



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE TRES
CEMENTOS BIOCERÁMICOS UTILIZADOS EN
ENDODONCIA: MTA FILLAPEX (ANGELUS), BIOROOT
RCS (SEPTODONT) Y ENDOSEQUENCE BC SEALER
(BRASSELER) EN FIBROBLASTOS GINGIVALES
HUMANOS.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A:

JAVIER SÁNCHEZ DE PABLO

TUTOR: Esp. ENRIQUE GERARDO CHÁVEZ BOLADO

ASESOR: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

Dedico el presente trabajo a todos los que siempre me apoyaron durante la especialidad.

Especial agradecimiento a Laura Ortíz Miranda por todo su tiempo y apoyo en el laboratorio de Bioquímica para poder lograr ésta investigación.

A mi tutor Enrique Gerardo Chávez Bolado por su paciencia, conocimiento y ayuda para realizar la investigación.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por su asesoría en el trabajo de investigación.

Al Dr. Raúl Luis García Aranda por su apoyo y sus conocimientos para poder realizar ésta investigación.

A todos los profesores por sus conocimientos y ayuda durante la especialidad.

A mi familia por todo su apoyo incondicional.

Por último a mi universidad, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme prepararme en la mejor universidad.

Índice

Introducción.....	4
Marco Teórico.....	6
Selladores de conductos radiculares.....	6
Manipulación y aplicación en el conducto.....	7
Estabilidad dimensional, impermeabilidad y adherencia.....	7
Corrimiento.....	7
Radiopacidad.....	7
Color del diente	8
Acción antibacteriana.....	8
No interferir con los cementos para fijación postes intrarradiculares.....	8
Posibilidad de removerse en forma parcial o por completo.....	8
Biocompatibilidad.....	8
Tipos de selladores endodóncicos.....	9
Selladores de conductos radiculares con base en óxido de zinc y eugenol.....	9
Selladores de conductos radiculares con base en hidróxido de calcio.....	9
Selladores con base en resina epóxica.....	10
Selladores con base en silicato de calcio (biocerámicos).....	10
Características del cemento biocerámico.....	11
Mecanismo de acción.....	12
Evidencia clínica sobre cementos biocerámicos en comparación con otros cementos.....	13
Posibilidad de realizar un retratamiento.....	14
Evaluación de citotoxicidad por reducción del MTT.....	14
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Resultados.....	25
Discusión.....	26
Conclusiones.....	27
Referencias bibliográficas.....	28

Evaluación de la citotoxicidad de tres cementos biocerámicos utilizados en endodoncia: MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC sealer (Brasseler) en fibroblastos gingivales humanos.

Introducción

Eberly en 1898 afirmó que “lo que se utiliza para obturar un conducto radicular preparado no es tan importante como lo que se elimina de él”¹. Hoy en día se sabe que la limpieza, conformación y el sellado tridimensional del sistema de conductos radiculares evita la recolonización bacteriana y promueve la reparación de los tejidos periapicales.

Esta obturación se basa en una adecuada adaptación de la punta de gutapercha con cemento sellador para que juntos ocupen la totalidad del espacio del sistema de conductos radiculares y sus variantes anatómicas existentes como conductos accesorios, deltas apicales e istmos. Diferentes técnicas de obturación se han desarrollado a lo largo del tiempo que buscan este sellado tridimensional.

Los cementos selladores son materiales que contribuyen al sellado hermético junto con la gutapercha; se puede encontrar en el mercado cementos selladores con formulaciones distintas con base en óxido de zinc y eugenol, hidróxido de calcio, resina epóxica y actualmente cementos selladores biocerámicos o silicatos de calcio.

Los cementos selladores biocerámicos son materiales compuestos principalmente con base en vidrio mediante fusión de la sílice (SiO_2), carbonato de sodio (Na_2CO_3), carbonato de calcio o caliza (CaCO_3) y cerámica que tiene propiedades adherentes, osteoconductoras, ausencia de toxicidad, químicamente estables y biotolerables según reportes del fabricante.

El uso de selladores en endodoncia involucra íntimo contacto entre el material y los tejidos periapicales por la liberación de subproductos a través del foramen apical, de ahí la importancia de conocer la citotoxicidad en relación con esos tejidos. En la especificación #41-1982 de la American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA) establece los parámetros necesarios para evaluar la biocompatibilidad de materiales dentales.

Para determinar la citotoxicidad de un material es necesario seguir ciertas sugerencias:

- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*.
- Implantación subcutánea o intraósea del material para evaluar la reacción tisular local.
- Evaluación de la reacción *in vivo* entre el tejido y el sellador, en animales y en humanos.

En este estudio se realizarán pruebas *in vitro* en fibroblastos previamente congelados para su conservación, se descongelarán y se estudiarán los efectos citotóxicos de los tres selladores biocerámicos utilizando la prueba de reducción del MTT.

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima deshidrogenasa succínica mitocondrial a su forma insoluble llamada formazan. El formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el cambio de color amarillo (MTT) a morado (formazán) a causa de la reducción mitocondrial de la sal de tetrazolio, la cual es proporcional al número de células vivas.

Marco Teórico:

SELLADORES DE CONDUCTOS RADICULARES

La obturación en el tratamiento de endodoncia representa un gran desafío al clínico debido a la anatomía interna tan variada del sistema de conductos radiculares y la discrepancia existente entre la morfología de los instrumentos y la gutapercha con respecto al conducto radicular. Es por esto que para lograr un sellado tridimensional es indispensable complementar a la gutapercha con un material sellador que logre ocupar los espacios entre la gutapercha y la anatomía abrupta que presenta el conducto radicular.

