



**TESIS DOCTORAL**

**Departamento de Estomatología**

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**“Evaluación del efecto de los selladores con base de biosilicatos  
en células madre de origen dental”**

Tesis doctoral presentada por:

Pablo Sebastian Ortolani Seltenerich

Dirigida por:

Leopoldo Forner Navarro

Carmen Llena Puy

Francisco Javier Rodríguez Lozano

Valencia, 2015





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  
Departament d'Estomatologia

Unitat Docent de Patologia i Terapèutica Dentàries

D. Leopoldo Forner Navarro y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Carmen Llena Puy, Profesor y Profesora Titulares del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

hacen constar que,

la tesis doctoral titulada “Evaluación del efecto de los selladores con base de biosilicatos en células madre de origen dental”, presentada por el licenciado D. Pablo Sebastián Ortolani Seltenerich, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Lo que firmamos a los efectos oportunos,

Prof. Dr. Forner Navarro    Prof<sup>a</sup> Dra. Llena Puy

Valencia, 14 de septiembre de 2015





***Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física***

El Dr. D. Francisco Javier Rodríguez Lozano, Profesor Asociado del Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia.

hace constar que,

la Tesis Doctoral titulada “Evaluación del efecto de los selladores con base de biosilicatos en células madre de origen dental”, presentada por el licenciado D. Pablo Sebastián Ortolani Seltenerich, ha sido realizada bajo mi dirección y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Lo que firmamos a los efectos oportunos,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Rodríguez Lozano'.

Dr. Rodríguez Lozano

Valencia, 14 de septiembre de 2015



# AGRADECIMIENTOS





A mi mujer y a mi hijo, por todas las horas que mi profesión nos restan de estar juntos...



# Índice.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1. Antecedentes	1
1.1 Finalidad de la obturación del sistema de conductos.	1
1.2. La obturación de los conductos radiculares.	3
1.2.1 Materiales	3
1.2.2 Técnicas.	18
2. Selladores endodóncicos basados en Biosilicatos.	22
2.1 Los materiales biocerámicos	22
2.2 Características de los cementos biocerámicos.	25
2.2.1 TotalFill BC Sealer.	25
2.2.2 Fillapex.	30
3. Técnicas de estudios de los selladores.	36
3.1. Clasificación de los procedimientos de evaluación de los cementos selladores.	37
3.2. Estudio de las células madre.	38
3.2.1. Tipos de células madre.	38
3.2.2. Células madre Mesenquimales.	40
3.2.3 Células madre dentales	41
4. Justificación.	52
5. Objetivos	54
II. MATERIAL Y MÉTODO	
1.1 Obtención de las células madre del ligamento periodontal	57
1.2 Ensayos Experimental	57
1.2.1 Materiales.	57
1.2.2 Preparación de los extractos.	58
1.2.3 Ensayo de proliferación celular MTT.	59
1.2.4. Ensayo de Apoptosis celular.	60
1.2.5 Ensayo de Migración celular.	61
1.2.6 Ensayo de Adhesión celular.	62

1.2.7 Procesado de las muestras y microscopia electrónica de barrido	63
1.2.8 Análisis estadístico.	63
III. Resultados y desarrollo argumental	
1. Resultados.	66
1.1 Obtención de las células madre del ligamento periodontal	66
1.2 Ensayo experimental.	67
1.2.1 Ensayo de proliferación celular MTT.	67
1.2.2 Efecto de los diferentes selladores en la morfología celular y apoptosis.	69
1.2.3 Ensayo de Migración celular.	73
1.2.4 Ensayo de Adhesión celular.	77
1.2.5 Estudio microscópico de la morfología celular.	80
2. Discusión.	
2.1 Sobre la metodología	83
2.2 Sobre los resultados.	86
IV. Conclusiones.	112
V. Bibliografía.	114





# **I. INTRODUCCIÓN GENERAL**





# **1. ANTECEDENTES.**

## **1.1. Finalidad de la obturación del sistema de conductos.**

El objetivo principal del tratamiento endodóncico es la prevención de la aparición de periodontitis apical o la curación de esta si ya existe (Ingle y cols, 2002).

La causa principal de la presencia de patología pulpar y periapical es la presencia de microorganismos y sus subproductos en el sistema de conductos (Takehashi y cols., 1965)

Existe la necesidad, desde un punto de vista biológico, de eliminar las bacterias, los productos de degradación de las proteínas y las toxinas que existen en los conductos con necrosis pulpar (Gutmann y Witherspoon, 2002).

El éxito en los tratamientos endodóncicos depende del control microbiológico en el conducto radicular.

Esta eliminación se debe de producir mediante la limpieza y conformación de todo el sistema de conductos radiculares, y tras conseguir este objetivo se realizará la obturación del sistema de conductos radiculares (Maniglia-Ferreira y cols, 2008).

La fase final del tratamiento endodóncico consiste en el cierre del foramen apical a la altura del límite cemento-dentinario con algún material inerte (Weine 1995), además de impedir la filtración coronal gracias a la correspondiente reconstrucción coronal (Ray y Trope, 1995).

El objetivo principal de la obturación de conductos es la eliminación de todas las vías de filtración desde la cavidad oral o tejidos periradiculares hacia el interior del sistema de conductos

Según la Asociación Americana de Endodoncia (AAE, 1998) la obturación es: "El relleno tridimensional de todo el sistema radicular lo más cerca del límite cemento-dentinario. Se deben utilizar mínimas cantidades de un sellador biocompatible junto con el cono, para conseguir un sellado correcto y el aspecto radiográfico debe ser de una obturación densa y tridimensionalmente sin gran sobreextensión o subobturación que deje el conducto abierto."

Históricamente, la obturación ha sido considerada como el objetivo final de los

procedimientos endodónticos (Schilder, 1967), concepto que ha sido abandonado, ya que no es un objetivo, sino el último paso a realizar dentro de la terapia endodóntica para conseguir un éxito en el tratamiento, el cual no existirá sin una limpieza del conducto inadecuada. La causa primaria de los fracasos de los procedimientos endodónticos es la falta de eliminación de estos factores etiológicos (Gutmann y Witherspoon, 2002).

Durante el proceso de obturación se debe conseguir una obturación tridimensional del conducto radicular y de todos los conductos accesorios (Schilder, 1967) creando un sellado hermético a lo largo de todo el sistema de conductos radiculares, desde la apertura coronaria hasta su terminación apical. Este hermetismo debe impedir el paso de fluidos o bacterias (Vicente-Gomez, 2003).

Otro de los objetivos es sellar dentro del sistema todos los irritantes que no sea posible eliminar por completo durante el proceso de limpieza y conformación (Gutmann y Witherspoon, 2002).

La calidad final de la obturación está en su capacidad de sellar el sistema de conductos radiculares de los tejidos periapicales (Schilder, 1967), siendo la estabilidad tridimensional del material de sellado del sistema de conductos uno de los criterios más importantes para el éxito en los procedimientos endodónticos (Maniglia-Ferreira y cols, 2007).

La obturación es condición indispensable para el éxito de la terapia endodóntica (Maisto, 1967). Un sellado inadecuado del conducto, sobre todo en la zona apical, es una de las principales causas de fracaso de los tratamientos endodónticos.

Los límites anatómicos del conducto radicular son la unión cemento-dentinaria, apicalmente, y la entrada de la cámara pulpar, coronalmente. La obturación del conducto debe ocupar todo este espacio, teniendo como límite apical esta unión cemento-dentinaria, la cual se encuentra entre 0,5 y 0,7 mm de la superficie exterior del foramen apical. Más allá de este punto empiezan las estructuras periodontales (Ingle y cols., 2002).

## **1.2. La obturación de los conductos radiculares.**

El proceso de obturación del sistema de conductos radiculares, al igual que otros aspectos de la Odontología, ha seguido, y continúa teniendo, una constante y a veces rápida evolución en cuanto a los materiales empleados y a las técnicas con las que estos se utilizan.

### **1.2.1. Materiales.**

A lo largo de los años se han descrito en varias ocasiones las características ideales que deberían cumplir los materiales de obturación.

Para Brownle -1900- (citado por Weine, 1995) un material de obturación debería ser:

- Flexible y amoldable.
- Capaz de rellenar y sellar completamente el ápice.
- No sufra expansión ni contracción.
- Impermeable a los fluidos.
- Antiséptico.
- No altere el color del diente.
- Químicamente neutro.
- Sin sabor ni olor.

Según Maisto (Maisto, 1967), debería cumplir los siguientes requisitos:

- Ser de fácil de manipulación e introducción en el interior de los conductos.
- Tener suficiente plasticidad como para adaptarse a las paredes de los mismos.

- Ser antiséptico.
- Tener pH neutro.
- No ser irritante para la zona periapical.
- Ser mal conductor de los cambios térmicos.
- No sufrir variaciones volumétricas (contracción).
- No ser poroso ni absorber humedad.
- No producir cambios en la coloración del diente.
- No reabsorberse dentro del conducto.
- Poder ser retirado con facilidad.
- No provocar reacciones alérgicas.

Hasta la actualidad no se ha encontrado un material que cumpla todas estas características.

