



**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 GRADO 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 GUTÉRRIZ VENEGAS

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.

Evaluation of cytotoxicity of three bioceramic materials used in endodontics: MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) and Endosequence BC sealer (Brasseler) in human gingival fibroblasts.

Javier Sánchez de Pablo,**Enrique Gerardo Chávez Bolado **Gloria Gutierrez Venegas

Resumen

Introducción:

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.

Los cementos selladores son materiales que contribuyen al sellado hermético junto con la gutapercha.

Actualmente, se han introducido en el área endodóncica materiales biocerámicos como el MTA Fillapex, BioRoot RCS y Endosequence BC sealer que buscan mejorar el sellado y la biocompatibilidad; sin embargo, poco se sabe de su toxicidad en cultivo de fibroblastos.

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

Materiales y métodos: Los cementos selladores MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC Sealer (Brasseler) se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas posteriores a su fraguado en contacto con fibroblastos gingivales humanos. La citotoxicidad

fue evaluada a través de la actividad metabólica mitocondrial con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT). El análisis estadístico se realizó por ANOVA.

Resultados: 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.

Conclusión: Los cementos selladores MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC Sealer (Brasseler) presentan un grado de citotoxicidad que es variable con el tiempo sobre los fibroblastos gingivales humanos; sin embargo son biotolerables por los tejidos periapicales.

Abstract

Introduction: The use of root canal sealers involve intimate contact between the material and the periapical tissues by the release of by-products through the apical foramen, hence the importance of knowing the cytotoxicity against those tissues.

Currently, bioceramic materials such as MTA Fillapex, BioRoot RCS and Endosequence BC sealer are looking forward to improve biocompatibility and sealing properties. However, little is known about its cytotoxicity against fibroblasts.

Objective: To evaluate the cytotoxicity of MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) and Endosequence BC Sealer (Brasseler) on human gingival fibroblasts.

Material and methods: The root canal sealers MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) and Endosequence BC Sealer (Brasseler) were evaluated at 24, 48 and 72 hours after setting in contact with human gingival fibroblasts. The cytotoxicity and cell viability was evaluated through mitochondrial metabolic activity with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Statistical analysis was performed by ANOVA.

Results: For the first 24 hours the MTA Fillapex was the most cytotoxic and for the 48 and 72 hours the Endosequence BC sealer was the most cytotoxic. The root canal sealer with least cytotoxicity for 24 and 48 hours was the BioRoot RCS. In contrast, the MTA Fillapex was the least cytotoxic at 72 hours. However, there wasn't statistical difference between the sealers applying the ANOVA test.

Conclusion: The root canal sealers: MTA Fillapex (Angelus), BioRoot RCS (Septodont) y Endosequence BC Sealer (Brasseler) are cytotoxic with different results through time on human gingival fibroblasts; however they are biocompatible by the periapical tissues.

Palabras clave: Citotoxicidad, cementos selladores endodóncicos, MTT, fibroblastos gingivales humanos, biocerámicos.

Key words: Cytotoxicity, root canal sealers, MTT, human gingival fibroblasts, bioceramics.

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 (SiO₂), carbonato de sodio (Na₂CO₃), carbonato de calcio o caliza (CaCO₃) 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 número de células presentes en el cultivo que se mide mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. Ésta reacción va a tener un valor numérico al utilizar un espectrofotómetro.

ANTECEDENTES

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 al¹ concluyen que serían menos citotóxicos que los cementos con base en resina epóxica como el AH Plus, mientras que Zhang H. et al² 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 M³ en su estudio compara su biocompatibilidad con la del MTA, concluyendo que son muy similares, resultado que concuerda con el obtenido por Alanezi AZ⁴, quien concluye que poseen una biocompatibilidad comparable con MTA gris y blanco.

Ciasa M⁵ 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 al⁶, producen menos mediadores inflamatorios que el cemento Sealapex.