Rickert en 1925 propone el uso de un cemento junto con los conos de gutapercha para una mejor adaptación en el conducto radicular y desde entonces se propone la implementación del cemento para ayudar en la obtención de un sellado hermético.¹

Es de gran importancia elegir un buen cemento que cumpla con los requisitos y características propuestos por Grossman L de un cemento ideal para la obturación de conductos radiculares:

- Ser pegajoso al mezclar y proporcionar buena adhesión entre el material y la pared del conducto al fraguar.
- Proporcionar un sellado hermético.
- Ser radiopaco.
- Debe tener partículas de polvo muy finas, que se mezclen con facilidad con el líquido del cemento
- No debe sufrir contracción volumétrica.
- No pigmentar la estructura dentaria.
- Ser bacteriostático o no favorecer la reproducción de bacterias.
- Debe fraguar con lentitud. Insolubilidad a los líquidos tisulares
- Tolerancia por los tejidos
- Poseer solubilidad en solventes comunes.²

En la actualidad, se han agregado otros dos requisitos para un buen sellador:

- No debe provocar una reacción inmunitaria en los tejidos periapicales³
- No debe ser mutagénico ni carcinogénico⁴

Dentro de todos los requisitos mencionados, es importante destacar algunos de ellos:

Manipulación y aplicación en el conducto.

Una mezcla apropiada de los componentes ya sea polvo-líquido, polvo-gel, pasta-pasta mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas del sellador brindándonos un tiempo de trabajo adecuado, menor solubilidad, conservación de la estabilidad dimensional, radiopacidad adecuada y mejora la tolerancia tisular. Al referirnos a un tiempo de trabajo adecuado, significa que el sellador se mantiene en una fase plástica durante la obturación permitiendo la colocación y manipulación de gutapercha ya sea en conos o termoplastificada.

Estabilidad dimensional, impermeabilidad y adherencia.

Debe ser capaz de llenar en forma estable y permanente los espacios entre los conos de gutapercha y la pared radicular, la estabilidad dimensional del material de obturación a lo largo del tiempo es impredecible, la pérdida de este, sea parcial o total afecta a los objetivos de la obturación y se puede dar por causas físicas como contracción o por químicas como la solubilidad y desintegración. La impermeabilidad también es importante porque el material no debe absorber humedad tisular ni ser afectado por ello. La adhesión o al menos la unión íntima entre este y la pared del conducto radicular impiden el paso de microorganismos, toxinas y demás productos por vía coronal apical o lateral desde el conducto radicular hacia los tejidos perirradiculares o viceversa.⁵

Corrimiento.

Con la fluidez adecuada el cemento sellador es capaz de ocupar los espacios presentes por la variabilidad anatómica del sistema de conductos radiculares como conductos laterales, deltas apicales, accesorios, secundarios y así aumentar la capacidad de obturar tridimensionalmente.

Radiopacidad.

La radiografía es nuestro único medio para el control apical y compactación de la gutapercha en el tratamiento de conductos es por eso que se requiere que los materiales sean radiopacos.

Color del diente.

Selladores que contengan óxido de zinc y eugenol en su composición o metales pesados pueden modificar el color de la corona, por eso se debe dejar la obturación en la entrada del conducto y limpiar los residuos de la cámara pulpar.

Acción Antibacteriana.

Deben tener acción antibacteriana o al menos no favorecer al desarrollo de microorganismos.

No interferir con los cementos para fijación de los postes intrarradiculares.

La literatura menciona que no se deben usar selladores con base en eugenol porque se ve alterada la adhesión de los materiales resinosos o postes; sin embargo existen métodos de eliminación de los restos para no perjudicar la adhesión.

Posibilidad de removerse en forma parcial o por completo.

Debe ser posible la remoción parcial en caso de que se requiera la colocación de un anclaje intrarradicular o de ser necesaria la remoción completa por una repetición de tratamiento. Cuando se dificulta la eliminación de los materiales dentro del conducto pueden presentarse accidentes operatorios.

Biocompatibilidad.

Debe existir una óptima relación entre los materiales de obturación con el tejido periodontal circundante. Todos los materiales empleados ocasionan cierto grado de agresión que por lo general es tolerado y compensado por el sistema de defensa del organismo.⁵

Tipos de selladores endodóncicos

Pueden agruparse dependiendo de sus componentes químicos:

Selladores de conductos radiculares con base en óxido de zinc y eugenol.

Son usados con mucha frecuencia, entre los que destacan el sellador de Rickert usado desde 1948. Luego se desarrolla en 1955 el cemento de plata por Grossman L², quien en 1958 modifica la composición; sin embargo las propiedades que poseía este cemento no eran muy deseadas, por lo que 8 años después realiza la última modificación incorporando óxido de zinc, resina, subcarbonato de bismuto, sulfato de bario, borato de sodio y como líquido el eugenol. Este cemento cumplía ya con la mayoría de propiedades propuestas de un adecuado cemento sellador, por lo tanto la mayor parte de cementos con base en óxido de zinc que se encuentran en el mercado son variaciones y modificaciones de la fórmula original de Grossman.

La combinación de óxido de zinc con el eugenol garantiza el endurecimiento de estos cementos mediante un proceso de quelación cuyo producto final es el eugenolato de zinc.

Usados por su plasticidad y su lento tiempo de fraguado, tienen buen potencial de sellado apical. Estos cementos proporcionan prolongados tiempos de manipulación, sin embargo, poseen la desventaja de descomponerse en presencia de agua y existirá pérdida continua de eugenol siendo este directamente responsable de la citotoxicidad de los cementos endodóncicos que los contienen, lo que lo convierte en un material débil e inestable.⁶

Selladores de conductos radiculares con base en hidróxido de calcio.

Poseen aceptable biocompatibilidad y buena capacidad de sellado. El hidróxido de calcio posee acción antiinflamatoria, antimicrobiana y es capaz de inducir la formación de tejido mineral ayudando a la reparación tisular, todo sucede gracias al pH alcalino y liberación de iones de calcio e hidroxilo, se usa generalmente en tratamientos de pulpa vital o necrótica, apexificación, apexogénesis y resorciones radiculares internas y externas. Por las características mencionadas se ha empleado como principal componente de cementos selladores endodóncicos.⁷

Selladores con base en resina epóxica.

