturaleza tóxica este material, se han encontrado estudios en donde comunican neurotoxicidad irreversible, manifestada por disestesia, en casos donde las pastas de paraformaldehído fueron forzadas por el agujero apical a los tejidos periapicales (88,89). Entre los cementos selladores con paraformaldehído se incluyen Endomethasone, SPAD y pasta Reibler, en donde de igual manera, se han comprobado en estudios in vivo sobre la pulpa y los tejidos periapicales las consecuencias de toxicidad en su uso (Figura 13) (90).

2.6. CEMENTOS SELLADORES BIOCERÁMICOS

Hoy en día la selección del material de obturación ha cambiado significativamente con la aparición de los cementos selladores biocerámicos. Este tipo de cementos incluyen dentro de sus componentes alúmina, zirconio, vidrio bioactivo, vidrios cerámicos, hidroxiapatita y fosfatos de calcio reabsorbibles (15). Las categorías que se le otorgan a los materiales biocerámicos son: **i) Bioinertes:** capaces de rellenar tejidos y ser tolerados por el organismo, **ii) Bioactivos:** tolerados por el organismo con capacidades de osteoconducción, **iii) Biodegradables:** con capacidad de ser degradados en ambiente biológico y reemplazado por hueso (91). Los cementos selladores a base de silicato tricálcico fraguan por reacción con el agua y forman una mezcla altamente alcalina (pH de ca. 12) formada por una matriz rígida de hidratos de silicato de calcio e hidróxido de calcio. Cuando el cemento de silicato tricálcico fragua, el cambio dimensional es inferior a una expansión del 0.1%, lo que ayuda a crear una barrera, siendo esto especialmente importante en endodoncia (92).

2.6.1. VENTAJAS DE CEMENTOS SELLADORES PREMEZCLADOS

A fines de la década de los 60, algunos investigadores como Hench y cols. (2), observaron que varios vidrios y cerámicas tenían la capacidad de adherirse al tejido óseo vivo, creándose un nuevo material llamado “Bioglass”. Las investigaciones siguieron avanzando y a fines de la década pasada se descubrieron los materiales bioactivos, con aplicación tanto en medicina como en odontología. Poseen propiedades osteoconductoras, ausencia de toxicidad, químicamente estables y son biocompatibles (9, 22, 14).

Los beneficios que aportan los cementos selladores biocerámicos al ser en forma premezclada es mayor estabilidad a comparación de cementos selladores convencionales, no sufren contracción de fraguado por contar ya con medidas estipuladas del fabricante a su manipulación. Otra característica es que poseen en su capacidad de producir hidroxiapatita durante su proceso de fraguado, generando un enlace químico entre la dentina y el material de obturación. Presentan además un pH muy alcalino durante las primeras 24 horas de fraguado (elevada actividad antibacteriana), fácil manejo para el odontólogo gracias a su jeringa premezclada, introduciéndose así directamente dentro del conducto radicular y cuentan con un tiempo de trabajo aproximado de 3 a 4 horas a temperatura ambiente (14).

Algunos de los cementos selladores biocerámicos que podemos encontrar en el mercado son: EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer.

2.6.2. CEMENTO SELLADOR BIOCERÁMICO ENDOSEQUENCE BC SEALER



Figura 14. Cemento sellador biocerámico EndoSequence BC Sealer.

II. INTRODUCCIÓN

El cemento sellador biocerámico EndoSequence BC Sealer está compuesto de silicatos de calcio, óxido de zirconio, óxido de tantalio, agentes espesantes monobásicos de fosfato de calcio y rellenos patentados (Figura 14). La intención de su fabricación es superar algunas de las difíciles características de manejo del agregado de trióxido mineral; tales como su manipulación al mezclado, ya que los cementos selladores anteriormente eran fabricados con características de ser en forma polvo-liquido, por lo que a la manipulación inadecuada del odontólogo y no respetar las proporciones adecuadas del fabricante al mezclarlo, podrían quedar porosidades en la mezcla o una solución más acuosa de lo estipulado, a lo que da como resultado un tiempo de fraguado que disminuye las condiciones exitosas del material o la existencia de la extrusión de material por el orificio del foramen apical del sistema de conductos afectando a los tejidos adyacentes del diente y contribuyendo de una manera adversa sobre la cicatrización de los mismos. La casa comercial fabricante de este material afirman que la masilla de EndoSequenceBC Sealer premezclada tiene un tiempo de trabajo de aproximadamente de más de 30 minutos, una reacción de fraguado iniciada por la humedad y un fraguado final logrado aproximadamente 4 horas más tarde con la porción de silicato de calcio del material, dando como resultado la producción un gel de hidrato de silicato de calcio e hidróxido de calcio. El hidróxido de calcio luego interactúa con los iones fosfato para formar hidroxiapatita y agua (93).

También es importante mencionar que gracias a las propiedades favorables de EndoSequenceBC Sealer, como la hidrofilia, leve fraguado, la expansión y la biocompatibilidad permiten su uso en una técnica de cono único y podrían crear un sellado mejorado del sistema de conducto radicular. Esta técnica mejora la eficiencia clínica de la obturación del conducto radicular y posteriormente puede traducirse en una tasa de éxito mejorada de la terapia endodóncica (94).

2.6.3. CEMENTO SELLADOR BIOCERÁMICO EDGEBIOCERAMIC SEALER



Figura 15. Cemento sellador biocerámico EndoSequence BC Sealer.

El EdgeBioceramic Sealer presenta una fórmula única biocerámica sin resina que lo hace altamente biocompatible e hidrófilo ya que libera activamente iones de calcio al momento de su utilización y mezclado adecuado (Figura 15). A diferencia de los cementos selladores que anteriormente se utilizaban, este tiene una característica importante; no se contrae, por lo tanto, no es necesario compactar la gutapercha, por lo que simplemente con impregnar las paredes del sistema del conducto radicular es suficiente para su efectividad. Este cemento es antibacteriano por su alcalinidad (pH 12). Además, el EdgeBioceramic Sealer presenta un flujo ideal, que es consistente con la norma ISO 6786 /2001 y tiene un tiempo de trabajo de 4 horas (95).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso seguro de los cementos endodóncicos requiere de la caracterización exhaustiva de su actividad biológica previo a su aplicación clínica. De especial interés es la evaluación de la citocompatibilidad ya que es imprescindible para evitar reacciones adversas que incluyen toxicidad, alergia o carcinogenicidad, lo que en última instancia afecta el proceso de renovación de tejidos y conduce al desarrollo y/o mantenimiento de respuestas inflamatorias exacerbadas.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que los cementos endodóncicos interaccionan con los tejidos periapicales, ya sea por contacto directo o por difusión de sus componentes a partir del sistema de conductos radicular, evaluar su actividad biológica es fundamental para determinar su efecto potencial tanto en el sitio de acción como en los tejidos circundantes. Con base en lo anterior, el presente proyecto tiene por cometido caracterizar la citocompatibilidad de dos cementos selladores de nuevo lanzamiento al mercado, en particular EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer.

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 EdgeBioceramic Sealer y EndoSequenceBC Sealer.

CITOCOMPATIBILIDAD

5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)

Las células cultivadas en presencia y ausencia de lixiviados de los dos cementos objeto de estudio desplegarán porcentajes de viabilidad iguales, con un nivel de confianza del 95%.

5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Las células cultivadas en presencia de lixiviados de cualquiera de los cementos presentarán diferencia estadísticamente significativa en su viabilidad, ya sea con respecto a las células sin tratar o con respecto a las células cultivadas en presencia de lixiviados del otro cemento, con un nivel de confianza del 95%.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto de investigación es evaluar la citocompatibilidad de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer por ensayos *in vitro* a distintos tiempos.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Preparar pastillas de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer.
- II) Obtener muestras de lixiviados a partir de la incubación de las pastillas de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer en condiciones fisiológicas simuladas.
- III) Evaluar la citocompatibilidad de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer después de la exposición directa de sus lixiviados a células en cultivo a 24 y 48 h., a través de ensayos ELISA de acuerdo a la norma ISO: 10993.
- IV) Evaluar el pH de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer tras su inmersión en agua destilada a 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 8 y 16 días.
- V) Llevar a cabo análisis estadístico de los resultados obtenidos.

VII. VARIABLES

7.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

- 1) Tipo de cemento endodónico.
- 2) Tiempo de incubación en contacto con células MDA-MB-231 en cultivo.

7.2. VARIABLE DEPENDIENTE

- 1) Citocompatibilidad de los cementos endodónicos.

7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES

A los cementos objeto de estudio se les evaluará su citocompatibilidad. Para su análisis, las muestras serán preparadas siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La citocompatibilidad será caracterizada mediante ensayos de lixiviados de acuerdo a la norma ISO: 10993, a través de ensayos inmunoenzimáticos ELISA.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. TIPO DE ESTUDIO

Experimental

8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Para los ensayos de citocompatibilidad se evaluarán dos Sistemas y un Control (n=6):

Sistema 1: Lixiviados del cemento EdgeBioceramic Sealer.