La cantidad de materiales utilizados a lo largo de la historia para la obturación de conductos radiculares ha sido muy variado, dentro estos podemos encontrar: algodón, amianto, caña de bambú, cementos medicamentosos, cera, cloro-resinas, cobre, dentina, resinas epóxicas, fibra de vidrio, fosfato tricálcico, gutapercha, hidróxido de calcio, yodoformo, marfil, oro, parafina, pastas antisépticas, plásticos, plata, plomo, resinas vinílicas e instrumentos de acero (Maisto, 1967). De todos estos materiales muy pocos tiene una vigencia actual.

#### 1.2.1.1. PASTAS ENDODÓNICAS.

Las pastes que han sido utilizadas como materiales de obturación se resumen en la tabla I. (Maisto, 1967)

<b>Pastas antisépticas, con acción terapéutica</b>	<b>Pasta yodofórmica de Walkhoff</b>
	Pasta de Maisto
<b>Pastas alcalinas, (hidróxido de calcio).</b>	
<b>Cementos medicamentosos,</b>	Cemento de Wach.
	Cemento de Badan.
	Cemento de Grossman.
	Cemento N2.
	Cemento de Rickert.
	Cemento de Roy.
<b>Materiales plásticos. (Se realizaron estudios con Acrílicos, polietilenos, nylon, teflón, resinas vinílicas y epoxi-resinas)</b>	AH-26.
	AH Plus
	Diaket.
<b>Materiales inertes.</b>	Cloro-resina de Callahan
	Cloropercha de Nygaard Ostby.

Tabla 1. Pastas utilizadas como materiales de obturación (Maisto 1967)

### 1.2.1.2. MATERIALES SÓLIDOS.

#### Conos de plata.

En 1941, Jasper introdujo el uso de puntas de plata como material de obturación en endodoncia (Weine, 1995). La rigidez de este material facilitaba su introducción en el conducto, sin embargo, su incapacidad para adaptarse a las irregularidades del conducto radicular (Gutmann y Witherspoon, 2002) y a la anatomía del foramen (Schilder, 1967) debido a falta de plasticidad es una de las mayores limitaciones que tenemos en su uso, ya que permite que existan

filtraciones.

Las puntas de plata sufren un proceso de corrosión, consecuencia de la oxidación. (Weine, 1995). Los productos derivados de esta corrosión resultan ser altamente citotóxicos (Seltzer y cols., 1972), y la degradación del material provoca un sellado apical o un cierre coronal incorrecto (Schilder, 1967). Los productos derivados de la corrosión pueden causar una inflamación perirradicular crónica, lo que puede inducir a una resorción radicular.

La colocación de postes y pernos no es posible con puntas de plata intactas, con lo que hay que retratar el caso y sustituirlas por otro material. Además la extracción de las puntas de planta puede ser muy difícil. Al igual que en los casos en los que se deba realizar cirugía periapical, porque plantea muchos problemas a la hora de hacer las retropreparaciones, lo cual comprometería el resultado de este tratamiento.

En el año 2007 la Asociación americana de endodoncistas (AAE, 2007) afirmó que : "Las puntas de plata han sido un material históricamente aceptado para la obturación de conductos radiculares, sin embargo, nuevas técnicas y mejoras en los materiales pueden proporcionar al clínico opciones mejores. Las puntas de plata sufren un proceso de corrosión espontáneo en presencia de suero o sangre, debido a su comportamiento electroquímico inestable. Los productos derivados de esta corrosión provocan tinciones irreversibles tanto en los dientes como en los tejidos periféricos."

Gutapercha

Aunque no existe un material ideal, la gutapercha es el material más frecuentemente utilizado para la obturación de los conductos radiculares, ya que satisface la mayoría de los principios que requiere un material de obturación.

La gutapercha es un polímero orgánico natural, cuyo nombre derivado de las palabras malayas *gutih* -pegamento- y *pertja* -árbol del que procede- (Prakash y cols., 2002)

La principal característica de las moléculas orgánicas de la gutapercha es una

cadena de átomos enlazados covalentemente, construida por la unión química repetitiva de unidades pequeñas y sencillas. (Goodman y cols., 1974)

Poseen características elásticas y algunas propiedades de los líquidos viscosos, por lo que se pueden denominar viscoelásticos. Por lo que si se aplica una cierta cantidad de fuerza durante un tiempo determinado para conseguir su deformación plástica (Friedman y cols., 1977) .

Tiene una toxicidad mínima, irritabilidad tisular escasa y su actividad alérgica es la menor entre todos los materiales disponibles, cuando permanece dentro del sistema de conductos radiculares. En caso de sobreextensión del cono a los tejidos perirradiculares, la gutapercha se considera bien tolerada si el conducto está limpio y bien sellado.

Para la obturación de conductos la gutapercha se fabrica en forma de conos de tamaño estandarizado o no estandarizado. Los tamaños normalizados se emparejan con los tamaños ISO de las limas endodóncicas. Actualmente existen conos que presentan las conicidad en coincidencia con las conicidad de las limas de los diferentes sistemas de conformación de conductos. (Spångberg 2002).

La gutapercha es soluble en cloroformo, eucaliptol, xilol, benceno y disulfuro de carbono (Friedman y cols., 1977).

Los conos de gutapercha actuales tiene una parte orgánica (polímero de gutapercha y ceras/resinas) y una inorgánica (óxido de zinc, sulfato de Bario, colorantes, antioxidantes, etc. (Maniglia-Ferreira y cols., 2007). No presenta radiopacidad, por lo que es necesario añadirles sustancias radiopacas para su mejor control radiográfico . (Maisto,1967)

Las propiedades termo-mecánicas van a depender directamente de su composición. La adición de rellenos inorgánicos y las alteraciones térmicas producidas durante su manufacturación pueden alterar a las propiedades del material (Friedman y cols., 1977; Tanomaru-Filho y cols., 2007) La gran heterogeneidad en la composiciones de los diferentes tipos de conos de

gutapercha existentes en el mercado puede explicar los diferentes comportamientos térmicos de cada tipo de gutapercha en el uso clínico. (Marciano y Michalesco, 1989).

La degradación de la gutapercha se puede producir con la temperatura, la exposición a la luz, a los agentes químicos (oxígeno, ozono, metales) y ante agentes biológicos (enzimas o microorganismos). (Maniglia-Ferreira y cols., 2008).

La temperatura afecta radicalmente el estado físico y el ordenamiento molecular de los polímeros lineales. Con una temperatura suficientemente alta el polímero se funde y pasa a un estado amorfo y gomoso, y al enfriarse la gutapercha se solidifica.

En 1942, Bunn describió que el polímero podía existir en dos formas cristalinas distintas, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Esto dependerá del proceso de cristalización durante el periodo de enfriamiento. La mayoría de la gutapercha comercial existe en la forma cristalina  $\beta$ .

Los cambios en la estructura cristalográfica producen cambios en el comportamiento del material irreversibles (Combe y cols., 2001) y sobre todo se producen cambios volumétricos irreversibles (Maniglia-Ferreira y cols., 2007).

Durante el uso clínico la gutapercha tiene que ser plastificada bajo condiciones adecuadas y controladas, debido a que se ha observado, tras la aplicación de temperatura, con un calentamiento superior a los 130°C se producen cambios físicos en material y una degradación del polímero. (Maniglia-Ferreira y cols., 2007). Esto una reducción en su masa que disminuye su capacidad de sellado del conducto. (Maniglia-Ferreira y cols., 2008)

La fluidez y el punto de fusión pueden ser alterados modificando la composición; pero el hecho de que exista una contracción volumétrica durante el período de cristalización no puede ser evitada cuando usamos gutapercha (Tsukada y cols., 2004)

#### 1.2.1.3. CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNICOS.



La mayoría de técnicas actuales de obturación de conductos incluyen el uso combinado de un material de obturación y de un cemento sellador. El cuerpo del material principal actúa como pistón en un sellador fluido causando la adaptación de este a las paredes del conducto.

La capa de sellador debe ser lo más fina posible para minimizar los cambios dimensionales durante y después del fraguado.

El uso del sellador es independiente de la técnica utilizada. En un estudio comparativo entre condensación lateral y compactación vertical; sin el uso de un sellador ambas técnicas están asociadas a una mayor filtración (Schafer, 2002; Wu, 2004).

A pesar de que las técnicas en las que se utiliza calor mejoran la compactación de la gutapercha, cuando las comparamos con las técnicas de condensación lateral, continúa siendo necesario el uso de selladores para evitar la existencia de espacios, posibles vías de filtración, entre las paredes dentinarias y el cuerpo central del material de obturación. (Nelson, 2000).

Las características que debería tener un sellador ideal son que no contraiga, no soluble en tejidos, no absorción de agua, no produzca discoloración, que se adhiera a la dentina y al material principal de obturación, que produzca un sellado hermético, antimicrobiano y biocompatible, radiopaco y que estimule una curación apical. También debería facilitar la colocación del cono de gutapercha actuando como lubricante.

Además de estas características, descritas por distintos autores, como ya se ha comentado, se puede agregar que los cementos selladores no deben ser mutagénicos ni carcinogénicos (Leyhausen y cols., 1999), no deben provocar una reacción inmunitaria en los tejidos, no deben ser modificados en presencia de humedad ni corroerse (Osorio y cols., 1998).

Puede existir una extrusión involuntaria de cemento durante la fase de la obturación, pudiendo causar un proceso inflamatorio o retrasar la cicatrización si la compatibilidad con los tejidos vivos no es la adecuada. (Pertot y cols., 1992).

Hasta el momento no existe un cemento sellador que cumpla con todos los requisitos anteriormente mencionados.