En relación a su capacidad de sellado apical, tanto Wang F⁷ et al como Zhang W⁸ et al concluyen que son muy similares al AH Plus, mientras que Pawar et al⁹ 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 GTM¹⁰ los selladores con base en silicato de calcio son menos citotóxicos en comparación con el sellador AH Plus, estos resultados coinciden con Zhang W⁸ 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 H¹¹ 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.

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.

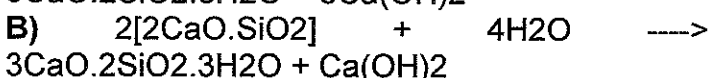
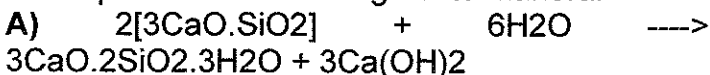
Otra característica que poseen es su capacidad de producir hidroxiapatita durante su proceso de fraguado, generando un enlace químico entre la dentina y el material de obturación. Presentan además un pH muy alcalino (12,8) durante las

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.¹²

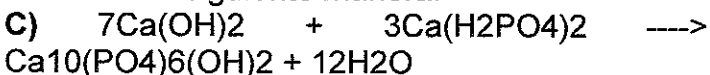
Mecanismo de Acción.

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.¹²

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.

Preparación de los fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos de primera línea que se utilizaron se conservaron a 37 °C y 5% de CO₂. Para poder utilizar esos fibroblastos se añadió tripsina y se despegaron las células para que floten en el medio.

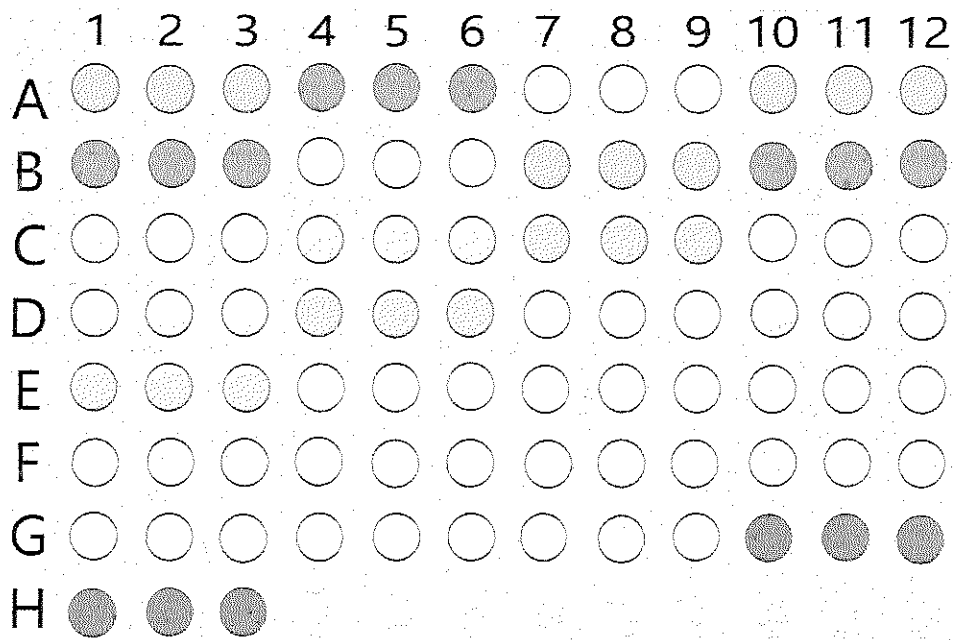
Se recuperaron con una pipeta y se vertieron en un tubo de 15 ml para que se centrifuguen. Se eliminó el sobrenadante y por último se añadió DMEM (Dulbeccos Modify Eagly Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (BFS) para resuspenderlas en el medio, de ésta forma se pueden colocar las células en cajas de 96 pozos. La cantidad de células obtenidas se dividió entre el número de muestras y se determinó que habrán 15000 células por cada pozo.

La preparación del medio de cultivo quedó de la siguiente manera:

48.5 microl DMEM + 1.5 ml de DMSO (Dimetil sulfoxido) + 10 microlitros de células + 40 microlitros de DMEM

Preparación de los cementos selladores.