Sistema 2: Lixiviados del cemento EndoSequenceBC Sealer.

Control: Células en cultivo sin tratar.

Para evaluar el cambio de pH se estudiaron cuatro muestras (n=2):

Muestra 1: Cemento EdgeBioceramic Sealer fraguado e inmerso en agua destilada.

Muestra 2: Cemento EdgeBioceramic Sealer sin fraguar e inmerso en agua destilada.

Muestra 3: Cemento EndoSequence BC Sealer fraguado e inmerso en agua destilada.

Muestra 4: Cemento EndoSequence BC Sealer sin fraguar e inmerso en agua destilada.

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

Los cementos endodóncicos empleados para este estudio fueron utilizados siguiendo las indicaciones del fabricante. El cemento sellador EdgeBioceramic Sealer fue de la marca EdgeEndo, (Albuquerque, New México). El cemento sellador

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

EndoSequence BC Sealer fue de la marca EndoSequence (Brasseler, USA). Se empleó una micro balanza analítica Pioneer de la marca Ohaus para estandarizar el peso de las muestras de cemento. Para permitir el completo fraguado de los cementos se empleó una incubadora modelo Symphony de la marca VWR. Para los ensayos de citocompatibilidad las células MDA-MB-231 fueron adquiridas de los Laboratorios American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) fue de la marca Corning. Se emplearon placas de cultivo de 96 pocillos (Costar, USA). Para la tinción celular se empleó una solución de cristal violeta al 0.1% compuesta por ácido fosfórico 200 mM, ácido fórmico 200 mM y ácido 2-(M-morfolino)-etanosulfónico (MES) 200 mM a pH 6. Se utilizó un agitador orbital (Rotomix, Type 48200). Para determinar la citocompatibilidad se empleó un Lector de microplacas iMark, BIO-RAD operando a una longitud de onda de 595 nm. Los lixiviados de cada muestra se obtuvieron en el interior de tubos falcón de 15 mL. Para la evaluación del pH se empleó agua destilada y tiras indicadoras de pH (Fermont). Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar de la marca Ulbrecht. Para la evaluación de la morfología celular se empleó un microscopio invertido (Olympus CKX53). Se utilizó un agitador Vortex (Vortex-2 gene digital Scientific industries).

Para la producción de lixiviados se utilizaron tubos falcón de 15 mL estériles, medio de cultivo DMEM con suplemento de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA, por sus siglas en inglés), 2 mM de L-Glutamina (L-Glu), 1 mM piruvato de sodio y 1% de penicilina-estreptomicina (pen-strep) y solución de 0.25% de tripsina-EDTA.

8.4. METODOLOGÍA

8.4.1. Preparación de las muestras

Los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer fueron preparados en forma de pastillas siguiendo las indicaciones del fabricante y depositados sobre una loseta de papel estéril. Posteriormente, para permitir el fraguado de los cementos, las losetas con los cementos fueron colocadas dentro de una caja de Petri de vidrio estéril que en su interior contenían una caja de Petri estéril de menor tamaño dentro de la cual se colocaron dos rollos de algodón estériles a los que se les agregó 3 mL de agua destilada estéril para mantener la humedad dentro del sistema que posteriormente fue sellado con Parafilm para evitar evaporación al entorno (Figura 16). Las pastillas de los cementos fueron incubadas a 37 °C por 1 día y 100% de humedad para permitir su completo fraguado (Figura 17).

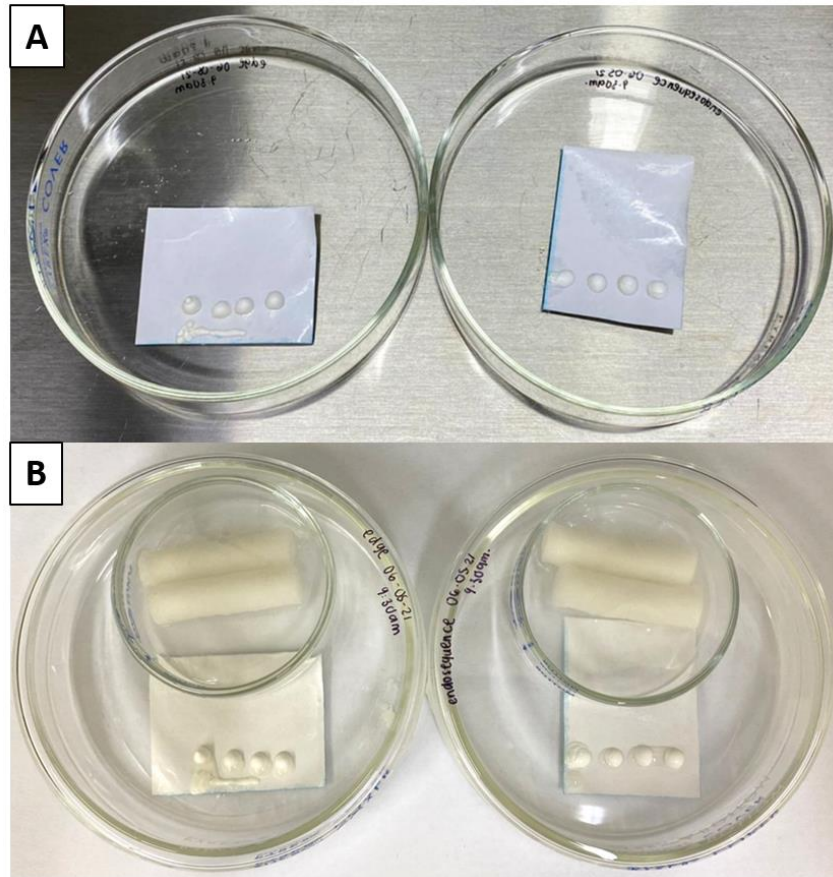


Figura 16. Fotografía de las muestras de cementos preparadas para su incubación.

En la Figura se observa A) las muestras de los cementos previo a su incubación y B) las muestras fraguadas después de 24 h.

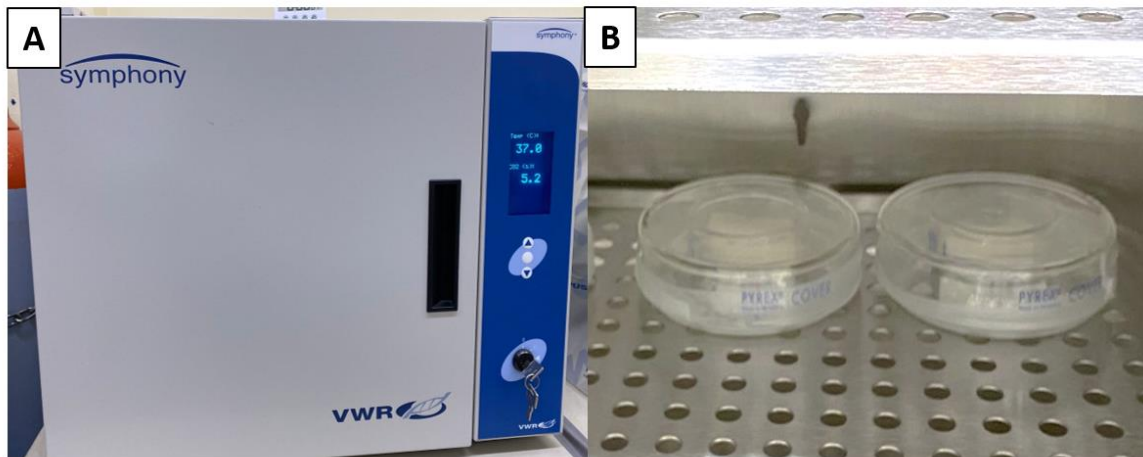


Figura 17. Incubación de las muestras por 24 h.

En la Figura se observa la incubadora con los parámetros de incubación requeridos (A) y dentro de este, se coloraron las muestras preparadas para su estudio (B).

Tras el fraguado de los cementos después de 24 h, las pastillas fueron pesadas en una microbalanza para estandarizar su peso a 29 mg.

8.4.2. Obtención de lixiviados en condiciones fisiológicas simuladas

Una vez estandarizados los pesos de las pastillas de los cementos fraguados (Sistemas 1 y 2), fueron depositadas en el interior de un tubo falcón de 15 mL estéril con 3 mL de medio de cultivo celular (DMEM), los tubos fueron posteriormente sellados con Parafilm e incubados en condiciones estáticas a 37 °C durante 7 días (Figura 18).