Las dos características más importantes en su uso clínico son que produzca un sellado hermético y que posea una toxicidad mínima. Esta es particularmente importante si el sellador se extruye a nivel apical, porque podría provocar una reacción inflamatoria que interrumpa o dificulte la curación de los tejidos periapicales. Aunque todos los selladores presentan algún grado de toxicidad, esta disminuye con el tiempo.

El sellado puede ser mecánico debido a las propiedades físicas del sellador, pero también puede ser de origen biológico. En este caso, el material de obturación debe inducir la formación de tejido duro a partir de las células del ligamento periodontal, aislando el canal radicular del tejido periradicular y estimulando la curación del tejido periapical afectado. (Camps, 2015 )

Dependiendo de su composición, los cementos endodóncicos contemporáneos pueden agruparse en distintos tipos, de los cuales se describen sus características más relevantes a continuación, excepto para el grupo de los materiales biocerámicos, de reciente aparición en el ámbito endodóncico, a los que les dedicaremos un capítulo específico.

#### ❖ Cementos a base de óxido de Zinc y Eugenol.

Estos surgen en 1925 propuestos por Ricketts para ser utilizados junto a la gutapercha en la obturación de los conductos radiculares. Posteriormente, Grossman recomendó el uso de un cemento a base de óxido de zinc eugenol que no producía manchas en la estructura dentaria, como sustituto de la fórmula de Rickert. Fragan mediante un proceso químico combinado, con una incrustación física del óxido de zinc en una matriz de eugenolato de zinc. Tienen un tiempo de manipulación prolongado, buena plasticidad, endurecimiento lento en ausencia de humedad y con muy poco cambio volumétrico. La citotoxicidad de estos selladores se ha estudiado in-vitro, la mayoría de los estudios que utilizan técnicas de cultivos celulares han demostrado que el óxido de zinc eugenol es citotóxico. (Araki y cols., 1994; Leonardo y cols., 2000; Perassi y cols., 2004)

Cuando se extruye a nivel apical producen una respuesta inflamatoria. Uno de los factores que influye en esto es la proporción líquido polvo. (Leonardo, 2005) Se ha realizado la adición de sustancias químicas en estos cementos, como el paraformaldehído por su efecto antimicrobiano, los germicidas por su acción antiséptica y los corticosteroides contra las reacciones inflamatorias (Spangberg, 2002), pudiendo esta capacidad antiséptica, producir una reacción irritativa de moderada a severa a nivel periapical. (Briseño y Willershausen, 1990) La Pasta de Rickets, Kerr Pulp Canal Sealer, Procosol, Pasta de Wath, Tubliseal, Canals, N2 y Endomethesone son ejemplos de los selladores en base de Oxido de Zinc y Eugenol.

❖ Cementos selladores a base de hidróxido de calcio.

El uso del hidróxido de calcio en Endodoncia ha sido ampliamente estudiado y utilizado por sus propiedades (Mohammadi y Dummer, 2011). Está indicado su uso en recubrimientos pulpaes, como medicación intra-conducto, en el tratamiento de resorciones, en el tratamiento de dientes inmaduros, así como componente de selladores. Algunos estudios obtienen resultados de una aceptable biocompatibilidad (Perassi y cols., 2004), mientras que otros concluyen que producen una respuesta irritativa con un consiguiente proceso inflamatorio (Silva y cols., 1997). El mayor problema que presenta es que para que la capacidad antimicrobiana debe dissociarse ion calcio e ion hidróxido, pudiendo disolverse y dejando espacios en el interior del conducto radicular (Siqueira y cols., 1999). Selladores en base de Hidróxido de Calcio son el Sealapex, Apexit, Calciobiotic o CRCS.

❖ Cementos a base de Ionómero de vidrio.

Los ionómeros de vidrio se han utilizado en Odontología como materiales de obturación y como bases cavitarias, dadas sus características adhesivas y su liberación de flúor, lo que lo convierte en un material anticariogénico. Están formados por polvo y líquido, donde el polvo está compuesto de partículas de vidrio, silicato de aluminio, flúor y calcio y el líquido está compuesto por ácido poliacrílico principalmente. No son solubles, dificultando el retratamiento.

Presentan una baja toxicidad en comparación con otros agentes selladores y muestra adhesión a la dentina, (Beltes y cols.,1997) aunque los valores de degradación y microfiltración son elevados, sobre todo con el paso del tiempo (De Almeida y cols., 2000; Schafer y Zandbiglari 2003)

❖ Cementos en base de silicona.

La silicona es un material inerte y biocompatible con extenso uso en Medicina como material de implante (Habal, 1984). La siliconas basadas en polivinilsiloxanos se han utilizado en Odontología como materiales inertes y dimensionalmente estables. Estos selladores presentan una elevada fluidez, son insoluble, radiopacos y estables dimensionalmente, presentando una mínima expansión (Ørstavik y cols., 2001). Presentan un buen tiempo de trabajo, fácil de manipular y retirar del conducto. Los resultados muestran un bajo potencial citotóxico. (Briseño y Willershausen, 1991) y presentando unos correctos resultados biológicos en situaciones clínicas. (Huomonen y cols., 2003)

❖ Cementos basados en metacrilato.

Estos selladores están basados en polímeros de poliéster que forma parte de un sistema polimérico para la obturación de conductos radiculares compuesto por: un material de núcleo, un sellador en base a un metacrilato de baja viscosidad (Kim y cols., 2010) y, en la mayoría de los casos, un agente específico para unirse a la dentina radicular.

Existen cuatro generaciones de selladores en base a resina metacrilato. Esos selladores están basados en el concepto de realizar una técnica adhesiva, tanto a las paredes radiculares como a al material de obturación, con la idea de conseguir una estructura "monobloque" material-diente en el conductos obturado. (Tay y Pashley 2007) (Tabla 2)

A la primera generación pertenece el Hydron (Hydron Technologies, Inc, Pompano Beach, FL) de mediados de los 70. El componente principal es el poly[2-hydroxyethyl methacrylate] (poly[HEMA]). Es un sellador muy hidrofílico. Produce una reacción inflamatoria severa, absorbe agua y presenta unos valores

muy altos de microfiltración (Kim y cols., 2010)

Los de segunda generación no necesitan grabado, son hidrofílos, y no requiere el uso de un adhesivo dentinario. Es necesario eliminar el barrillo dentinario con el uso de un quelante. EndoREZ (Ultradent, Utah, USA) es un sellador a base de dimetacrilato de uretano (UDMA), de curado dual. Se comercializa en una jeringa doble que contiene dos pastas. Tiene características hidrofílicas, por lo tanto puede ser usado por lo tanto puede ser usado en conductos húmedos, esto le confiere una excelente penetración en los túbulos dentinarios mejorando el sellado. Tiene una radioopacidad similar a los conos de gutapercha. El fabricante propugna la técnica de cono único de gutapercha.

---

<b>1º Generación</b>	Hydron
<b>2º Generación</b>	EndoREZ
<b>3º Generación</b>	FibreFill R.C.S. (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT) Epiphany (Pentron Clinical Technologies) RealSeal (SybronEndo, Orange, CA) Smart (Discus Dental, Culver City, CA) Resinate (Obtura Spartan Corp, Fenton, MO)
<b>4º Generación</b>	RealSeal SE (SybronEndo, Orange, CA) Meta- SEAL, (Parkell Inc)

---

Tabla 2. Cementos en base de resina de metacrilato.

Los de tercera generación están diseñados para sistemas de obturación que contengan fibra para reforzar las paredes radicales. Para simplificar los procesos de adhesión los selladores son de fraguado dual y el adhesivo es autograbante.

Los de cuarta generación son auto-adhesivos y auto-grabantes, pasando a ser

sistemas de un solo envase. Este adhesivo autograbante contiene ácido t-acrilamido-2-metil-propanesul-fónico (AMPS), que funciona como ácido monomérico, siguiendo la línea de trabajo de los composites que utilizan adhesivos autograbantes.

El sistema de adhesión de los selladores de resina de metacrilato es fundamentalmente de retenciones micromecánicas a través de un infiltrado de la resina en la matriz de colágeno parcialmente desmineralizada.

El mayor problema que presentan este tipo de selladores es que la capacidad de sellado está basada, precisamente, en la adhesión de la resina a las paredes del conducto. Los selladores de resina sufren un fuerte estrés de contracción durante el proceso de fraguado o polimerización de la resina, creando un despegamiento de la resina de la pared, dejando unos vacíos o espacios en la obturación. Este proceso se llama contracción de polimerización y la intensidad está relacionada con el factor C, altamente desfavorable en estos casos.

En una revisión realizada por Kim y cols. (2010) se analizaron las características mecánicas, concluyendo que los resultados en cuanto a test de expulsión, espacios en el sellado, interrupciones en la interfase sellador-pared radicular y ciclos funcionales de carga realizados con estos selladores y con los núcleos de Resilon, los valores fueron peores que los realizados con los materiales que no utilizaban técnicas adhesivas sino selladores convencionales.

En relación a la capacidad de estos selladores para fortalecer la raíz los resultados de los estudios muestran que el 61,1 % de los artículos no detecta diferencias, que el 15,5 % informa que se debilita la raíz y que el 21,1 % apoyan la idea de que fortalece la resistencia mecánica de la raíz de un diente tratado endodónticamente. En cuanto al sellado, el 34,2 % dan peor capacidad de sellado que los selladores no adheridos, el 28,9 % concluyen que no hay diferencia, y el 36,8 % obtienen un resultado superior en las pruebas de evaluación del sellado.