Presentan una mejor aceptación debido a que están compuestos de resina, tienen una buena adhesión a la pared del conducto radicular, no es sensible al agua por lo que el fraguado ocurre incluso debajo del agua y libera de manera paulatina residuos de formaldehído mientras ocurre el fraguado manteniendo así un efecto antimicrobiano, además, poseen en su composición hidróxido de calcio y óxido de zinc eugenol, ofrecen menor filtración marginal, con mejores propiedades biológicas que favorecen la reparación tisular.

Pasta Epóxica	Pasta Amina
<input type="checkbox"/> Resina epóxica	<input type="checkbox"/> Amina Adamantina
<input type="checkbox"/> Tungstato de Calcio	<input type="checkbox"/> N,N-Dibenzyl-5-oxanonano-diamina-1,9-TCD-diamina
<input type="checkbox"/> Óxido de Zirconio	<input type="checkbox"/> Tungstato de Calcio
<input type="checkbox"/> Aerosil	<input type="checkbox"/> Aerosil
<input type="checkbox"/> Óxido de Hierro	<input type="checkbox"/> Aceite de silicona

Cuadro 1. Se enlistan los componentes de los cementos selladores con base en resina epóxica.

Selladores con base en silicato calcio (biocerámicos).

A fines de la década de los 60, algunos investigadores como Hench L⁸, 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 se descubrieron los materiales bioactivos, con aplicación tanto en medicina como en odontología. Poseen propiedades osteoconductoras, ausencia de toxicidad, químicamente estables y son biotolerables.

En endodoncia los materiales biocerámicos se introdujeron en los años 90 por Torabinejad, primero como materiales de obturación retrógrada y luego como cementos para sellar perforaciones, selladores de conductos radiculares y como recubrimiento para conos de gutapercha.⁹

En endodoncia, durante las últimas décadas se han realizado avances en el campo de los materiales biocerámicos que pueden ser utilizados para:

- Obturación retrógrada.
- Recubrimiento pulpar.
- Reparación de perforaciones.
- Tratamiento de dientes con ápices abiertos.
- Reparación de defectos de reabsorción.
- Cementos selladores

El primer material biocerámico patentado para aplicaciones en endodoncia fue el Mineral Trióxido Agregado (MTA; Dentsply TulsaDental Specialties, Johnson City, TN, USA.), introducido por Torabinejad con excelentes propiedades fisicoquímicas y biológicas, por lo que ha sido ampliamente usado en endodoncia, y a partir del mismo se han desarrollado nuevas generaciones de materiales biocerámicos con base en silicato de calcio, con el afán de superar sus características y obtener materiales ideales para su uso en endodoncia.⁹

Los cementos biocerámicos son materiales especialmente diseñados para el uso clínico. Éstos incluyen alúmina, zirconio, vidrio bioactivo, vidrios cerámicos, hidroxiapatita y fosfatos de calcio reabsorbibles. Existen tres categorías de biocerámicos:

1. Bioinertes: capaces de rellenar tejidos y ser tolerados por el organismo.
2. Bioactivos: tolerados por el organismo con capacidades de osteoconducción. Dentro de este grupo podemos encontrar los siguientes cementos selladores endodóncicos: I-Root SP (IBC, Canadá), el Endosequence BC Sealer (Brasseler, USA) y el TotalFill BC Sealer (FKG, Suiza), entre otros.
3. Biodegradables: con capacidad de ser degradados en ambiente biológico y ser reemplazados por hueso.¹⁰

Características del cemento biocerámico.

Los cementos biocerámicos son biotolerables porque los tejidos periapicales no tienen gran respuesta inflamatoria cuando entran en contacto con ellos. Son estables en ambientes biológicos y no sufren contracción al fraguar; al contrario, tienen una expansión de 0,002mm.

Otra característica que poseen es su capacidad de producir hidroxiapatita durante su proceso de fraguado, generando un enlace químico entre la dentina

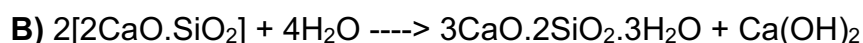
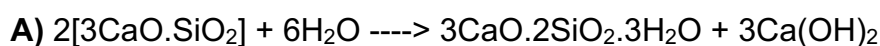
y el material de obturación. Presentan además un pH muy alcalino (12,8) durante las primeras 24 horas de fraguado, lo que les da una elevada actividad antibacteriana. Son fáciles de usar, ya que poseen un tamaño de partícula menor a 2 μm , lo que permite ser usados en una jeringa premezclada (puede ser usado con “capillary tips” de 0,12mm de diámetro u otras).

Tiene un tiempo de trabajo aproximado de tres a cuatro horas a temperatura ambiente, y se introduce directamente dentro del conducto.¹¹

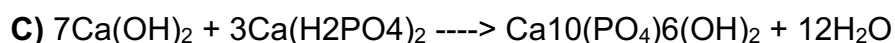
Mecanismo de Acción.

Los cementos Endosequence® y Totalfill® comparten una reacción de fraguado común, en que los silicatos de calcio del polvo al hidratarse forman un gel de silicato de calcio e hidróxido de calcio. Posteriormente el agua reacciona con los silicatos de calcio, para que estos precipiten generando un hidrato-silicato de calcio, generándose finalmente un precipitado de hidroxiapatita. Durante este proceso, el agua juega un papel fundamental en el control del nivel de hidratación y el fraguado del material.

Las reacciones de hidratación de los silicatos de calcio pueden ser de la siguiente manera:



La reacción de precipitación de la hidroxiapatita ocurre de la siguiente manera:



Desde el punto de vista clínico, la ventaja de la presentación premezclada es evidente, ya que se ahorra tiempo y se obtiene un cemento homogéneo y bien proporcionado en sus componentes, a diferencia de los demás cementos de obturación, cuya preparación está supeditada al manejo del operador. Además, son hidrofílicos, ya que fraguan sólo ante la exposición a un ambiente húmedo, humedad que es proporcionada por los túbulos dentinarios. De acuerdo a lo relatado por Koch K y Brave D (2012), al contener la dentina un 20% de agua en relación a su volumen, esta agua sería la que inicia el proceso de fraguado del cemento y la consecuente formación de hidroxiapatita. El ser hidrofílico, tener un tamaño de partícula pequeño, y adherirse de manera química a la dentina le otorga buenas propiedades hidráulicas.¹¹

Evidencia clínica sobre cementos biocerámicos en comparación con otros cementos.