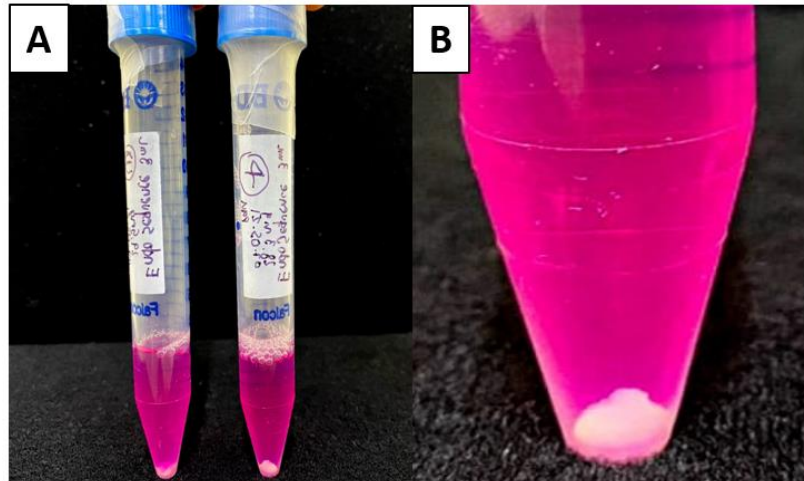


Figura 18. Fotografía de la muestra en contacto con medio de cultivo celular para la obtención de los lixiviados.

En la Figura A) se muestran los tubos falcón con las muestras de los cementos preparados en contacto con el medio celular, así como B) un acercamiento enfocado de la misma.

8.4.3. Evaluación de citocompatibilidad

8.4.3.1. Condiciones de cultivo celular

Para los ensayos de citocompatibilidad se empleó la línea celular MDA-MB-231 que fue cultivada en medio de cultivo DMEM con suplemento de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA, por sus siglas en inglés), 2 mM de L-Glutamina (L-Glu), 1 mM piruvato de sodio y 1% de penicilina-estreptomicina (pen-strep). La incubación de las células se realizó en condiciones de estándar de cultivo a 37 °C, 5% CO₂ y 100% de humedad. Una vez que las células alcanzaron una confluencia óptima del 80-90% fueron subcultivadas empleando una solución de 0.25% de tripsina-EDTA e incubadas en 4 min a condiciones estándar de cultivo. Las células fueron desprendidas de los frascos de cultivo y posteriormente resuspendidas en medio de cultivo fresco para ser sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 15,000 células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo celular e incubadas durante 24 h en condiciones de estándar de cultivo (Figura 19).

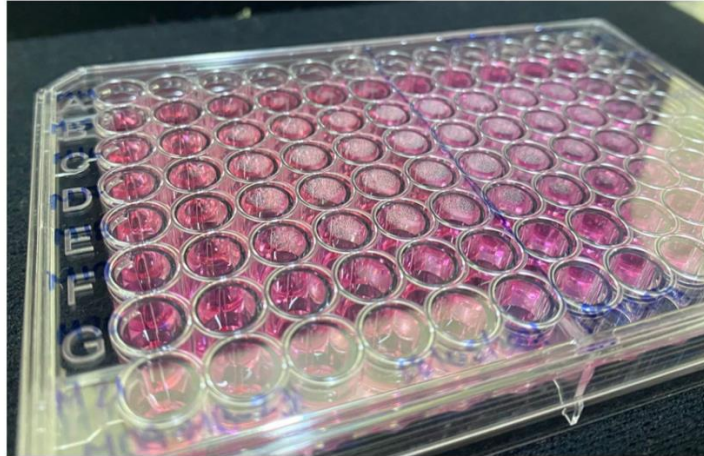


Figura 19. Células en placas de 96 pocillos.

8.4.3.2. Cultivo celular en presencia de los lixiviados

Después de 24 h de incubación de las células en las placas de 96 pocillos, se añadió 100 μ L de lixiviados de cada uno de los Sistemas de estudio ($n=6$). Posteriormente, las células fueron incubadas en presencia de los lixiviados a los tiempos de 24 y 48 h en condiciones estándar de cultivo. Transcurridos los tiempos de incubación las células fueron observadas bajo microscopia óptica para evaluar su morfología (Figura 20).

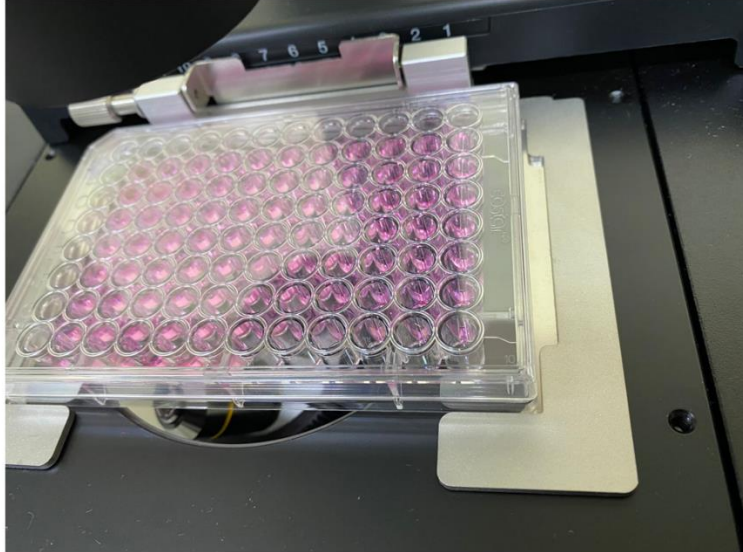


Figura 20. Fotografía de placa de 96 pocillos montada en la platina de microscopio óptico.

8.4.3.3. Tinción celular para ensayo colorimétrico ELISA

Transcurrido el tiempo de incubación de las células en presencia de los lixiviados (24 y 48 h), el medio de cultivo celular con los lixiviados fue aspirado de los pocillos. Posteriormente se añadieron 10 μ L. de glutaraldehído al 11% y se mantuvo en agitación orbital durante 15 min a temperatura ambiente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Después de este tiempo, se aspiró el glutaraldehído y se realizaron dos lavados con 100 μ L de agua destilada (Figura 21).

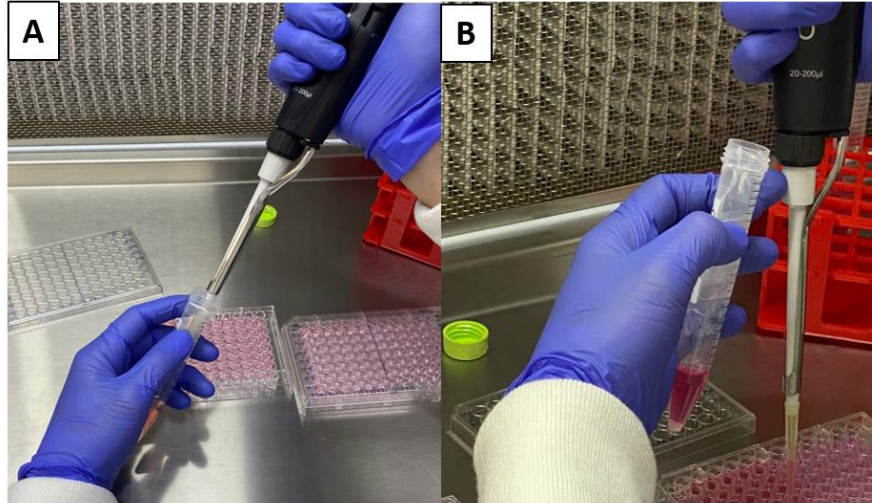


Figura 21. Obtención de los lixiviados.

En la Figura A) y B) se muestra el realizado de aspiración de glutaraldehído para los ciclos de lavado empleando 100 μ L de agua destilada.

A continuación, se realizó la tinción celular añadiendo 100 μ L de solución de cristal violeta al 0.1% y se mantuvo en agitación orbital durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se aspiró la solución de cristal violeta y se realizaron nuevamente dos ciclos de lavado empleando 100 μ L de agua destilada para remover el excedente de cristal violeta (Figura 22). Finalmente, las placas con las células teñidas se dejaron a temperatura ambiente durante 12 h en condiciones de obscuridad para permitir el completo secado de los pocillos.

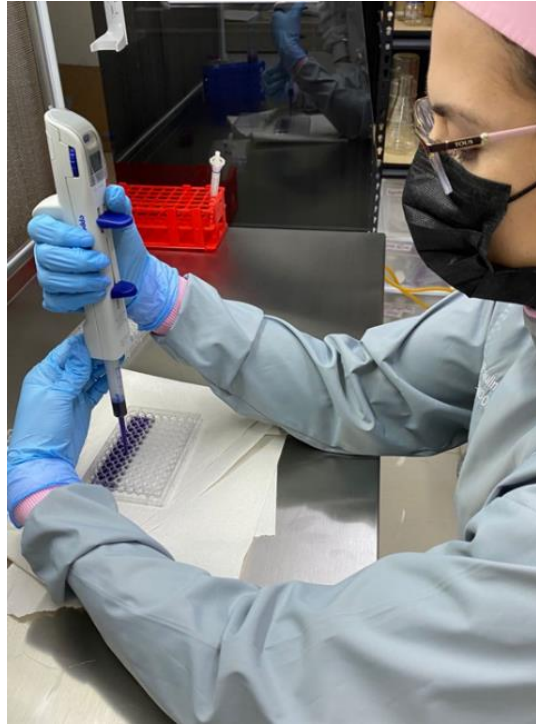


Figura 22. Lavado de los lixiviados con solución de cristal violeta.