La solubilidad de tres selladores en base a resina metacrilato (Epiphany, InnoEndo y EndoREZ) estuvieron en valores de 3-9 %. (Donnelly y cols., 2007)

Los resultados de solubilidad del Epihany, sellador de tercera generación, fue del 3,41 %, mientras que la tasa de solubilidad recomendada por la Asociación Dental Americana especifica que el sellador no debe superar el 3 %. (Schafer y Zandbiglari, 2003)

❖ Cementos a base de resinas.

Son los cementos selladores de mayor uso en el ámbito endodóncico. Los selladores basados en resina epoxi se han utilizado durante muchos años con éxito clínico y son ampliamente utilizados debido a sus buenas propiedades mecánicas y compatibilidad con los materiales de restauración. Además de por sus características favorables, como la adhesión a la estructura dentaria, largo tiempo de trabajo, facilidad de manipulación y buen sellado (Azar y cols., 2000). Presentan características favorables como la capacidad de adhesión a estructuras dentales, un tiempo de trabajo correcto, fácil mezcla y buena capacidad de sellado. (Azar y cols., 2000). Estos selladores son capaces de reaccionar con cualquier grupo amino expuesto en el colágeno para formar enlaces covalentes entre la resina y el colágeno cuando el anillo de epóxico se abre durante la polimerización.

Se encuentran disponibles en el mercado actualmente: Diaket® (ESPE/Premier, Alemania/EEUU), AH-26® (DeTrey/Dentsply, Ballaigues, Suiza), Topseal® (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suiza) y AH-Plus® (DeTrey/Dentsply, Ballaigues, Suiza).

Con gran diferencia, los selladores a base de resina más utilizados han sido los de la serie AH desarrollado por Andre Schroeder en Suiza hace más de 50 años.

Los materiales más utilizados dentro de este grupo son el AH 26 y el AH Plus (Dentsply, Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, US).

AH Plus, es un derivado del AH 26 que tiene como componentes principales: resina epoxidiamínica, tungstenato cálcico, óxidos de circonio y de hierro, aerosil y aceite de silicona. Se dispensa en sistema pasta-pasta o en jeringa de automezclado. Tiene un tiempo de trabajo de 4 horas y un tiempo de fraguado

de 8 horas. Además, es de fluidez alta, presenta buena adherencia a dentina y tiene notable radioopacidad. La matriz resinosa le proporciona buenas características mecánicas a los cementos. Su distribución en los dos componentes es la siguiente. Pasta A: resina epoxi, tungstenato de calcio, óxido de circonio, Aerosil, óxido de hierro, sílice, diglicidil éter de bisfenol-A y bisfenol-F y pigmentos. Pasta B: dibencil-oxanonato-diamina, Tcd-diamina, Aerosil, óxido de circonio, tungstenato de calcio, sílice y aceite de Silicona. Básicamente es una resina epoxi bisfenol mejorada.

El AH Plus presentaba valores de fluidez significativamente mayores que otros selladores basados en óxido de zinc eugenol u otras resinas (cemento de Grossman, ThermaSeal, Sealer 26 y Sealer Plus) (Siqueira y cols., 2000).

Un material adhesivo a base de resina puede tener el potencial para reducir la microfiltración del canal de la raíz debido a sus propiedades adhesivas y la penetración en las paredes dentinarias. Las pruebas de resistencia mecánica de gutapercha con un sellador de resina (AH Plus) son superiores a las de selladores como óxido de cinc con eugenol o siliconas (Fisher y cols., 2007) y presentan una buena resistencia a la dislocación, prueba indicativa de una correcta adhesión (Huffman y cols, 2009; Ersahan y Aydin, 2010).

Ofrecen una buena adaptación y penetración intra-tubular (Balguerie y cols., 2011) Obtuvo mejores resultados con diferencias significativas en comparación con cementos selladores basados en óxido de cinc-eugenol (Singh y cols., 2012), o con cementos basados en metacrilato (Sevimay y Dalat, 2003; Mamootil y Messer, 2007) En otros estudios presenta unos resultados de menor penetración tubular si es comparado con cementos como el Real-Seal (Chandra y cols., 2012; Shokouhinejad y cols., 2011).

La técnica de obturación no es un parámetro importante en la penetración, como lo es en los cementos en base de óxido de cinc con eugenol. Esto puede sugerir que la penetración intra-tubular de selladores basados en resina no depende de las fuerzas hidráulicas creadas durante la obturación; sino que el sellador se introduce en los túbulos por acción capilar (Ordinola-Zapata y cols., 2009).



Presenta buenas capacidad de sellado y buenos valores de microfiltración (Kopper y cols., 2003; Timpawat y cols., 2001). El grosor de este tipo de selladores influye menos que otros materiales a la hora de evitar microfiltración (De-Deus y cols., 2006).

La capacidad de sellado de los cementos de resina se ve afectada por la humedad. (Roggendorf y cols., 2007). El control de la humedad y la remoción del barrillo dentinario mejora las propiedades mecánicas y adhesivas de los cementos de resina. (Pommel y cols., 2003). La presencia de barrillo dentinario aumenta la microfiltración, independientemente de la técnica de obturación utilizada cuando utilizamos este tipo de selladores (Çobankara y cols., 2004).

Sus valores de solubilidad son adecuados (Borges y cols., 2012). Son muy bajos en agua y saliva (Schäfer y Zandbiglari, 2003), mejores que los de los selladores de hidróxido de calcio y de óxido de cinc con eugenol (McMichen y cols., 2003).

AH Plus es altamente soluble en cloroformo y halotano, los solventes de materiales de obturación más comúnmente utilizados (Whitworthm y Boursin, 2000).

Tienen características pseudoplásticas determinadas por su viscosidad (Zhou y cols., 2013). Presenta unos valores de radioopacidad adecuados, cumpliendo la normativa ANSI/ADA (Carvalho-Junior y cols., 2007).

Son cementos que sufren variaciones en su composición química cuando son sometidos a calor, como por ejemplo, en las técnicas de condensación vertical con gutapercha caliente (Viapiana y cols., 2015).

No refuerzan ni fortalecer significativamente las raíces en comparación con los dientes en que los conductos han sido instrumentados pero no obturados (Schäfer y cols., 2007).

En relación a su actividad antimicrobiana, ésta es adecuada (Tanomaru-Filho y cols., 2007). AH-Plus fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de diversas colonias bacterianas, tales como *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans* o *S. epidermidis* (Leonardo y cols., 2000). Mientas que existen otros en los que han presentado

una actividad antibacteriana reducida o nula (Slutzky-Goldberg y cols., 2008; Mickel y cols., 2003). Esta característica no siempre es ideal, ya que hay estudios que reportan una relación entre las capacidad antimicrobiana de los selladores radiculares y su capacidad mutagénica (Geurtsen y Leyhausen, 1997).

Hay estudios en los que no se han encontrado alteraciones en los linfocitos humanos en condiciones *in vitro* ante la presencia de AH26 y AH Plus (Miletić y cols., 2003). Aunque existen estudios en los que se señala que la capacidad de generar daño al material genético es dosis-dependiente, pudiendo considerarse genotóxico. (Huang y cols., 2001). Produce una reacción severa en varios periodos de tiempo (Sousa y cols., 2006). La mayoría de los cementos de resina generan una irritación que va de ligera a moderada tanto *in vitro* como *in vivo* (Schwarze y cols., 2002).

El AH Plus se ha convertido en el estándar para la comparación entre selladores debido a sus propiedades físico-químicas (Garrido y cols., 2010) y a su aceptable biocompatibilidad (Scelza y cols., 2012 ).

### **1.2.2. Técnicas de obturación con gutapercha y cemento.**

#### **1.2.2.1. TÉCNICA DE CONO ÚNICO.**

Consiste en obturar todo el conducto con un solo cono, que, idealmente, debe de rellenar todo el conducto. En la práctica se ha visto que esto no es posible, dado que los conos de gutapercha no se adaptan a las características anatómicas de los conductos radiculares. Por eso, el cono se coloca junto con un cemento sellador que tiene como función rellenar los espacios vacíos entre el cono de gutapercha y la pared dentinaria del conducto (Maisto ,1967).

El inconveniente principal de esta técnica es la incapacidad del sellador de mantener la integridad dimensional con el paso del tiempo, lo que produce una gran posibilidad de que existan filtraciones en la obturación.

#### **1.2.2.2. TÉCNICA DE CONDENSACIÓN LATERAL. COMPACTACIÓN EN FRÍO.**

La condensación lateral consiste en la colocación de puntas de gutapercha auxiliares o accesorias junto a un cono principal adaptado previamente a las características de la preparación del conducto, utilizando la capacidad de deformación de los conos de gutapercha para que otro cono auxiliar o accesorio ocupe el espacio que exista entre el cono y la pared dentinaria. Esta adaptación será fundamentalmente en el tercio apical (Maisto, 1967). Para conseguir un sellado homogéneo del conducto, los espacios que pudieran haber entre los conos quedarían rellenos por un sellador. (Schilder, 1967; Vicente Gomez, 2003).

Esta ha sido una técnica ampliamente aceptada y usada clínicamente durante un largo periodo de tiempo.