Estudios realizados recientemente respecto al comportamiento de los cementos selladores con base en silicato de calcio en relación a los ideales de un material de obturación, concluyen que estos son biotolerables. Zhang W. et al¹² concluyen que serían menos citotóxicos que los cementos con base en resina epóxica como el AH Plus, mientras que Zhang H. et al¹³ postulan que posee propiedades antibacterianas altamente efectivas, eliminando al *Enterococcus faecalis* en dos minutos; más rápido que los cementos AH Plus, Apexit, Tubliseal y Sealapex. Jingzhi M¹⁴ en su estudio compara su biocompatibilidad con la del MTA, concluyendo que son muy similares, resultado que concuerda con el obtenido por Alanezi AZ¹⁵, quien concluye que poseen una biocompatibilidad comparable con MTA gris y blanco.

Ciasa M¹⁶ et al también comparan cementos con base en silicato de calcio con MTA, concluyendo que ambos compuestos producen una cantidad similar de citoquinas, mientras que según Chang et al¹⁷, producen menos mediadores inflamatorios que el cemento Sealapex.

En relación a su capacidad de sellado apical, tanto Wang F¹⁸ et al como Zhang W¹⁹ et al concluyen que son muy similares al AH Plus, mientras que Pawar et al²⁰ postulan que la capacidad de sellado de los biocerámicos es mejor que el AH Plus.

La extrusión de materiales de obturación es una complicación frecuente por lo que sus características biológicas son esenciales para el éxito clínico. Según Candeiro GTM²¹ los selladores con base en silicato de calcio son menos citotóxicos en comparación con el sellador AH Plus, estos resultados coinciden con Zhang M¹⁴ que muestran que EndoSequence BC sealer tiene citotoxicidad más baja que AH Plus, evaluados en un periodo de 24 a 72 horas. Por otra parte, Zhou H²² et al. señalan que EndoSequence BC Sealer no es citotóxico en ninguna etapa de fraguado (fresco o a 4 semanas después de la mezcla), en comparación con AH-Plus que es citotóxico sólo cuando está recién mezclado. Se han obtenido resultados donde MTA-Fillapex tuvo un grave efecto citotóxico sobre fibroblastos cuando recién se preparó. Además, este efecto no disminuye

con el tiempo. El nivel de citotoxicidad se mantuvo moderado hasta cinco semanas después de mezclar.

Posibilidad de realizar un retratamiento.

La eliminación del material de obturación existente durante el retratamiento endodóncico no quirúrgico es importante para lograr la correcta desinfección del sistema de conductos y se puede realizar usando tanto limas manuales como sistemas rotatorios con o sin disolventes o calor.

Hess D²³ et al. en su estudio mostraron que al retratar piezas obturadas con selladores con base en silicato de calcio con técnica de cono único a longitud de trabajo se logró establecer permeabilidad del conducto en el 80% de las muestras, mientras que cuando el cono se fijó intencionalmente a 2 mm corto de longitud de trabajo solo se logró establecer permeabilidad del conducto en un 30% de las muestras. Mientras que Ersev et al²⁴ mostraron que al retratar piezas obturadas con técnica de cono único y con EndoSequence BC Sealer o AH Plus pueden ser eliminados en un grado similar usando ProTaper retratamiento.

Evaluación de citotoxicidad por reducción del MTT.

Este método se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.¹⁶

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción (formazan) queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.

De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.¹⁷

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.²⁰

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C). El período de exposición de la sustancia de ensayo puede ser durante períodos cortos (1-2 horas de tratamiento), o largos (24 ó 72 horas de tratamiento). Se deben tomar las lecturas en un espectrofotómetro al concluir el tiempo de incubación a 450 nm.²¹

Por lo general se deben realizar al menos 8 réplicas de cada concentración que se evalúa. Se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/mL o hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio. Si es alcanzada esta concentración y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio.

Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados por evitar tener una lectura falsa al no dejar pasar la luz. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo.

Planteamiento del problema.

El tratamiento del sistema de conductos radiculares tiene como principal objetivo la limpieza, conformación y obturación. El resultado exitoso a largo plazo depende en gran medida de la calidad de la obturación del sistema de conductos radiculares. Existe una gran cantidad de cementos selladores para lograr esta función, sin embargo los cementos selladores de última generación (cementos con base en silicato de calcio) prometen tener alta biocompatibilidad con las células del cuerpo.

Cuando se coloca un cemento sellador dentro del conducto a longitud de trabajo para finalizar el tratamiento, el cemento sellador va a estar en contacto con las células presentes en los tejidos periapicales. Por éste motivo, es muy importante conocer el efecto que va a tener cada cemento sellador con estas células.

Una lesión periapical puede desencadenar un efecto de resorción externa en una raíz dental, igualmente, hay dientes que presentan resorciones internas que pueden llegar a comunicarse con los tejidos perirradiculares, lo que puede provocar problemas para la retención del cemento sellador dentro del sistema de conductos radiculares y así fluir mayor cantidad del cemento hacia los tejidos periapicales.

A pesar de la gran variedad de materiales utilizados como selladores en endodoncia, ninguno cumple al 100% con todos los requisitos que menciona Grossman, de ahí la importancia de buscar el material de obturación que genere menor reacción tisular.

Los efectos citotóxicos en los tejidos perirradiculares pueden inducir muerte celular, se ha demostrado en diversos estudios que dichos efectos se manifiestan en fibroblastos gingivales y periodontales, osteoblastos, tejidos subcutáneos, macrófagos y células nerviosas.

Justificación.

Es común la proyección del material de obturación hacia tejidos periapicales durante la obturación del tratamiento de conductos. Estos materiales pueden ocasionar una reacción no deseable en los tejidos periapicales que podrían llevar al fracaso del tratamiento.