Las muestras fueron lavadas con cristal violeta para su referente investigación.

Posteriormente, para realizar la medición en el lector de placas ELISA, el cristal violeta adherido a las células fue disuelto empleando una solución de ácido acético al 10% (100 μ L/pocillo) y se mantuvo en agitación orbital durante 15 min a temperatura ambiente (Figura 23). La lectura de absorbancia de las muestras se realizó a una longitud de onda de 595 nm (Figura 24).

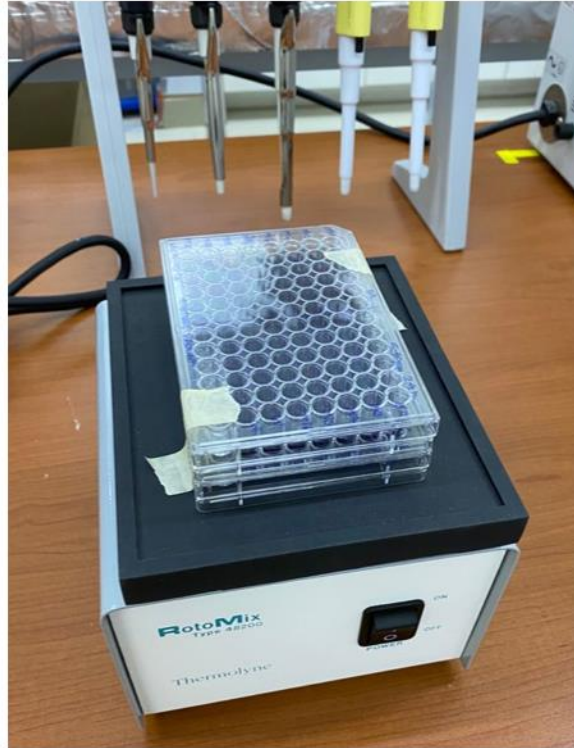


Figura 23. Agitación orbital de caja de 96 pocillos.



Figura 24. Lector de placas para determinar la citocompatibilidad de las muestras.

El porcentaje de citocompatibilidad de los Sistemas de estudio se calculó empleando la siguiente expresión:

Ecuación 1. Citocompatibilidad (%)

$$\text{Citocompatibilidad (\%)} = \frac{\text{Absorbancia de células expuestas a lixiviados}}{\text{Absorbancia de células no expuestas}} \times 100$$

8.4.3.4. Evaluación de la morfología celular por microscopia óptica

Después de las 24 y 48 h de incubación de las células MDA-MB-231 en presencia de los lixiviados de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer, la morfología de las células sin teñir y teñidas con cristal violeta al 0.1% fue evaluada empleando un microscopio óptico invertido a una magnificación de 4x y 20x.

8.4.4. Evaluación de pH

La evaluación de pH de los cementos se llevó a cabo en dos condiciones: i) cementos sin fraguar y ii.) cementos después de 24 h de fraguado en condiciones de cultivo estándar. Para ello, las muestras de cemento sin fraguar (n=2) fueron dispensados directamente de la jeringa en losetas de plástico estéril (29 mg) (Figura 25). e inmersos en tubos falcón estériles de 15 mL en 3 mL de agua destilada. En el caso de las muestras de cemento fraguado después de 24 h (n=2) fueron preparadas siguiendo la metodología descrita en la sección (8.4.1. Preparación de las muestras) y posteriormente estandarizadas a un peso de 29 mg. Posteriormente las pastillas de cemento fueron inmersas en tubos falcón estériles en 3 mL de agua destilada. El pH fue medido a los tiempos de 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 8 y 16 días a temperatura ambiente (Figura 26); para ello, las tiras medidoras de pH fueron inmersas en el seno del líquido y posteriormente comparadas con el patrón de referencia (previo a cada medición las muestras fueron agitadas en un Vortex durante 30 segundos).

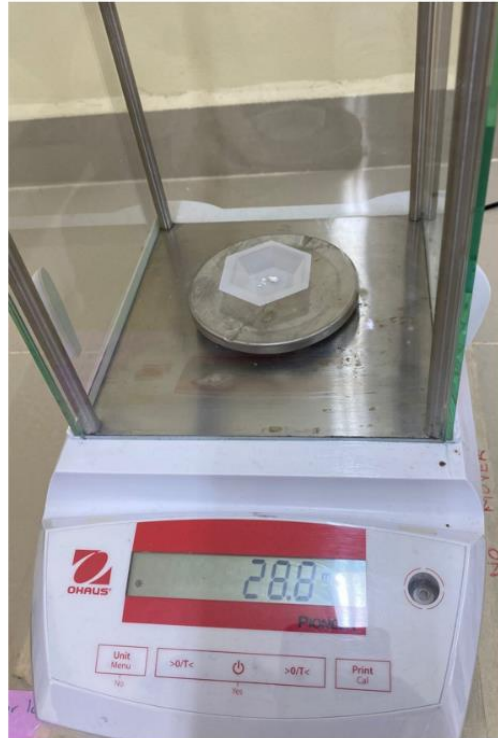


Figura 25. Estandarización de muestras de cemento en microbalanza analítica.

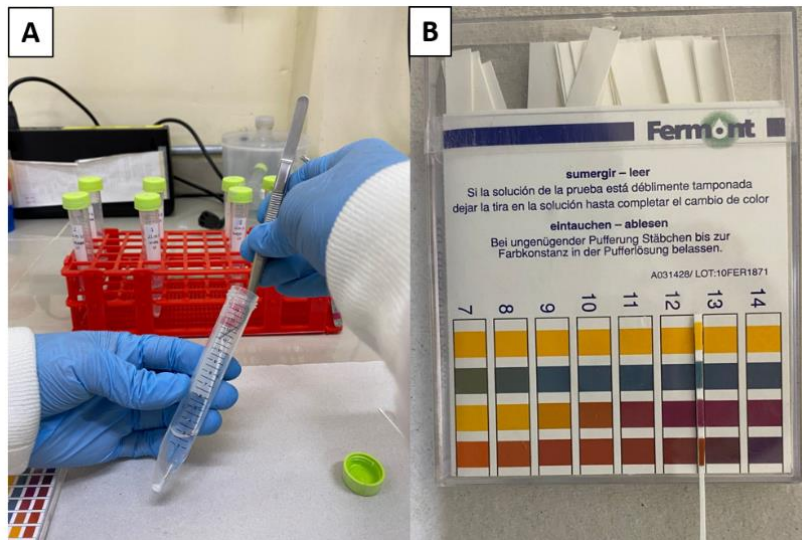


Figura 26. Medición de pH.

En la Figura se observa la toma de la muestra con la tira medidora de pH (A) y su comparación con el patrón de referencia (B).

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 un factor en conjunto con el método de post hoc Tukey. La diferencia estadística fue considerada como significativa a $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR A TRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA A 24 y 48 h

Para evaluar de forma cualitativa la citocompatibilidad de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer, las células MDA-MB-231 fueron observadas por microscopia de campo claro tras la exposición con los lixiviados a 24 y 48 h de incubación. Se evaluó la morfología celular sin teñir (Figura 27 y Figura 28) y teñidas con cristal violeta al 0.1% (Figura 29 y Figura 30), empleando una magnificación de 4x y 20x.

A partir de las Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30 se puede observar que las células expuestas a los lixiviados de las muestras de los cementos de estudio, exhibieron una morfología celular y una proliferación sostenida similar a la presentada por las células cultivadas en ausencia de lixiviados (Control). Estos resultados demuestran de forma cualitativa que no existió alteración celular tras la exposición de los lixiviados de ambos cementos a las 24 y 48 h exhibiendo una alta citocompatibilidad, que fue evaluada de forma cuantitativa por ensayos ELISA (ver Sección 9.2).