Los estudios no demuestran que los resultados obtenidos con esta técnica sean inferiores a los obtenidos con técnicas de gutapercha termoplastificada (Spångberg, 2002. Weine, 1995).

#### 1.2.2.3. COMPACTACIÓN DE GUTAPERCHA ABLANDADA QUÍMICAMENTE.

Consiste en la se introducción de un solvente en el conducto y a continuación la colocación del cono principal de gutapercha para que este se adapte a la anatomía del conducto. (Vicente Gomez, 2003)

El inconveniente más importante en esta técnica es que, tras la aplicación del solvente, existe una pérdida en el volumen en la gutapercha, impidiendo que exista un sellado apical (Marlin y Schilder, 1973). La cantidad de contracción que sufre la gutapercha varía directamente en relación con la cantidad de solvente que hayamos usado (Schilder, 1967). Cuando se utiliza cloroformo como solvente existe una pérdida del 7,5% de su volumen (Moreno, 1977). Otra razón por lo que esta técnica está en desuso es que los disolventes utilizados son altamente irritantes periapicalmente (Weinn, 1995).

#### 1.2.2.4. OBTURACIÓN CON GUTAPERCHA TERMOPLASTIFICADA.

- ❖ Técnicas termomecánicas.

Técnica de McSpadenn,

La gutapercha se calienta por la acción del calor producido por de fricción de unos instrumentos especiales llamados termocompactadores, que giran a baja velocidad en el interior del conducto (Soares y Goldberg, 2003).

Tras la colocación del sellador, se introduce el cono seleccionado. Se introduce un compactador rotando a bajas revoluciones (8.000-15.000). De esta forma el calor producido por la fricción plastificará la gutapercha y al mismo tiempo se compactará apicalmente debido al diseño del instrumento.

Técnica Híbrida de Tagger,

Los primeros pasos de esta técnica son iguales a los de la condensación lateral, utilizando sellador, conos y conos auxiliares hasta conseguir el relleno del conducto radicular.

Después, un espaciador crea un espacio en el tercio cervical y medio del conducto, donde se introduce un compactador, girando, algo inferior al diámetro del conducto, lo que provocará el reblandecimiento de la gutapercha y su compactación.

Esta técnica reúne los beneficios del control apical que se logra con la condensación lateral y la compactación con gutapercha termoplastificada en los dos tercios coronales del conducto.

❖ Técnicas térmicas.

### **Condensación vertical con gutapercha caliente.**

Técnica descrita por Schilder (1967). En esta técnica se utilizan las propiedades térmicas de la gutapercha para fundir un cono y adaptarlo a la anatomía del conducto ya conformado. El uso de gutapercha caliente compactada con presión vertical permite obtener gran densidad en la porción apical de la obturación.

Es una técnica en la que, a través del calentamiento progresivo de diferentes partes del cono de gutapercha y su compactación, primero de la porción cervical,

luego del tercio medio y por último del tercio apical, se realiza toda la obturación del conducto. Es muy laboriosa y consume mucho tiempo. El conducto radicular debe de haber sido conformado con una conicidad continua, con el diámetro más pequeño en la constricción apical y la parte más ancha en la entrada del conducto.

Se coloca una pequeña cantidad de sellador. La cantidad es importante porque interesa que la mayor parte de la obturación sea gutapercha. Además, por la presión hidrodinámica ejercida con los compactadores se puede ocasionar una extrusión de sellador.

Solo tras varias series de calor y condensación se puede ablandar la gutapercha en la porción apical y, así, adaptar el cono a la anatomía del tercio apical y obturar la mayoría de los canales accesorios apicales.

### **Técnica de condensación vertical de gutapercha caliente de onda continua.**

Durante los años 80, la técnica clásica de condensación vertical mejoró considerablemente con la aparición de aparatología específica: el transportador de calor eléctrico Touch-and-Heat (Analytic Technology) y la pistola de inyección de gutapercha Obtura (Obtura Corp.).

El instrumento calentado en la llama se enfría rápidamente desde que es quitado de la fuente de calor, mientras que el aparato eléctrico puede permanecer caliente por un periodo indefinido de tiempo, brindando mayor control sobre el procedimiento.

Aprovechando estas mejoras, Buchanan desarrolló esta técnica con la idea de simplificar la técnica clásica de Schilder, la técnica de onda continua, que permite con un solo termocompactor producir una onda de condensación en el orificio de entrada al conducto y transportarla hasta la porción apical del mismo, extendiendo la condensación en un solo y continuo movimiento (Buchanan, 1996).

La compactación con onda continua proporciona, al igual que la primera parte de

la condensación vertical de Schilder, la obturación de los últimos milímetros apicales de conducto. Para el relleno del resto del conducto, en esta técnica se utiliza otro de los sistemas de obturación, la inyección de gutapercha termorreblandecida. (Buchanan, 2004).

### **Sistemas de obturación de núcleo sólido.**

En un principio, esta técnica se basaba en el recubrimiento de una lima K de bajo calibre con gutapercha ablandada en la llama de un mechero, para posteriormente ser insertados ambos materiales en un conducto radicular. El núcleo le confería la suficiente resistencia para poder transportar la gutapercha ablandada hasta una posición prefijada para realizar la obturación completa del sistema de conductos.

Diez años después, aparece en el mercado el sistema Thermafil (Maillefer). Éste consiste en un cono con un núcleo sólido, en este caso un plástico (derivado de una polisulfona) que ya está recubierto de gutapercha. Se disponen en diferentes longitudes y los calibres corresponden con la normativa ISO. En la actualidad los sistemas de gutapercha sobre vástago han incorporado distintas mejoras, entre otras, la facilidad para su remoción del interior del conducto.

## **2. SELLADORES ENDODÓNCICOS BASADOS EN BIOSILICATOS**

### **2.1. Los materiales biocerámicos.**

Durante las últimas dos décadas, una serie de importantes avances se han hecho en el campo de los materiales bioactivos utilizados para el tratamiento endodóncico, materiales también llamados biocerámicos, con su naturaleza biocompatible y excelentes propiedades físico-químicas.

Las biocerámicas son un subtipo importante de material biocompatible. Están específicamente diseñadas para ser utilizados en la fabricación de implantes quirúrgicos, prótesis y órganos artificiales, así como para cumplir una

determinada función fisiológica en el cuerpo humano, lo cual es la base fundamental de un material biocerámico (Veljović y cols., 2012).

Pueden funcionar como cementos, materiales de reparación de la raíz, selladores de conductos radiculares y materiales de relleno.

Nuevos materiales biocerámicos han demostrado la capacidad para superar algunas de las limitaciones importantes de las generaciones anteriores de materiales endodóncicos.

Fueron introducidos en la Endodoncia en la década de 1990, primero como materiales de obturación retrógrada y luego como cementos de reparación de la raíz, selladores de conductos radiculares, y recubrimientos para conos de gutapercha. (Haapasalo y cols., 2015). Hoy presentan múltiples aplicaciones en el campo de la endodoncia (tabla 3).

Las ventajas potenciales de los materiales biocerámicos en endodoncia están relacionados con sus propiedades físico-químicas y biológicas. La presencia de humedad es necesaria normalmente para el fraguado de los materiales biocerámicos. La humedad presente dentro de los túbulos dentinarios puede iniciar y ayudar a un fraguado completo.

---

#### **Aplicaciones de los cementos reparadores**

---

- Obturaciones a retro.
  - Sellado de perforaciones, en furca y Laterales,
  - Reabsorciones inflamatorias internas, en conductos y cámara pulpar.
  - Reabsorciones cervicales invasivas.
  - Obturaciones ortógradas.
  - Sellado de dientes de ápice abierto.
  - Recubrimiento pulpar.
  - Endodoncia regenerativa. Revascularización
- 

Tabla 3 . Usos en endodoncia de los cementos reparadores bioceramicos.

---

<b>Material</b>	<b>Fabricante</b>
-----------------	-------------------

---

<b>Biodentine</b>	Biodentine, France
<b>BioAggregate</b>	Innovative Bioceramix, Canada
<b>Calcium enriched mixture cement (CEM)</b>	Bionique Dent, Iran
<b>Endosequence Root Repair Material Paste</b>	Brasseler, EEUU
<b>Endosequence Root Repair Material Putty- iRoot BP PlusRoot Repair Material</b>	Brasseler, EEUU/ Innovative Bioceramix, Canada
<b>Endocem MTA</b>	Maruchi, Korea
<b>Endocem ZR</b>	Maruchi, Korea
<b>EndoBinder</b>	Binderware, Brasil
<b>QuickSet</b>	Avalon Biomed, EEUU
<b>White ProRoot Mineral Trioxide Aggregate</b>	Dentsply Tulsa, EEUU
<b>Grey ProRoot Mineral Trioxide Aggregate</b>	Dentsply Tulsa, EEUU
<b>MTA Angels</b>	Angelus, Brasil
<b>MTA Plus</b>	Avalon Biomed, EEUU
<b>Mechanically Mixed Mineral Trioxide Aggregate (MM-MTA)</b>	Micro-Mega, France.
<b>Nano White Mineral Trioxide Aggregate</b>	Kamal Asgar Research , Iran
<b>Gray MTA Pus</b>	Avalon Biomed, EEUU
<b>Ortho MTA</b>	BioMTA, Korea
<b>Retro MTA</b>	BioMTA, Korea
<b>Tech Bioseales Root end</b>	Isasan Italia
<b>Tech Bioseales Root capping</b>	Isasan Italia
<b>ThereCal</b>	Bisco. EEUU

Tabla 4. Lista de los cementos reparadores biocerámicos existentes en el mercado.