¿Cuál es el cemento sellador con menor citotoxicidad? Al utilizar este tipo de cementos selladores en la clínica de endodoncia, es indispensable elegir el cemento que le de los mejores beneficios a cada paciente sin dañar las células en tejidos perirradiculares y promover la reparación de los tejidos periapicales. La selección de un material debe basarse en el sellado apical y en evitar reacciones en los tejidos periapicales para tener un mejor pronóstico a largo plazo.

Una de las células que se encuentran en mayor cantidad en los tejidos perirradiculares son los fibroblatos. Tienen un fácil manejo en el laboratorio y pueden conservarse por mucho tiempo. Por esta razón se va a comprobar la citotoxicidad de los cementos selladores contra éste tipo de células.

Hipótesis.**Hipótesis de trabajo.**

La citotoxicidad en fibroblastos humanos es menor en el Endosequence BC sealer en comparación con MTA Fillapex y BioRoot RCS.

Hipótesis nula.

La citotoxicidad en fibroblastos humanos es mayor en el Endosequence BC sealer en comparación con MTA Fillapex y BioRoot RCS.

Objetivos.

Objetivo General.

Evaluar y comparar la citotoxicidad de MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC Sealer (Brasseler) en fibroblastos gingivales humanos.

Objetivos específicos.

Evaluar la citotoxicidad del MTA Fillapex a las 24 horas.

Evaluar la citotoxicidad del MTA Fillapex a las 48 horas.

Evaluar la citotoxicidad del MTA Fillapex a las 72 horas.

Evaluar la citotoxicidad del BioRoot RCS a las 24 horas.

Evaluar la citotoxicidad del BioRoot RCS a las 48 horas.

Evaluar la citotoxicidad del BioRoot RCS a las 72 horas.

Evaluar la citotoxicidad del Endosequence BC sealer a las 24 horas.

Evaluar la citotoxicidad del Endosequence BC sealer a las 48 horas.

Evaluar la citotoxicidad del Endosequence BC sealer a las 72 horas.

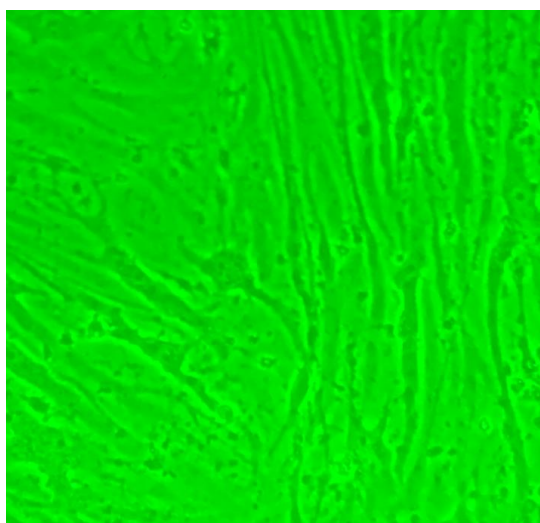
Comparar la citotoxicidad entre los tres cementos selladores.

Materiales y Métodos.

En esta investigación se incluyen tres cementos selladores con base en silicato de calcio (biocerámicos): MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC sealer (Brasseler). Se evaluó la citotoxicidad a las 24 horas, 48 horas y 72 horas por medio de reducción de MTT.

Cultivo celular.

Los fibroblastos gingivales se obtuvieron de tejido sano de pacientes de la clínica de cirugía maxilofacial; se cortaron quirúrgicamente del maxilar y se lavaron por 6 ocasiones con solución de Hanks suplementado con penicilina/estreptomicina/fungizona. El tejido gingival se colocó en cajas petri que contenían DMEM (Dulbeccos Modify Eagly Medium) suplementado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina/fungizona y 10% de FBS. El explante se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂.



La cantidad de células se determinó en un contador de células. El número obtenido se dividió entre el número de muestras y se determinaron 15000 células por pozo.

Preparación de los cementos selladores.

Se comenzó la preparación de los cementos selladores como lo indica el fabricante (Figura 1). Utilizando una loseta de papel encerado y una espátula de plástico estéril para evitar la contaminación de las muestras. Se colocó la misma

porción de cada cemento sellador en el fondo de cada pozo midiendo 1 ml. con una pipeta en el orden que se muestra en la figura 2.