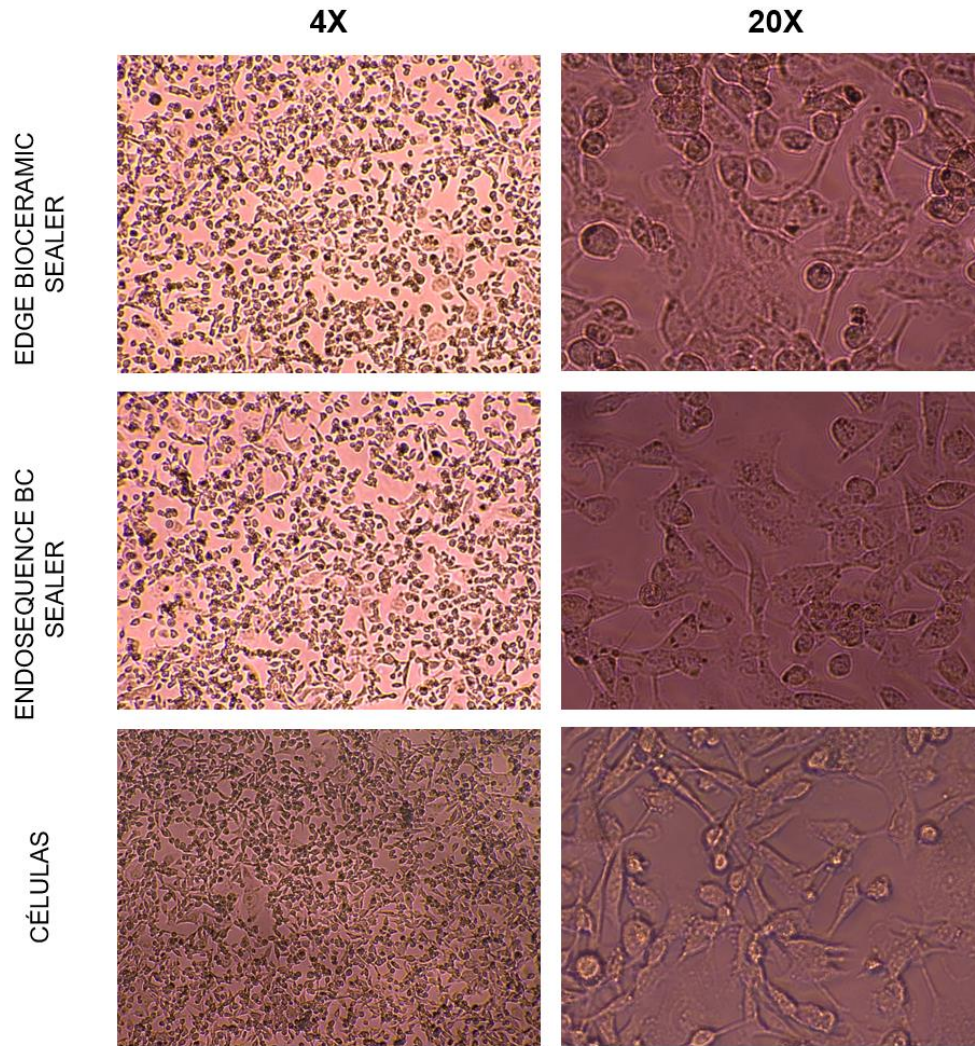


Figura 27. Morfología de las células sin teñir después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 24 h

En la Figura se muestra de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x (sin teñir) posterior a 24 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-2 y Control (EdgeBioceramic Sealer, EndoSequence BC Sealer y células en cultivo sin tratar, respectivamente).

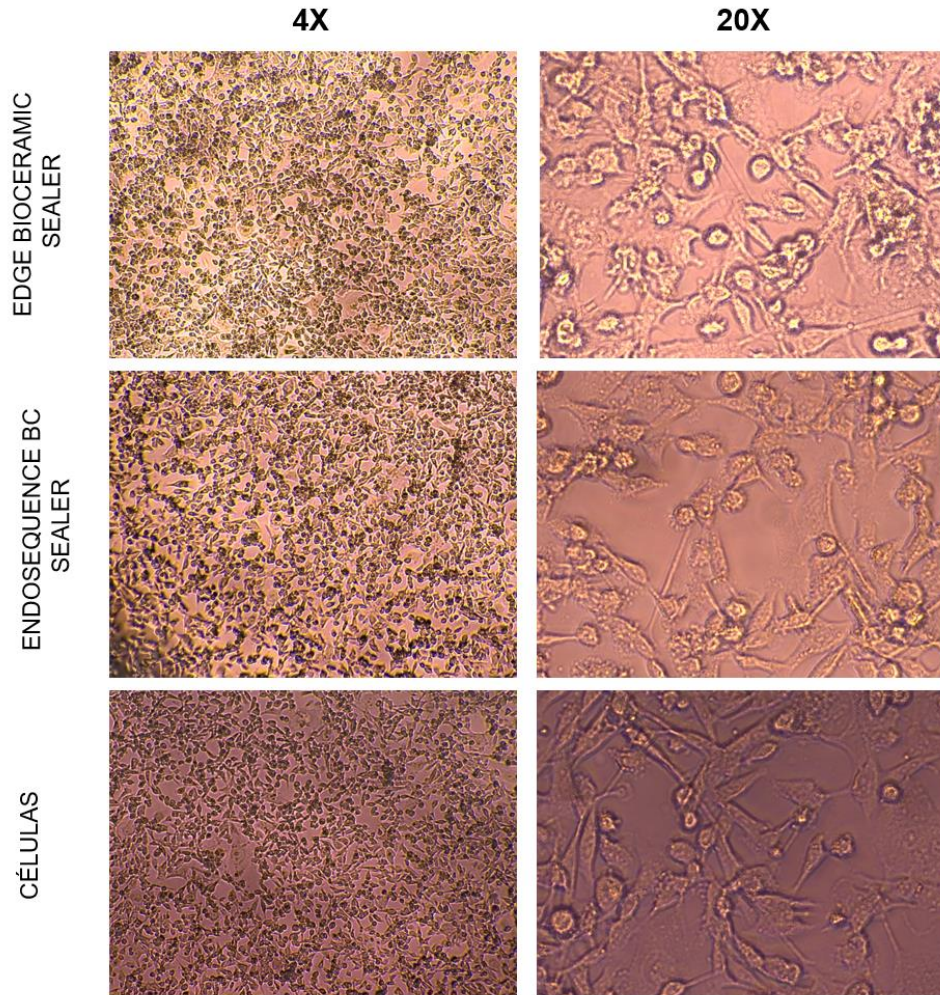


Figura 28. Morfología de las células sin teñir después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 48 h.

En la Figura se muestra de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x (sin teñir) posterior a 48 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-2 y Control (EdgeBioceramic Sealer, EndoSequence BC Sealer y células en cultivo sin tratar, respectivamente).

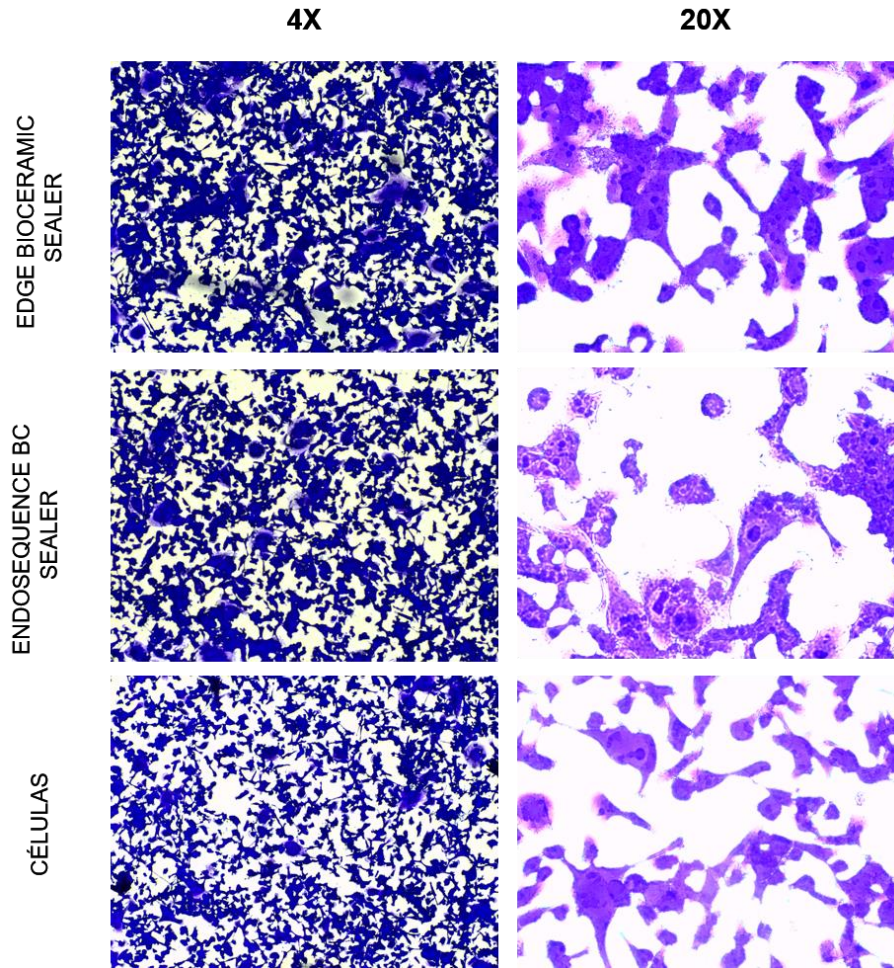


Figura 29. Morfología de las células teñidas con cristal violeta después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 24 h.

En la Figura se muestra de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x (teñidas con cristal violeta al 0.1%) posterior a 24 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-2 y Control (EdgeBioceramic Sealer, EndoSequence BC Sealer y células en cultivo sin tratar, respectivamente).