## 2.2.- Características de los cementos biocerámicos endodóncicos.



Recientemente se han desarrollado un buen número de materiales de este tipo con distintos usos endodóncicos (tabla 4) y unos específicamente con la indicación de cemento selladores (tabla 5)

Material	Fabricante	Composición
<b>Endosequence BC Sealer*</b>	Brasseler, EEUU.	Óxido de circonio, silicatos de calcio, fosfato monocálcico, hidróxido de calcio, agentes de relleno y espesantes.
<b>TechBiosealer Endo</b>	Isasan, Italia	Polvo: cemento Portland blanco, cloruro cálcico, fluoruro sodico y óxido de bismuto Líquido: Solución tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS)
<b>Endo CPM-Sealer</b>	Egeo Argentina	Polvo: Silicato tricálcico, óxido tricálcico, aluminato tricálcico, otros óxidos Líquido: solución salina, cloruro cálcico
<b>BioRoot RCS</b>	Septodont, Francia	Formulación mineral pura y libre de resina
<b>Proroot Endo Sealer</b>	Dentsply. Suiza	Polvo: Silicato tricálcico, óxido dicálcico, aluminato tricálcico, sulfato cálcico , oxido de bismuto Líquido: solución acuosa viscosa de polímero soluble en agua
<b>Fillapex,</b>	Angelus, Brasil.	Resina salicilato, Resina diluyente, Resina natural, Óxido de Bismuto, Sílica nanoparticulada, Mineral Trióxido Agregado.
<b>MTA Plus</b>	Avalon Biomed Inc. EEUU	Polvo: Silicato tricálcico, óxido dicálcico, aluminato tricálcico, sulfato cálcico , oxido de bismuto Líquido: gel de polímero libre de sal y agua
<b>MTA Obtura</b>	Angelus Brasil	Polvo: cemento Portland, óxido de bismuto. Líquido: resina líquida

Tabla 5. Cementos selladores en el mercado . \* iRoot SP, TotalFill BC Sealer.

Dentro de la extensa gama de materiales biocerámicos que existen para el uso en odontología vamos a describir las características de los dos cementos selladores que hemos utilizado en nuestro estudio.

### 2.2.1. TOTALFILL BC SEALER-ENDOSEQUENCE BC SEALER.

Es un sellador endodónico biocerámico pre-mezclado que contiene óxido de circonio, silicato tricálcico, silicato dicálcico, sílice coloidal, silicatos de calcio, fosfato de calcio fosfato monobásico e hidróxido de calcio. El óxido de circonio se añade para incrementar la radioopacidad del sellador.

Este producto se denomina de diferentes maneras dependiendo de donde se comercialice. Denominándose Endosequence BC Seales en su comercialización en Estados Unidos, iRoot en Canada, y TotalFill en Europa. (Trope y cols., 2015)

Tanto el agua absorbida, derivada del entorno externo, como la producida por la reacción entre los fosfatos de calcio y el hidróxido de calcio, se utilizan para generar una fase de hidrato de silicato de calcio.

Es un cemento de silicato recientemente introducido, descrito por el fabricante como insoluble, radioopaco, libre de aluminio en su composición y que necesita agua para fraguar; que por sus propiedades mecánicas se puede considerar que es un material pseudoplástico (Pawan y cols., 2014).

El tiempo de trabajo es superior a 1.440 minutos, significativamente más alto que el resto de selladores. Esto se debe a que el fraguado comienza con el contacto con humedad (Zhou y cols., 2013).

El tiempo de fraguado, según el fabricante, es de 4 h en un entorno húmedo, pudiendo llegar a ser superior a 10 h en un entorno seco. No obstante, se ha descrito un tiempo de fraguado muy superior, requiriendo, en humedad relativa del 100%, 72 horas para un fraguado inicial y 240 horas para lograr el fraguado completo; si la cantidad de agua es mayor, el tiempo de fraguado inicial se alarga, y la finalización completa del fraguado necesita menos tiempo (Loushine y cols., 2011).

En otro estudio el tiempo fue menor, de 2,7 h hasta su fraguado, por la diferente metodología de la prueba (Zhou y cols., 2013).

La presencia de fluido dentro de los túbulos dentinarios, usando el sistema de presión del fluido dentinario, permitió un correcto fraguado del EndoSequence BC Sealer en el interior del conducto radicular (Xuereb y cols., 2015).

Si aumenta la cantidad de agua durante el fraguado, la microdureza del sellador disminuye significativamente (Loushine y cols., 2011).

El Endosequence BC Sealer presenta, al igual que el MTA Fillapex, una fluidez y estabilidad dimensional comparable con el AH Plus, pero un mayor espesor y una mayor solubilidad (Xuereb, 2015).

Presenta una fluidez superior a 20 mm, dato acorde con la normativa ISO 6876/2001, sin presentar diferencias significativas con los selladores en base a resina epóxica (Zhou y cols., 2013). Otro estudio ofreció valores adecuados de fluidez ( $26,96 \pm 0,68$  mm), estos valores fueron significativamente mayores que los que presento al AH Plus (de Miranda y cols., 2012). Muestra una gran humectabilidad (Zhang y cols., 2009).

Los grosores de película del Endosequence BC Sealer, al igual que los del MTA Fillpex, son mayores que los de otros cementos de resina, óxido de cinc con eugenol y silicona. La viscosidad depende de la velocidad (Zhou y cols., 2013).

Tiene una leve capacidad de expansión tras ser inmerso en agua durante 30 días. El AH Plus y el Fillapex se contraen en la misma situación. Ambos mantienen los parámetros dentro de las norma ISO 6876/2001 (no superar el 1,0% de contracción ni el 0,1% expansión (Zhou y cols.,2013).

Su radioopacidad es adecuada, en concordancia con la ISO 6876:2012 (Xuereb 2015). Aunque presenta una radioopacidad ( $3,834 \pm 0.346$  mm Al) significativamente inferior al AH Plus ( $6,936 \pm 0,462$  mm Al), pero muy superior a la de la dentina ( $1,045 \pm 0,200$  mm Al) (de Miranda y cols., 2012).

No presentan diferencias en porosidad con respecto al MTA. Teniendo en cuenta esto, los nuevos cementos que contienen silicatos de calcio pueden comportarse de forma similar al MTA convencional respecto a la microfiltración, solubilidad, y microfractura en el ámbito clínico (Souza y cols., 2013).

La estabilidad en el color superior a otros biosilicatos. Todos los materiales basados en óxido, en los silicatos, producen una variación en el color de los dientes. En un estudio comparativo entre MTA y tres biosilicatos, el MTA blanco

produjo un aumento cambio de color significativamente mayor que los cementos de biosilicatos. Esta variación es mayor cuando se ponen en contacto con hipoclorito o clorhexidina. La ausencia de óxido de bismuto puede ser la explicación de esta diferencia (Keskin y cols., 2015).

La solubilidad del Endosequence BC Sealer está dentro de los parámetros especificados en la ISO 6876/2001, aunque es elevado y mayor que la de los selladores de resina epóxica, teniendo valores cercanos al máximo permitido para la solubilidad de los selladores (3%) (Zhou y cols., 2013). En otros estudios, los parámetros de solubilidad son muy elevados, llegando a superar el 20% de pérdida de masa, siendo esta mayor que en AH Plus, MTA Fillapex y MTA Angelus, sin cumplir los parámetros de la especificación 57 de la ANSI/ADA (REF) (Borges y cols., 2012). Sin embargo, en un estudio más reciente los valores de solubilidad eran menores al 1% (Ersahan y Aydin, 2013).

A pesar de las discrepancias en los resultados de solubilidad entre estos estudios, mostraron consistentemente filtración apical similar con iRoot SP y AH Plus mediante la prueba de la filtración de líquidos. Los valores de solubilidad y los valores de expansión que presenta durante el fraguado permiten que la estabilidad dimensional sea buena y no disminuya su capacidad de sellado (Ersahan y Aydin, 2013). En otro estudio de microfiltración presentó mejores valores de penetración de colorante que el AH Plus (Pawan, 2014).

En pruebas de dislocación, mostró valores superiores al AH Plus, sin diferencia significativa; y ampliamente superiores a los de un sellador en base de hidróxido de calcio (Sealapex) y al Endorez (Ersahan y Aydin 2010). En otro estudio tampoco se encontraron diferencias entre las fuerzas de dislocación entre el Endosequence y el AH Plus (Özcan y cols., 2012).

En todas las condiciones de humedad presenta buenos resultados de adhesión, siendo mejor que otros selladores en base a silicato (Fillapex), cementos de resina epóxica (AH Plus) y selladores de metacrilato (Epiphany). Esto puede ser debido a su pequeño tamaño de partícula y a su excelente nivel de viscosidad (Nagas y cols., 2012).

El sellador, en combinación con gutapercha, aumenta los valores de la fuerza de adhesión en presencia de PBS dentro del conducto radicular en mediciones realizadas a siete días. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia entre la fuerza de unión de este material de obturación en la presencia o ausencia de PBS en el conducto radicular a los 2 meses (Shokouhinejad y cols., 2012).