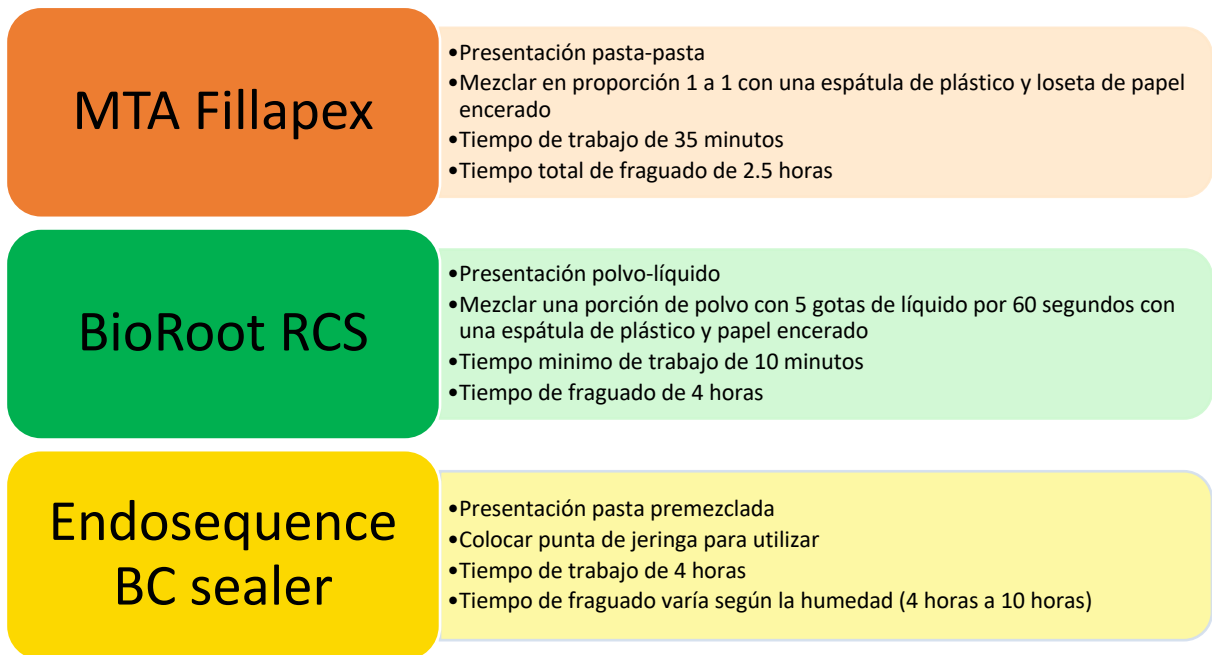


Figura 1. Se indica la presentación, mezcla, tiempo de trabajo y tiempo de fraguado de los tres cementos selladores utilizados.

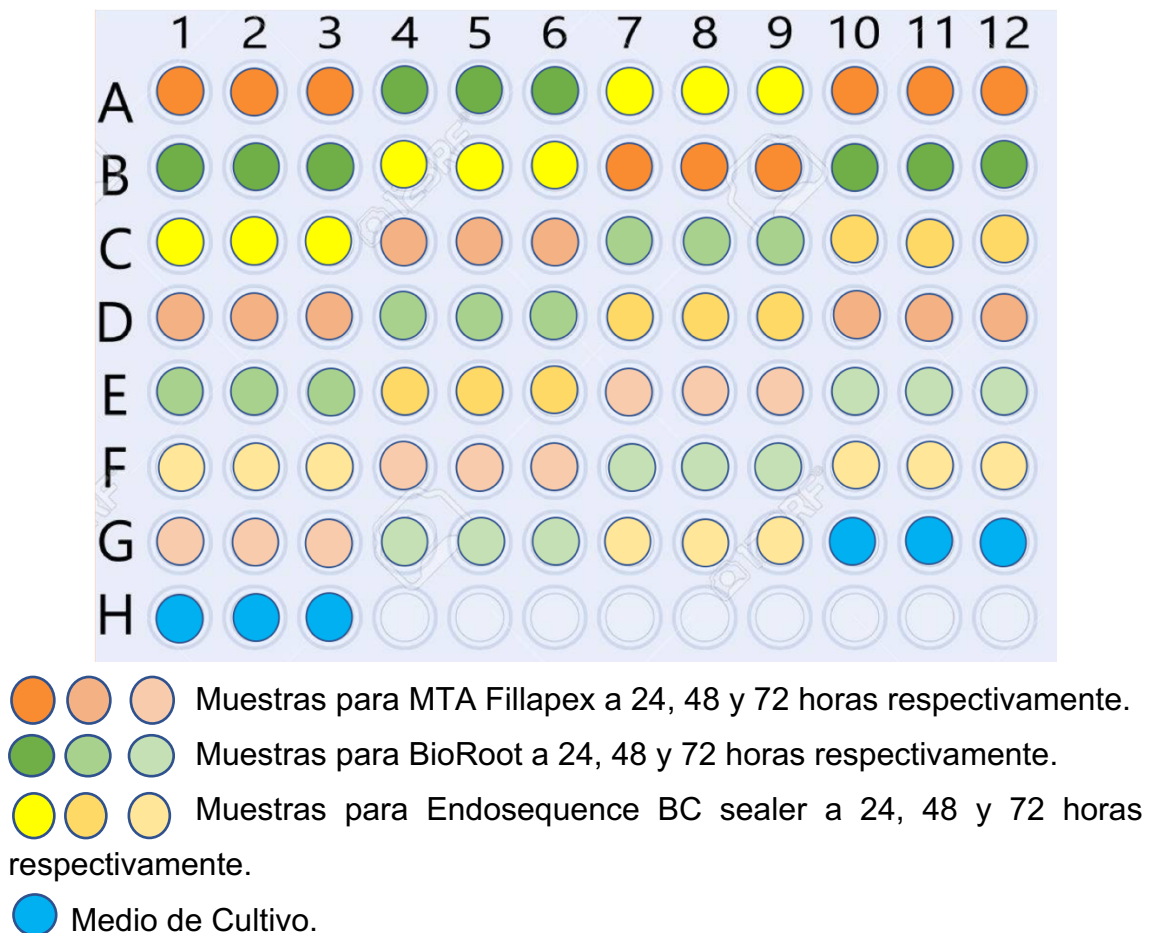
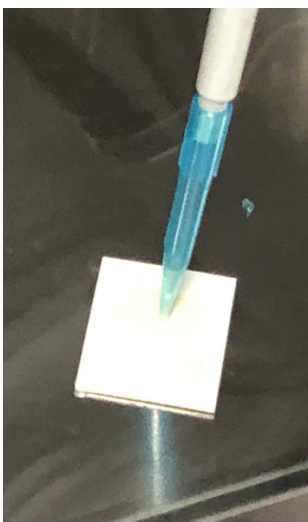
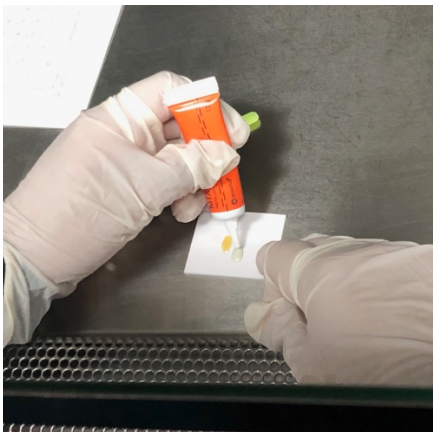


Figura 2. Se ejemplifica la colocación de las muestras en la caja de 96 pozos.

Día 1

Se prepararon los cementos para las pruebas de citotoxicidad de 72 horas. Se colocó 1 ml. de cada cemento en los pozos indicados como se muestra en la figura 2. Todas las pruebas se realizaron a modo de 3 por triplicado. Se colocaron los fibroblastos sobre el cemento fraguado que se encuentra al fondo de los pozos.