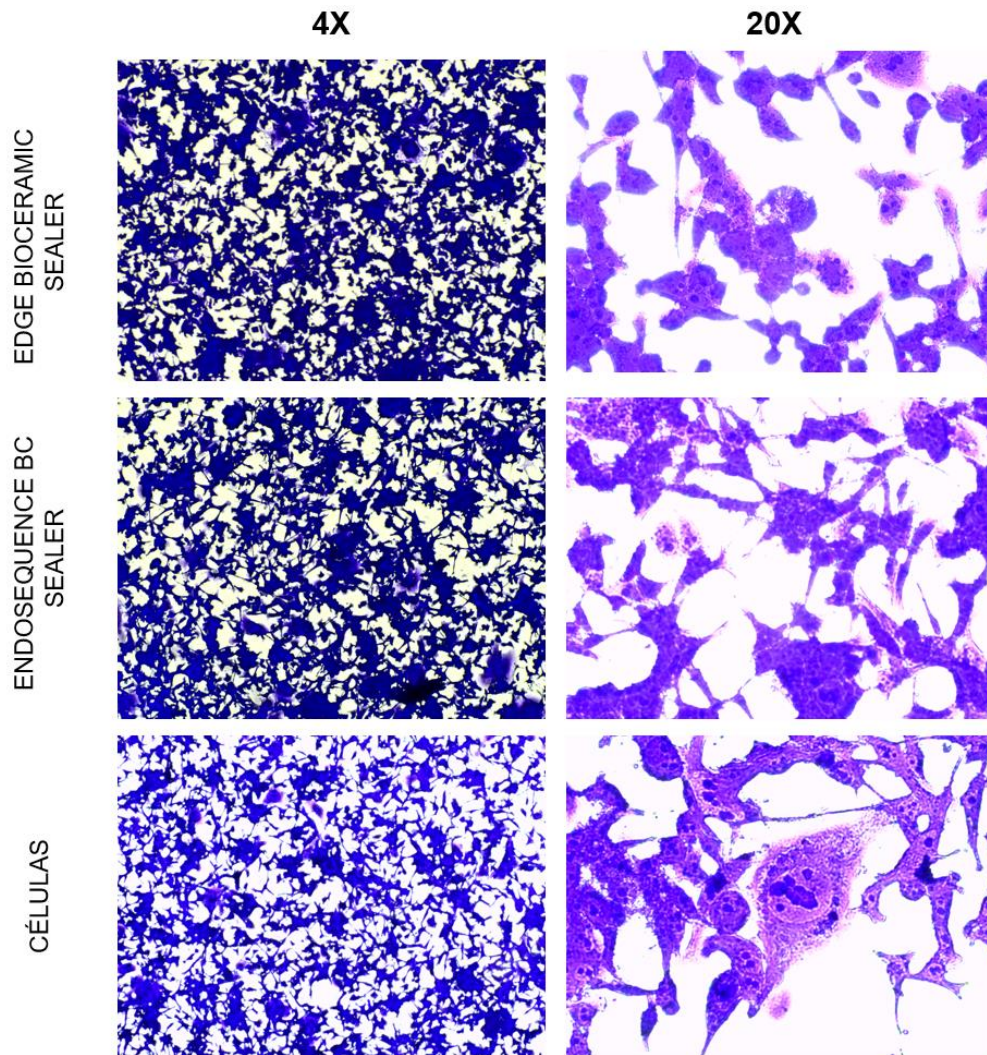


Figura 30. Morfología de las células teñidas con cristal violeta después de su incubación con los lixiviados de los cementos durante 48 h.

En la Figura se muestra de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x (teñidas con cristal violeta al 0.1%) posterior a 48 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-2 y Control (EdgeBioceramic Sealer, EndoSequence BC Sealer y células en cultivo sin tratar, respectivamente).

9.2. CITOCOMPATIBILIDAD A TRAVÉS DE ENSAYOS ELISA

Para evaluar de forma cuantitativa la citocompatibilidad de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer, las células MDA-MB-231 fueron incubadas en presencia de los lixiviados de los cementos durante 24 y 48 h en condiciones de cultivo estándar. El porcentaje de citocompatibilidad se determinó a través de ensayos ELISA con tinción de cristal violeta al 0.1%, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

A partir de la Figura 31 se puede observar que los cementos de estudio exhibieron un porcentaje de citocompatibilidad alto, mostrando valores de 96% (EdgeBioceramic Sealer) y 83% (EndoSequence BC Sealer) a las 24 h. A partir de estos resultados se puede confirmar que los cementos de estudio a las 24 h pueden clasificarse como citocompatibles en virtud de que un material debe exhibir niveles de viabilidad celular del 70% para ser considerados como citocompatibles.

En lo que respecta a los resultados obtenidos a 48 h, el cemento EdgeBioceramic Sealer preservó su citocompatibilidad exhibiendo valores de 91%. Sin embargo, el cemento EndoSequence BC Sealer desplegó un decremento ligero en su citocompatibilidad arrojando un valor de 64%, lo que corresponde a una reactividad o citocompatibilidad moderada. En la literatura se afirma que el cemento EndoSequence BC Sealer es un material citocompatible en un 95% (96). No obstante, según los resultados obtenidos en el presente estudio, la pequeña reactividad exhibida por el cemento EndoSequence BC Sealer se atribuye a la exposición prolongada de las células a los lixiviados del cemento por hasta 48 h. Se menciona lo anterior debido a que en la literatura comúnmente se consideran cambios en el medio de cultivo celular a periodos tan cortos como de 6 h para evitar posibles respuestas de citotoxicidad. En este estudio se decidió mantener los lixiviados en contacto con las células por hasta 48 h con el objetivo de llevar a cabo una caracterización muy rigurosa.

En lo que respecta al análisis estadístico de los resultados demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de citocompatibilidad

del cemento EndoSequence BC Sealer a las 24 y 48 h incubación celular (Post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$). Asimismo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de citocompatibilidad entre los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer a las 48 h de incubación celular (Post-hocs de Tukey y Bonferroni, $p < 0.05$). Con base a lo anterior se confirma la Hipótesis Alternativa (H1) de este trabajo de investigación.

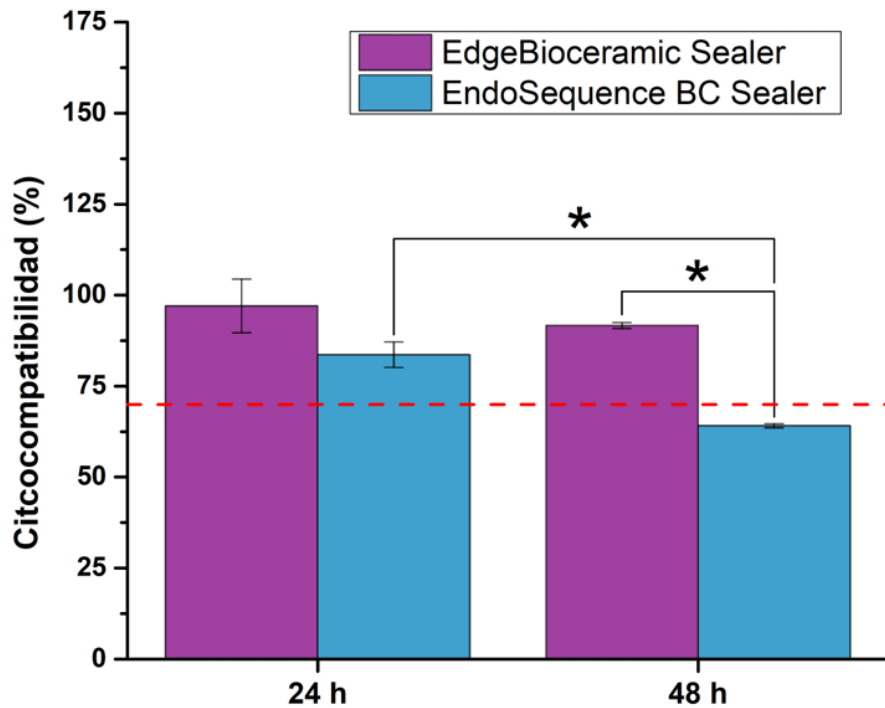


Figura 31. Porcentaje de citocompatibilidad de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer a las 24 y 48 h.