Se comenzó la preparación de los cementos selladores como lo indica el fabricante. 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.



- ○ ○ Muestras para MTA Fillapex a 24, 48 y 72 horas respectivamente.
- ○ ○ Muestras para BioRoot a 24, 48 y 72 horas respectivamente.
- ○ ○ Muestras para Endosequence BC sealer a 24, 48 y 72 horas respectivamente.
- Medio de Cultivo.

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.

Día 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.

Día 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 tasa de 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.

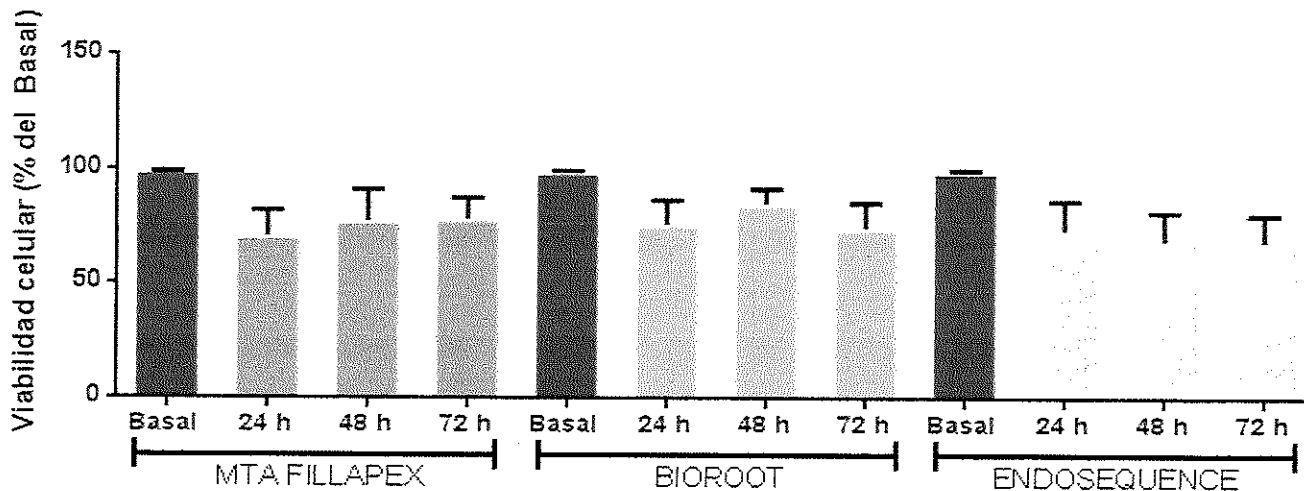
El porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{D.O. de las células tratadas} \times 100}{\text{D.O. de las células control}}$$

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

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 (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.¹³

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.¹⁴

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.¹⁵

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.¹⁶

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.¹⁶

CONCLUSIÓN

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

1. Zhang W, Li Z, Peng. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J*. 2010; 43(9): 769.
2. 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.
3. Jingzhi M, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *J Endod*. 2011; 37(6): 793-8.
4. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of EndoSequence Root Repair Material. *OOOOE*. 2010; 109(3): 122-5
5. 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 Osteoblast Cell Culture Using Reverse- Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2012; 38(6); 486-9.
6. 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.
7. 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
8. Zhang W, Zhi L, Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *OOOOE* 2009; 107;79-82.
9. 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.
10. 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
11. 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.
12. Koch K, et al. Bioceramics, Part I: The Clinician's Viewpoint, *Dentistry Today* 2012; 1: 130-136
13. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative Citotoxicity Evaluation of Eight Root Canal Sealers. *J Clin Esp Dent*. 2017; 9 (4): 574-8
14. Alsubait S A, Al Ajlan R, et al. Citotoxicity of Different Concentrations of Three Root Canal Sealers on Human Mesenchymal Stem Cells. *MDPI J Biomolecules*. 2018; 8 (68).
15. Jung S, Sielker S, et al. Citotoxic Effects of Four Different Root Canal Sealers on Human Osteoblasts. *Plos One*. 2018; 23 (3).
16. 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.