Cuando se prepararon las muestras se incuban a 37° C a una atmósfera de 5% de CO².



Dia 2

Se prepararon los cementos para las pruebas de citotoxicidad de 48 horas. Se colocó 1 ml. de cada cemento en los pozos indicados como se muestra en la figura 2. Todas las pruebas se realizaron a modo de 3 por triplicado. Se colocaron los fibroblastos sobre el cemento fraguado que se encuentra al fondo de los pozos.

Dia 3

Se prepararon los cementos para las pruebas de citotoxicidad de 24 horas. Se colocó 1 ml. de cada cemento en los pozos indicados como se muestra en la figura 2. Todas las pruebas se realizaron a modo de 3 por triplicado. Se colocaron los fibroblastos sobre el cemento fraguado que se encuentra al fondo de los pozos.

Obtención de la proliferación o viabilidad celular.

Al cuarto día se determinó la viabilidad o tasa de proliferación utilizando la prueba bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Primero se recuperó el medio de la caja de 96 pozos y se colocó en otra caja de 96 pozos limpia y estéril (al tener los cementos selladores y ser opacos, no podrían leerse en un espectrofotómetro con la presencia de los cementos selladores).

Después se pesaron 5mg de MTT diluido en 1 ml de DMEM esteril y se agregó a cada muestra. Para cada muestra se esperaron 4 horas para permitir la formación de cristales de formazan. Se colocó isopropanol ácido para disolver esos cristales.

Por último, se realizó la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm para obtener los resultados.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente fórmula:

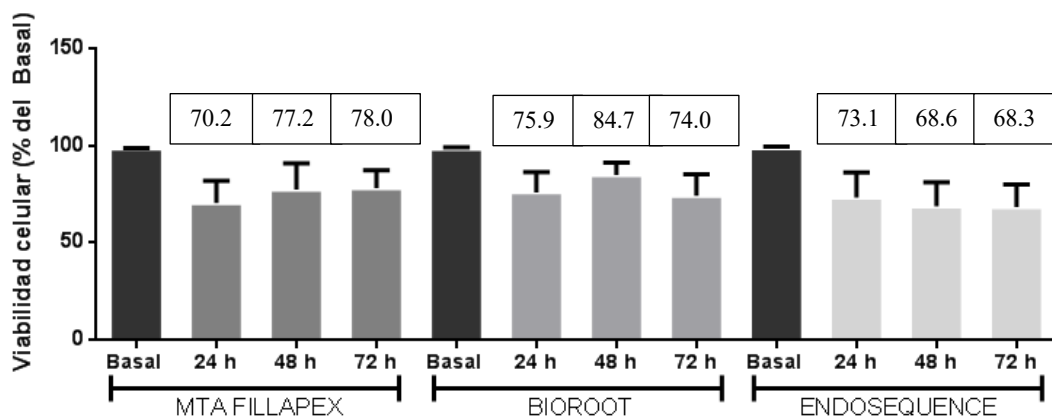
$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Densidad óptica de las células tratadas}}{\text{Densidad óptica de las células control}} \times 100$$

Se repitió el procedimiento para corroborar que los datos fueran correctos.

Se realizó el análisis estadístico de ANOVA.

Resultados.

En la evaluación de la citotoxicidad de MTA Fillapex, BioRoot RCS y Endosequence BC sealer en los fibroblastos gingivales humanos se mostró que todos son citotóxicos para los fibroblastos gingivales humanos. Para las primeras 24 horas el cemento sellador mas citotóxico es el MTA Fillapex y para las 48 y 72 horas el cemento sellador mas citotóxico es el Endosequence. El cemento sellador con menor citotoxicidad para las 24 horas y 48 horas después de ser preparado fue el BioRoot, aunque para las 72 horas después de haberlo preparado, el MTA Fillapex resultó ser el de menor citotoxicidad. Sin embargo realizando la prueba estadística de ANOVA no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto citotóxico de los tres cementos selladores.



Gráfica 1. Citotoxicidad de los tres cementos selladores (MTA Fillapex, BioRoot y Endosequence BC sealer). Estos datos son la media de dos experimentos realizados por triplicado por medio del análisis de ANOVA $p < 0.05$ con respecto al basal. Se muestran diferentes mediciones en % de viabilidad celular para 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Discusión.

En esta investigación se realizó la evaluación de tres cementos selladores endodóncios con base en silicato de calcio (MTA Fillapex de Angelus, BioRoot de Septodont y Endosequence BC sealer de Brasseler) *in vitro* en fibroblastos gingivales humanos.

Con base en los resultados el cemento BioRoot mostró ser el menos citotóxico de los cementos selladores utilizados al tener contacto con el cultivo de fibroblastos gingivales humanos en promedio de las 24, 48 y 72 horas. Éstos resultados coinciden con la investigación de Claudio Poggio y colaboradores en 2017, en donde evaluaron 8 cementos selladores, entre ellos MTA Fillapex, BioRoot y BC sealer. En su investigación se mostró que BioRoot no presentó citotoxicidad en las primeras 24 horas, leve citotoxicidad a las 48 horas y moderada citotoxicidad a las 72 horas en contacto con el mismo tipo de células utilizadas en ésta investigación. En comparación con los otros 7 cementos selladores resultó ser el de menor citotoxicidad. Los resultados entre BC sealer y BioRoot fueron muy similares al igual que en ésta investigación. Sin embargo el MTA Fillapex resultó ser muy citotóxico en su investigación en contraste con nuestros resultados, ya que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre éstos dos cementos selladores.²⁵

En nuestro estudio se mostró que el cemento más citotóxico es el Endosequence BC sealer, que en comparación con el estudio de Sara A. Alsubait y colaboradores en 2017 resultó ser mejor que el BioRoot aunque de igual manera no resultó tener una diferencia estadísticamente significativa. En ese estudio se utilizaron células madre mesenquimales de médula ósea humana (hMSCs) por lo que es importante considerar que los efectos citotóxicos pueden variar dependiendo del tipo de célula al que se exponen los materiales.²⁶