Los valores de adhesión que presentaron las obturaciones realizadas con Endosequence sin un núcleo de gutapercha fueron superiores a las que se realizaron con el sellador y gutapercha, con sellador y un núcleo de metacrilato (Resilon), con AH Plus y gutapercha. Entre los otros grupos no existieron diferencias significativas. En estos casos una amplia mayoría de las muestras presentaron separación entre el sellador y el material del núcleo de la obturación (Nagas y cols, 2014).

Cuando se utilizó una técnica de obturación con condensación lateral, la adhesión que presentó el Endosequence fue más baja que la del AH Plus. Cuando se utilizó una técnica de obturación termoplástica la adhesión del Endosequence fue más alta que la del AH Plus (Gade y cols., 2015).

La colocación de hidróxido de calcio en el conducto afecta significativamente a los valores de dislocación de la obturación. Presenta diferencias significativas tanto con el AH Plus como con el MTA Fillapex (Amin,2012).

La presencia o no de barrillo dentinario no afecta significativamente a las fuerzas de adhesión de los materiales de obturación, teniendo los mismos valores de adhesión que el AH Plus (Shokouhinejad y cols., 2013).

El Endosequence BC Sealer es un sellador con características alcalinas (Loushine y cols., 2011). En contacto con humedad en su periodo de inicio de fraguado tiene un pH superior a 12. Este pH alcalino, no solo se produce durante el fraguado, sino que se mantiene tras completar este, manteniendo la alcalinidad al menos 5 semanas. Los valores fueron superiores a los de otro cemento en base a biosilicatos (Fillapex) y a los de cementos en base de resina epóxica (AH Plus) (Zohi ,2013).

Los valores de liberación de iones de calcio fueron inferiores a los de otros biosilicatos utilizados como cementos reparadores (Biodentine y ProRoot MTA) y no mostró incorporación de calcio o silicio en capas profundas de la dentina radicular cuando se sumergió en PBS hasta 90 días como los otros (Han y Okiji, 2013).

Posee un potente efecto antibacteriano, erradicando todas las bacterias en 2 minutos de contacto y manteniendo una efectiva capacidad antibacteriana tras 3 y 7 días del fraguado. La capacidad antibacteriana disminuyó considerablemente tras ese periodo. La capacidad antibacteriana puede ser una combinación del alto pH, de su capacidad hidrofílica y de la difusión activa del hidróxido de calcio (Zhang y cols., 2009).

No aumenta el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, que es un marcador de la inflamación neurogénica y de la activación de la nocicepción, cuando se extruye y se pone en contacto con estructuras nerviosas (Ruparel y cols., 2014).

Aumenta la resistencia a la fractura, aunque en menor medida que las obturaciones de ionómero. El sellador EndoSequence utilizado en técnica de cono único mostró diferencias significativas en los valores en relación a la posibilidad de fractura con respecto al grupo de control positivo (dientes instrumentados sin obturar), pero también con el grupo de control negativo (dientes sin tratamiento) (Celikten, 2015).

Varios estudios de retratamiento indicaron que la eliminación completa de este material o de iRoot SP de conductos radiculares es difícil (Wang, 2015). Las técnicas de retratamiento convencionales, con calor, con solvente o con instrumental rotatorio, no son capaces de remover totalmente los biosilicatos, ni cuando el material es colocado a longitud de trabajo, ni cuando es colocado 2 mm corto, perdiendo la permeabilidad en el 20 y 70% de los casos respectivamente (Hess y cols., 2011).

### **2.2.2. MTA FILLAPEX.**

Se trata de un cemento sellador de conductos basado en la fórmula del MTA. La mayor diferencia de este sellador con respecto al Endosequence BC Sealer y a otros selladores de silicatos es la presencia de una matriz de resina en su composición. Fue creado con la intención de combinar las propiedades físico-químicas de las resinas y las propiedades biológicas del MTA (Wang, 2015).

Tras la mezcla, su composición es: resina de salicilato, resina diluyente, resina natural, óxido de bismuto, sílice nanoparticulada, agregado trióxido mineral y pigmentos. El óxido de bismuto se añade como radioopacificador (Xuereb, 2015).

Según el fabricante (Angelus, Londrina, Brasil), el tiempo de trabajo es de 30 minutos y el tiempo de fraguado de 120. En un estudio, el tiempo de trabajo mostró una media de 45 minutos y el tiempo de fraguado fue de 2,5 h. Sin diferencias significativas con el Endosequence BC Sealer (Zhou y cols., 2013); mientras que en otro estudio el tiempo de fraguado fue similar en condiciones de humedad, de 2.7 h, mientras que presentó un fracaso en el fraguado en un entorno seco (Xuereb, 2015).

Para Vitti y cols. (2013) el tiempo de trabajo fue de 30 minutos y el tiempo de fraguado inicial de 2,27 h y el final de 4,50 h. Se consideró que el tiempo de trabajo fue aceptable.

MTA Fillapex tiene una mayor fluidez y un grosor de capa mayor que el Endosequence BC Sealer. El tiempo de trabajo, el tiempo de fraguado y la solubilidad fueron menores que los datos del Endosequence BC Sealer (Zhou y cols., 2013).

MTA Fillapex presentó una fluidez superior a 20 mm ( $31,09 \pm 0,67$ ), dato acorde con la normativa ISO 6876/2001. La fluidez fue significativamente más baja que la presentado por el AH Plus (Silva y cols., 2013).

La temperatura no produce cambios en la composición del MTA Fillapex, ni en su tiempo de fraguado, ni en su fluidez, ni en el grosor de su capa (Camilleri, 2015). La temperatura tampoco varía la fuerza de compresión ni la transmisión que se produce de temperatura al exterior de la pared dentinaria presentando valores

inferiores al AH Plus. (Camilleri y cols., 2011). La temperatura tampoco varía la fuerza de compresión ni la transmisión que se produce de temperatura al exterior de la pared dentinaria (Viapiana y cols., 2014).

Presenta unos valores de radioopacidad tres grados por encima de los presentados por el aluminio, que es el mínimo recomendado (ANSI/ADA). Los valores fueron menores que los obtenidos por el AH Plus (Borges y cols., 2014). En otro estudio tuvo valores inferiores significativamente menor que el AH Plus, pero también cumpliendo los requisitos mínimos requeridos (Silva y cols., 2013).

El MTA fillapex tiene una alta solubilidad, que está dentro de los parámetros aceptados, inferior al 1%, menor que la del Endosequence BC Sealer, pero mayor que la del AH Plus (Zhou y cols., 2013).

Comparando la solubilidad con otros selladores obtuvo los parámetros más altos de solubilidad tanto a 2 como a 7 días. En 2 días solo presentó diferencias significativas con el AH Plus, mientras que a los 7 días mostró diferencias con un cemento de metacrilato y con un cemento de hidróxido de calcio. La pérdida de masa fue del 15 por ciento en las dos mediciones (Faria-Júnior y cols., 2103).

En otro estudio, los parámetros de solubilidad también fueron muy elevados, llegando a casi al 15% de pérdida de masa. Siendo inferior al TotalFill, pero siendo muy superior que la del AH Plus y la del MTA Angelus. Estos valores de solubilidad no cumplirían los requisitos mínimos para un sellador endodóncico, además, provocaron cambios en la superficie del sellador. (Borges y cols., 2012).

Por el contrario, se han publicado valores de solubilidad bajos. 1 día: -0,09; 7 días: -0,15; 14 días -0,22, y a 28 días: -0,25. Estos valores de fueron significativamente menores que los valores reportados por el AH Plus. La solubilidad fue aumentando con el tiempo en ambos selladores (Vitti y cols., 2013). La gran diferencia podría deberse a que en los otros ensayos, las pruebas se realizaron tras el periodo de fraguado, mientras que en este estudio se calculó la solubilidad del material tras un periodo de tiempo correspondiente a tres veces el tiempo de fraguado sin realizar la comprobación del estado de fraguado del material (Borges y cols., 2012).



Sus valores de absorción de agua son bajos, significativamente menores que los del AH Plus, posiblemente debido a la degradación del polímero (Vitti y cols., 2013).

El MTA Fillapex y el Endosequence BC Sealer presentaron unos resultados de adaptación a las paredes radiculares significativamente mejores que el AH Plus. Mientras que entre ellos no existieron diferencias. Todos presentaron menos espacios en el sector coronal que en el apical. El grosor de sellador que presentaron las obturaciones fue similar al del AH Plus, siendo menor que el del otro biosilicato. (Al-Haddad y cols., 2014).

En presencia de humedad, el MTA Fillapex obtiene valores de microfiltración mejores que en conducto seco, a diferencias de los otros selladores (AH Plus y ZOE Sealer). El AH Plus presentó valores significativamente menores de filtración tanto en seco como en presencia de humedad (Ehsani y cols., 2014).

Tras la inmersión en una solución salina tamponada con fosfato durante 60 días de dientes obturados con condensación lateral con diferentes selladores, al igual que en otros estudios, el Fillapex presentó unos valores de adhesión significativamente más bajos que el AH Plus en todos los tercios radiculares (Tedesco y cols., 2014).

La presencia de líquido afecta a la adhesión del Fillapex. Esta afectación fue superior a la de otros selladores, obteniendo en todas las condiciones los valores más bajos. De las diferentes condiciones estudiadas, desecado, seco, húmedo o mojado, el mejor valor lo obtuvo en presencia de humedad. Los valores de adhesión fueron muy bajos, sin presentar signos de ningún tipo de adhesión en estos casos (Nagas y cols, 2012).