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=6$), de acuerdo con la Ecuación 1. Los asteriscos representan los casos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa tras las comparaciones ($p < 0.05$).*

9.3. EVALUACIÓN DEL pH DE LOS CEMENTOS DE ESTUDIO

La evaluación del pH de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer se llevó a cabo en dos condiciones: i) cementos sin fraguar y ii.) cementos después de 24 h de fraguado en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 100% de humedad). Para ello, se prepararon pastillas de los cementos de estudio que fueron estandarizadas a un peso de 29 mg. Las pastillas fueron depositadas en el interior de tubos falcón con 3 mL de agua destilada (ver Sección 8.4.5). El pH de las muestras de estudio fue medido a los tiempos de 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 8 y 16 días a temperatura ambiente, los resultados obtenidos se muestran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

En la figura 32 se puede observar el pH exhibido por los cementos de estudio en las diferentes condiciones (fraguado y sin fraguar), a distintos tiempos. El cemento EdgeBioceramic Sealer sin fraguar exhibió un pH de 11 a los 30 min, que se incrementó hasta un pH 12 a los 16 días. En el caso del cemento EdgeBioceramic Sealer fraguado exhibió un pH de 9 a los 30 min, que se incrementó hasta un pH de 12 a los 16 días. En lo que respecta al cemento EndoSequence BC Sealer sin fraguar exhibió un pH de 11 a los 30 min, que se incrementó hasta un pH 12 a los 16 días, mientras que, el cemento EndoSequence BC Sealer fraguado exhibió un pH de 9 a los 30 min, que se incrementó hasta un pH de 12 a los 16 días. Los resultados mostraron que se mantuvo un valor de pH máximo de 12 requerido para asegurar un ambiente alcalino en el interior del conducto radicular para la erradicación bacteriana.

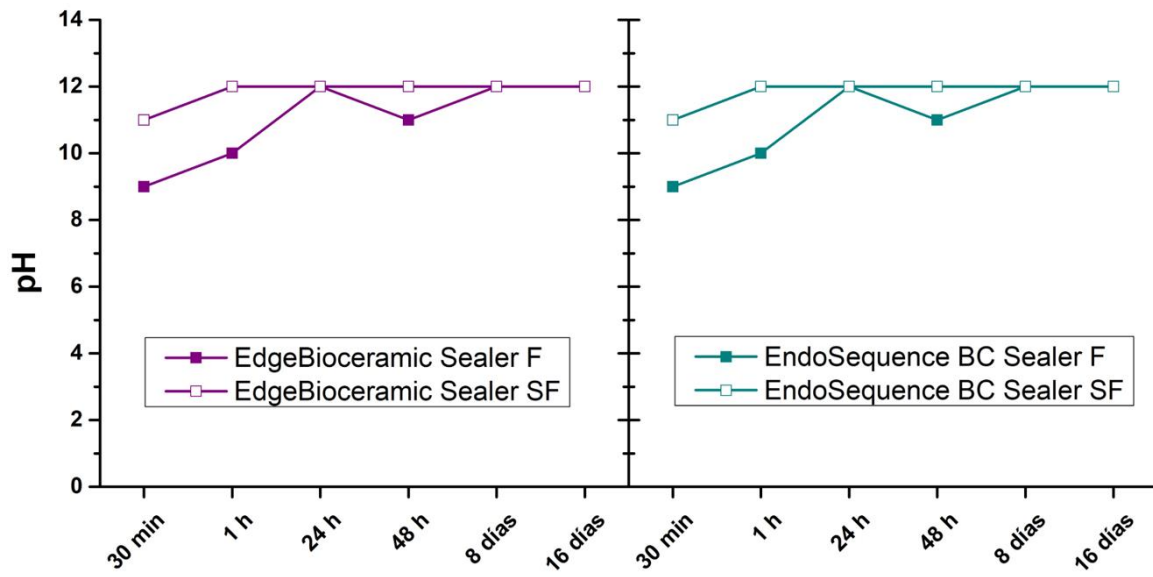


Figura 32. Valores de pH.

En la Figura se observan los gráficos con los valores de pH de las muestras de los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer en ambas condiciones estudiadas (Fraguado [F] y sin Fragar [SF]) medidos a distintos tiempos a temperatura ambiente.

X. CONCLUSIONES

10.1. EVALUACIÓN DE LA CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA

Este proyecto de investigación se llevó a cabo para evaluar la citocompatibilidad de los cementos selladores EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer tras el cultivo de células MDA-MB-231 en presencia de sus lixiviados por ensayos *in vitro* a 24 y 48 h.

1. La morfología de las células expuestas a los lixiviados de ambos cementos de estudio, observada por microscopia de campo claro, confirmó que no existe alteración celular tras periodos de 24 y 48 h en condiciones estándar de cultivo, exhibiendo una alta citocompatibilidad.
2. Los ensayos ELISA confirmaron de forma cuantitativa la alta citocompatibilidad de ambos cementos demostrada por microscopia óptica, aunque con ligera influencia del tiempo para el cemento EndoSequence BC Sealer.
3. Tras 24 h de cultivo, se observaron niveles de viabilidad celular de 96% y 83% para los cementos EdgeBioceramic Sealer y EndoSequence BC Sealer, respectivamente. Estos niveles, superiores al 70%, confirman la citocompatibilidad de ambos cementos en este punto de tiempo.
4. Los análisis estadísticos demostraron que existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de citocompatibilidad del cemento EndoSequence BC Sealer a 24 y 48 h ($p < 0.05$), así como entre los niveles de citocompatibilidad de los cementos EndoSequence BC Sealer y EdgeBioceramic Sealer a 48 h ($p < 0.05$).
5. Con base en estos resultados, se confirma la hipótesis alternativa (H1) de este trabajo.

10.2. EVALUACIÓN DE PH

Además de la citocompatibilidad, se evaluó la evolución del pH de muestras de ambos cementos inmersas en agua destilada a temperatura ambiente tras periodos de incubación de 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 8 y 16 días. Es bien sabido que niveles alcalinos de pH son favorables para la erradicación bacteriana.

6. Los resultados obtenidos demostraron que el pH de ambos cementos adoptó valores de entre 9 y 12 a periodos cortos de tiempo (30 min, 1 h, 24 h) y se mantuvo constante a un valor de pH de aproximadamente 12 en periodos superiores a 24 h, asegurando el ambiente alcalino adecuado para su posible actividad antibacteriana.

XI. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones científicas complementar este estudio con caracterizaciones químicas y fisicoquímicas para confirmar las composiciones reportadas por el fabricante, así como la pureza de ambos productos.

Asimismo, se recomienda llevar a cabo ensayos con bacterias para determinar la posible actividad antibacteriana de ambos productos en las condiciones de sellado endodónico.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Grossman LI. Endodontics 1776-1976: a bicentennial history against the background of general dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1976;93(1):78–87.
2. Ehlers L. Pain and new cultural diseases. *Dent Traumatol.* 1999;15(5):193–7.
3. Goldberg ISF. Endodoncia, Técnica y Fundamentos-Soares&Golberg.pdf. 2002. p. 03–316.
4. Friedman S, Abitbol S, Lawrence HP. Treatment outcome in endodontics: The Toronto study. Phase 1: Initial treatment. *J Endod.* 2003;29(12):787–93.
5. American Association of Endodontic [Internet]. 20 Marzo. 2020. Available from: <http://aae.org>
6. María DJ, Correa A, Rosario D, González M, Morffi DI. Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico. *Remij.* 2011;12(1):82–99.
7. Levine M. Root-canal therapy: a means of treating oral pain and infection. *Can Fam Physician.* 1988;34(June):1357–13565.
8. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005;31(12):863–6.
9. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86–93.
10. Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: A review of the literature. *J Endod.* 2005;31(5):333–40.
11. Cohen S, Hargreaves KM. *Vías de la pulpa.* 9ª. Edición. Editorial Elsevier

- España. 2011. 452–453 p.
12. Guide OS. Success and Failure in Endodontics: An Online Study Guide. *J Endod.* 2008;34(5 SUPPL.):1–6.
 13. Endodontists AA of. Glossary of Endodontic Terms 2016. Gloss Endod Terms [Internet]. 2015;9:43. Available from: <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/aae/endodonticglossary2016/#/0>
 14. Schilder. Preparación del conducto radicular : limpieza y conformación. Tec y fundamntos en Endod [Internet]. 2013;153–203. Available from: http://bibliotecas.unr.edu.ar/muestra/medica_panamericana/9789500604024.pdf
 15. Drs A, Koch K, Brave D, Nasseh AA. A review of bioceramic technology in endodontics. *CE Artic Technol.* 2013;10(C):6–13.
 16. Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1973;35(3):402–14.
 17. Gutmann JL. Clinical radiographic and histologic perspectives on success and failure in endodontics. 1992.
 18. Charles G. Maurice. Treatment standards. *Am Assoc Endod.* 2018;1–20.
 19. Heard F, Walton RE. Scanning electron microscope study comparing four root canal preparation techniques in small curved canals. *Int Endod J.* 1997;30(5):323–31.
 20. Hargreaves KM, Cohen S. Microbiology and Treatment of Endodontic Infection. *Cohen's Pathways of The Pulp.* 2011. 559–599 p.
 21. Becker FG. *Ciencia Endodontica.* 2015.
 22. Behrend C. An in-vitro study of smear layer removal and microbial leakage

- along root-canal fillings. 1996;99–107.
23. Pashley DH. Clinical considerations of microleakage. *J Endod.* 1990;16(2):70–7.
 24. Aktener BO, Cengiz T, Pişkin B. The penetration of smear material into dentinal tubules during instrumentation with surface-active reagents: A scanning electron microscopic study. *J Endod.* 1989;15(12):588–90.
 25. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1993;76(1):97–103.
 26. Sen BH, Wesselink PR TM. Smear Layer Phenomena .Pdf. 1995. p. 28:141-8.
 27. Eriksen HM, Bjertness E. Prevalence of apical periodontitis and results of endodontic treatment in middle-aged adults in Norway. *Dent Traumatol.* 1991;7(1):1–4.
 28. Nair PNR, Sjogren U, Sundqvist G. Cholesterol crystals as an etiological factor in non-resolving chronic inflammation, an experimental study in guinea pigs. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(2p1):644–50.
 29. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: An immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464–71.
 30. Langeland K, Conn F, Block RM, Va R, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endod.* 1977;3(1):8–23.
 31. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009;2(1):56–64.