De igual manera, en el estudio de S. Jung y colaboradores en 2018 se utilizaron osteoblastos humanos comparando el MTA Fillapex, BioRoot y AH-Plus. Siendo el cemento de menor citotoxicidad el BioRoot al tener una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros dos cementos.²⁷

El gold standard de los cementos selladores es el cemento sellador a base de resina, por lo que en muchas investigaciones comparan los cementos selladores que se desean investigar con éste cemento. En la investigación de M. Z. Scelza et al. En 2011 se comparan 4 tipos diferentes de cementos selladores (a base de hidróxido de calcio, silicato de calcio, resina y óxido de zinc y eugenol). En sus resultados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cementos utilizados.²⁸

Es importante mencionar que existen diferentes métodos para evaluar la citotoxicidad de los materiales. En el artículo de M. Z. Scelza et al. se evaluó la citotoxicidad de los materiales utilizando tres métodos diferentes. Entre ellos, la técnica de reducción del MTT para medir la actividad mitocondrial de las células, utilizaron el método de rojo neutro para medir la integridad de la membrana celular y por último utilizaron la tinción con cristal violeta para medir el total de las células adheridas a la caja de 96 pozos. Los resultados de los tres métodos utilizados no tuvieron diferencias estadísticamente significativas.²⁸

Conclusiones.

Todos los cementos selladores presentan un grado de citotoxicidad que es variable con el tiempo sobre los fibroblastos gingivales humanos; sin embargo son biotolerables por los tejidos periapicales.

Todos los cementos selladores tienen contacto con los tejidos periapicales, por lo que es importante elegir el material que sea mas compatible o tolerable con esos tejidos para evitar destrucción celular y promover la reparación celular.

Tomando en cuenta el conocimiento de la citotoxicidad de cada material, debemos elegir el cemento que mejor funcione en nuestras manos y se adapte a nuestra técnica de obturación y/o a cada caso clínico.

Referencias Bibliográficas.

1. Leonardo M, Almeida W, Silva L, Utrilla L. Histological evaluation of the response of apical tissues to zinc oxide - eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14: 257.
2. Grossman, L. An improved root canal cement. *J. Am. Dent. Assoc.* 1958; 56:381-5.
3. Leyhausen, G.; Heil, J.; Reinfferscheld, G.; Waldman, P. Geurtsen, W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH Plus®. *J. Endod.* 1999; 25:109-13.
4. Osorio, R.; Hefti, A.; Vertucci, F. Shawley A. Cytotoxicity of endodontic materials. *J. Endod.* 1998; 24:91-6.
5. Hernández Vigueras S, Piñero Miranda S, Aracena Rojas S, Alcántara Dufeu R. Comparación de la calidad de la obturación radicular obtenida con el sistema fluido de obturación radicular v/s técnica de compactación lateral. *Avances en Odontoestomatología.* 2007; 24 (4): 255-260.
6. Ingle, J.; West, J.; (1996). Obturación del espacio radicular. En *Endodoncia (Ingle y Backland Editores)* 4ta. Edición. Edit. McGraw-Hill. México. 1996; 4: 239-323.
7. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J,* 1999; 257-82.
8. Hench L. The story of Bioglass®, *J Mater Sci: Mater Med* 2006;17:967–978
9. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res* 2012; 91: 454–459.
10. Malhotra S, Hedge M, Shetty C. Bioceramic Technology in Endodontics, *Br J Med Res* 2014; 4(12): 2446-2454
11. Koch K, et al. Bioceramics, Part I: The Clinician's Viewpoint, *Dentistry Today* 2012; 1: 130-136
12. Zhang W, Li Z, Peng. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(9): 769.

13. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against enterococcus faecalis. J Endod. 2009; 35(7): 1051-5.
14. Jingzhi M, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. J Endod. 2011; 37(6): 793-8.
15. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of EndoSequence Root Repair Material. OOOOE. 2010; 109(3): 122-5
16. Ciasca M, Aminoshariae A, Jin G, Montagnese T, Mickel A. A Comparison of the Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Production of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA in Human Oseoblast Cell Culture Using Reverse- Transcriptase Polymerase Chain Reaction. J Endod. 2012; 38(6); 486-9.
17. Chang M C, Lin D L et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. Int Endod J. 2010; 43: 251-257.
18. Wang F, et al. Study on apical sealing ability of iRoot SP root canal sealer. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2013; 22(2):156-9
19. Zhang W, Zhi L, Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. OOOOE 2009; 107;79-82.
20. Candeiro GTM, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, Azambuja-Júnior N, Marques MM, Cai S, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. Int Endod J. 2015;1-6
21. Pawar S S, Pujar M A et al. Evaluation of the apical sealing ability of bioceramic sealer, AH-Plus & epiphany: An *in vitro* study. J Conserv Dent. 2014; 17(6):579-582.
22. Zhou H, Du T, Shen Y, Wang Z, Zheng Y, Haapasalo M. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-containing Endodontic Sealers. J Endod. 2015;41(1):56-61.
23. Hess D, Solomon E, Spears R, He J. Retreatability of a Bioceramic Root Canal Sealing Material. J Endod. 2011;37(11):1547-9.
24. Ersev H, Yilmaz B et al. The efficacy of ProTaper Universal rotary retreatment instrumentation to remove single gutta-percha cones cemented with several endodontic sealers. Int Endod J 2012; 45: 756-762.

25. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative Cytotoxicity Evaluation of Eight Root Canal Sealers. *J Clin Esp Dent*. 2017; 9 (4): 574-8
26. Alsubait S A, Al Ajlan R, et al. Cytotoxicity of Different Concentrations of Three Root Canal Sealers on Human Mesenchymal Stem Cells. *MDPI J Biomolecules*. 2018; 8 (68).
27. Jung S, Sielker S, et al. Cytotoxic Effects of Four Different Root Canal Sealers on Human Osteoblasts. *Plos One*. 2018; 23 (3).
28. Scelza M Z, Linhares A B, et al. A mutiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012; 45 (1): 12-8.