32. Figdor D, Sundqvist G. Life as an endodontic pathogen. *Endod Top.* 2003;6:3–28.
33. Koppang HS, Koppang R, Solheim T, Aarnes H, Stølen SØ. Cellulose fibers from endodontic paper points as an etiological factor in postendodontic periapical granulomas and cysts. *J Endod.* 1989;15(8):369–72.
34. Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1974;37(2):257–70.
35. Siqueira JF, Alves FRF, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod.* 2011;37(11):1499–503.
36. Hommez GMG, Verhelst R, Claeys G, Vaneechoutte M, De Moor RJG. Investigation of the effect of the coronal restoration quality on the composition of the root canal microflora in teeth with apical periodontitis by means of T-RFLP analysis. *Int Endod J.* 2004;37(12):819–27.
37. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1965;20(3):340–9.
38. Moller ÅJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Eur J Oral Sci.* 1981;89(6):475–84.
39. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7(5):257–62.
40. Molven O, Olse I KK. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1991;
41. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment.

- Endod Top. 2010;22(1):58–78.
42. Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE, Aas JA. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721–32.
 43. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987;13(1):29–39.
 44. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171–83.
 45. De Falguerolles A, Calas P, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J Endod.* 1993;19(6):297–301.
 46. Siqueira JF. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(6):308–10.
 47. Pinheiro, Bpfa G, Ccr F, Fb T, Aa Z, Fj S. Pinheiro 2003-Oral Microbiology and Immunology. 2003;100–3.
 48. Rocas I, Siquera J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular. *J Endod.* 2004;30(19):315–20.
 49. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1–7.
 50. Mindere A, Kundzina R, Nikolajeva V, Eze D, Petrina Z. Microflora of root filled teeth with apical periodontitis in Latvian patients. *Stomatologija.* 2010;12(4):116–21.
 51. Pinheiro ET, Gomes BPF, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1–11.
 52. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological

- findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30(2):91–5.
53. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J.* 2009;42(4):277–87.
 54. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun.* 1986;53(1):149–53.
 55. M. Evans, JK, Davies, G. Sundqvist DF. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus Faecalis* to Calcium hydroxide. *Int J Endod.* 2002;3(3):4–6.
 56. Figdor D, Jk D, Starvation SG. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus Faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;234–9.
 57. Cheung GSP, Ho MWM. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):332–7.
 58. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(5):384–90.
 59. Estrela C, Pesce HF, Sydney GB FJ. Apicalleakage using various sealers and root canal filling techniques. *Braz Dent J.* 1994;
 60. Allan NA, Walton RC, Schaeffer MA. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. *J Endod.* 2001;27(6):421–3.
 61. Peters DD. Two-year in vitro solubility evaluation of four gutta-percha sealer obturation techniques. *J Endod.* 1986;12(4):139–45.
 62. Augsburger RA, Peters DD. Radiographic evaluation of extruded obturation

- materials. *J Endod.* 1990;16(10):492–7.
63. Kazemi RB, Safavi KE, Spångberg LSW. Dimensional changes of endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1993;76(6):766–71.
64. 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.
65. Dixon CM, Rickert UG. Histologic Verification of Results of Root-Canal Therapy in Experimental Animals. *J Am Dent Assoc Dent Cosm.* 1938;25(11):1781–803.
66. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers: A Review. *J Endod* [Internet]. 2009;35(4):475–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.026>
67. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011;44(8):697–730.
68. Loest C. Follow-up of root canals obturated with glass ionomer and epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 1993;19(4):1993–1993.
69. Fransen JN, He J, Glickman GN, Rios A, Shulman JD, Honeyman A. Comparative Assessment of ActiV GP/Glass Ionomer Sealer, Resilon/Epiphany, and Gutta-Percha/AH Plus Obturation: A Bacterial Leakage Study. *J Endod.* 2008;34(6):725–7.
70. Koch MJ. Formaldehyde release from root-canal sealers: Influence of method. *Int Endod J.* 1999;32(1):10–6.
71. Savariz A, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Long-term sealing ability of GuttaFlow versus Ah Plus using different obturation techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6).

72. Langeland K, Olsson B, Pascon EA. Biological evaluation of Hydron. *J Endod.* 1981;7(5):196–204.
73. Tay FR, Pashley DH. Monoblocks in Root Canals: A Hypothetical or a Tangible Goal. *J Endod.* 2007;33(4):391–8.
74. Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of Moist Root Canal Dentin with the Use of Methacrylate-based Endodontic Sealers: An In Vitro Coronal Dye Leakage Study. *J Endod.* 2008;34(1):76–9.
75. Zmener O, Pameijer CH. Clinical and radiographic evaluation of a resin-based root canal sealer: 10-year recall data. *Int J Dent.* 2012;2012.
76. Shipper G, Ørstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). *J Endod.* 2004;30(5):342–7.
77. Radovic I, Monticelli F, Vulicevic Z. Self-adhesive Resin Cements: A literature review Article in *The journal of adhesive dentistry* · September 2008 Restorative Dentistry View project SEE PROFILE. *J Adhes Dent [Internet].* 2014;(September). Available from: <https://www.researchgate.net/publication/23257557>
78. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater.* 2001;17(6):512–9.
79. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial In Vitro Biological Response to Contemporary Endodontic Sealers. *J Endod.* 2006;32(10):989–92.
80. Brackett MG, Martin R, Sword J, Oxford C, Rueggeberg FA, Tay FR, et al. Comparison of Seal After Obturation Techniques Using a Polydimethylsiloxane-Based Root Canal Sealer. *J Endod.* 2006;32(12):1188–90.

81. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *J Endod* [Internet]. 2010;36(3):400–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.009>
82. Wang WH, Wang CY, Shyu YC, Liu CM, Lin FH, Lin CP. Compositional characteristics and hydration behavior of mineral trioxide aggregates. *J Dent Sci* [Internet]. 2010;5(2):53–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1991-7902\(10\)60009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1991-7902(10)60009-8)
83. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod* [Internet]. 2010;36(1):16–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
84. 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. *Int Endod J*. 2012;45(5):419–28.
85. Gomes-Filho JE, Moreira JV, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Dezan Junior E, et al. Sealability of MTA and calcium hydroxide-containing sealers. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(3):347–51.
86. Leiendecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod* [Internet]. 2012;38(6):829–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.01.004>
87. Ousborne AL. FDA and ADA Evaluation of Dental Products—Implications for Dentists and their Patients: a View from the Practitioner. *J Public Health Dent*. 1992;52(6):391–3.
88. Köseoğlu BG, Tanrikulu Ş, Sübay RK, Sencer S. Anesthesia following

- overfilling of a root canal sealer into the mandibular canal: A case report. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(6):803–6.
89. Kleier DJ, Averbach RE. Painful dysesthesia of the inferior alveolar nerve following use of a paraformaldehyde-containing root canal sealer. *Dent Traumatol*. 1988;4(1):46–8.
90. GLUSKIN AH. Mishaps and serious complications in endodontic obturation. *Endod Top*. 2005;12(1):52–70.
91. Assadian H, Hamzelouei Moghaddam E, Amini A, Nazari Moghaddam K, Hashemzahi M. A Review of Endodontic Bioceramics. *J Islam Dent Assoc IRAN*. 2016;28(1):20–33.
92. Darvell BW, Wu RCT. MTA - An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. *Dent Mater*. 2011;27(5):407–22.
93. Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of EndoSequence root repair material and ProRoot MTA against clinical isolates of enterococcus faecalis. *J Endod* [Internet]. 2011;37(11):1542–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.022>
94. Chybowski EA, Glickman GN, Patel Y, Fleury A, Solomon E, He J. Clinical Outcome of Non-Surgical Root Canal Treatment Using a Single-cone Technique with Endosequence Bioceramic Sealer: A Retrospective Analysis. *J Endod* [Internet]. 2018;44(6):941–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.019>
95. EDGEENDO [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 27]. Available from: <https://web.edgeendo.com/>
96. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod* [Internet]. 2011;37(5):673–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.003>

97. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod.* 2008;34(11).

98. Martínez-Cortés M, Tinajero-Morales C, Rosales C, Uribe-Querol E. Cytotoxicity assessment of three endodontic sealing cements used in periapical surgery. In vitro study. *Rev Odontológica Mex* [Internet]. 2017;21(1):e40–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rodMex.2017.02.010>