En un estudio de dislocación, realizado en dientes obturados con condensación lateral, presentó un valor inferior, aunque sin significación estadística, en la fuerza requerida para remover la obturación de las paredes del conducto (Assmann y cols., 2012). Resultados similares se obtuvieron en un estudio en el que se analizó, además, el Endosequence BS Sealer. Las medidas en este estudio se realizaron por tercios radiculares. EL MTA Fillapex obtuvo los peores

resultados en todos los tercios, con diferencia significativa con respecto a los otros dos selladores evaluados. El Endosequence BC Sealer obtuvo mejores resultados que el AH plus pero sin diferencias (Sagsen y cols., 2011).

La colocación previa de hidróxido de calcio no afecta a la dislocación de la obturación con MTA Fillapex, por lo que se puede pensar que no afecta a su adhesión. Los valores obtenidos por el MTA Fillapex, fueron menores que los del AH Plus, que tampoco vio afectada su adhesión por el hidróxido de calcio (Amin y cols., 2012)

La eliminación del barrillo produce un aumento en los valores de adhesión con respecto los casos en los que no se realizó la remoción (Reyhani y cols., 2014).

La agitación mediante ultrasonidos del sellador en el interior del conducto produce una mayor profundidad y un mayor porcentaje de penetración del sellador en los tubulos dentinarios que si se coloca con limas rotatorias o con un léntulo. El MTA Fillapex tuvo mejores valores en ambos parámetros que el AH Plus en este caso (Nikhil y cols., 2015).

Tras la aplicación de un solvente para la desobturación durante un retratamiento, el sellador presentó una disminución de la capacidad de adhesión a las paredes dentinarias. Los valores disminuyeron al igual que los del AH Plus. El aumento del tiempo de contacto del solvente con la pared dentinaria fue muy importante a la hora del incremento de la pérdida de los valores de adhesión (Topçuoğlu y cols., 2014).

En cuanto al sellado apical, el MTA Fillapex obtuvo peores resultados, con diferencia significativa, que el AH Plus, en un estudio de microfiltración con azul de metileno. La filtración fue significativamente superior en el tercio coronal con respecto a los otros dos tercios (Sönmez y cols., 2012). Presentó una cantidad considerablemente mayor de espacios vacíos en la interfase sellador-dentina que los presentados por al AH Plus (Amoroso-Silva y cols., 2014).

MTA Fillapex presentó una capacidad de sellado significativamente menor que el ProRoot MTA y AH Plus (Neelakantan y cols., 2013).

MTA Fillapex tiene un pH alcalino, que, al igual que otros biosilicatos, se mantiene tras completar el fraguado. Tras 120 minutos se obtuvieron los mayores valores, a partir de cuando comenzaron a reducirse, manteniendo su alcalinidad al menos hasta las 24 h. Los valores del pH fueron inferiores a los del Endosequence BC Sealer, probablemente por el menor tiempo de fraguado y la menor solubilidad (Zhou y cols., 2013).

En otro estudio en el que se realizaron mediciones de pH a lo largo de 168 h, se comprobó que el pH alcalino disminuye con el paso del tiempo, con un valor de 9,68 a las tres horas, que fue disminuyendo hasta llegar a 7,76 a las 168 h. Estos valores fueron en todas las mediciones horarias superiores a los del AH Plus. Presenta altos valores de calcio en la superficie tras el fraguado (Silva y cols., 2013).

Presenta una actividad antibacteriana ante el *E. faecalis* antes del fraguado, pero no mantiene esta capacidad tras la finalización de este, pese a que su pH sigue siendo alcalino -tras 60 h se mantuvo por encima de 10- (Morgental y cols., 2011). Presenta actividad antifúngica frente a la *Candida albicans*. EL MTA Fillapex y el Endosequence sin fraguar produjeron una reducción significativa de una capacidad del crecimiento fúngico. El AH Plus sin fraguar también tuvo una gran capacidad antifúngica, fue el único que eliminó el crecimiento del hongo. Tras 7 días, ambos selladores de silicatos presentaron una capacidad muy reducida o nula para afectar el crecimiento fúngico (Özcan y cols., 2013).

En las pruebas de resistencia a la fractura presenta valores más altos que el Endosequence BC Sealer sin diferencias estadísticamente significativas (Dudeja y cols., 2015). Tuvo unos valores más bajos en relación a la resistencia a la fractura que presentan los dientes con respecto a las obturaciones radiculares con AH Plus, en un test de fractura con cargas transversales de 45° en dientes inmaduros (Tanalp y cols., 2012).

En otro estudio, en dientes instrumentados con sistemas rotatorios, el MTA Fillapex obtuvo resultados de fractura muy similares a dientes obturados con AH Plus y ligeramente superiores a los obtenidos por los casos obturados con

Endosequence, sin presentar diferencias significativas. Los dientes tras la obturación se mantuvieron en un entorno de 100% de humedad durante 7 días (Sagseen y cols., 2012).

Los estudios de retratamiento indicaron que la eliminación completa de Endosequence BC Sealer o iRoot SP de conductos radiculares es difícil (Wang, 2015). Las técnicas de remoción de materiales de obturación con instrumentos rotatorio de níquel-titanio y ultrasonidos no son efectivas para la remoción completa de las obturaciones con biosilicatos (Boutsioukis y cols., 2008). En un estudio en el que se compara la capacidad de retratamiento que tiene la obturación con MTA Fillapex , con AH Plus o con Endosequence, con técnica de cono único, y AH Plus con condensación lateral, se concluye que en ninguno de los casos se puede realizar una desobturación completa del material de obturación del interior del conducto, sin que existiera diferencia entre estos, el grupo del MTA Fillapex y el del AH Plus. La remoción del MTA Fillapex fue significativamente más rápida que el resto de los grupos. Hubo diferencia entre estos dos materiales y en el grupo de Endosequence BC Sealer, en el que los valores de material remanente en el conducto fueron elevados (Uzunoglu y cols., 2015). Sin embargo, en otro estudio se obtuvieron buenos resultados en la remoción de material de obturación del conducto radicular en comparación con el AH Plus, siendo más rápido y eliminando menos dentina en un estudio tomográfico. Esto se puede deber a su baja capacidad de adhesión (Butt y Talwar, 2013).

### **3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS CEMENTOS SELLADORES.**

Existen varios parámetros para la evaluación de los selladores de acuerdo a los test de estandarización de la ADA/ANSI en los Estados Unidos y a la normativa ISO internacional, con pequeñas diferencias. Para simplificar estas se puede utilizar para la evaluación de los selladores la normativa ISO 6876- 2012 (ISO 6876- 2012)

Dentro de los parámetros mecánicos podemos evaluar la fluidez, tiempo de trabajo, tiempo de fraguado, radiopacidad, solubilidad y desintegración, cambios dimensionales durante el fraguado. Para la estandarización de los estudios de tiempo y fraguado se utiliza el método Gillmore (ASTM C266-03) .

### **3.1.- Clasificación de los procedimientos de evaluación de los cementos selladores.**

#### **3.1.1. CLASIFICACIÓN DE TRONSTAD (1978).**

Existen tres niveles de estudios biológicos para los materiales dentales (Tronstad y Wennberg 1980). Las pruebas iniciales son las dedicadas a la evaluación de la toxicidad del material. Las pruebas de segundo nivel son las realizadas en animales para evaluar la respuesta del tejido o del hueso huésped. Las pruebas de tercer nivel son las que simulan las situaciones clínicas y se conocen como pruebas de utilización o uso.

- Pruebas de detección de toxicidad general: efecto citotóxico (cultivo de tejidos, método de filtro); efecto cancerígeno y mutagénico (pruebas de cultivo de tejidos, pruebas de células bacterianas); y efecto sensibilizante (ensayo de maximización en cobaya).
- Pruebas de detección de toxicidad local: aplicación de corta duración (15 minutos) al tejido intacto, tejido no epitelializado (método de implantación en dos pasos o método de contacto muscular); y la implantación a largo plazo (> 12 meses) en el tejido subcutáneo.
- Ensayos de uso.
- Ensayos clínicos.

#### **3.1.2. CLASIFICACIÓN DE ØRSTAVIK (2005).**

- Pruebas biológicas: son las que ponen los selladores en contacto directo con tejidos vitales. Estas pruebas no solo buscan comprobar que no exista una aparición de síntomas manifiestos, sino también que no interfieran en la cicatrización de los tejidos retrasando o evitando la curación.

- Pruebas de utilización (o uso): son las que se realizan en situaciones clínicas, pero se realizan en animales.
- Pruebas microbiológicas: no son fundamentales en el concepto endodóncico actual.
- Pruebas en modelos funcionales: neurotoxicidad, filtración, alteración de la superficie radicular.
- Pruebas clínicas: Existen varios niveles de pruebas clínicas que se pueden llevar a cabo con los selladores radiculares. La última de esta fase son los estudios de supervivencia de los dientes con en ausencia de signos y síntomas de patología. Tradicionalmente el criterio de observación en el campo de la endodoncia ha sido la valoración clínica y radiográfica de los tratamientos. La falta de estandarización de estas pruebas son el mayor son el mayor obstáculo para el avance clínico tanto en la evaluación de materiales de obturación de conductos como en otros aspectos de los tratamientos endodóncicos (Ørstavik, 2005).

### **3.2. Estudios con células madre.**

#### **3.2.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE.**

Las células madre son células indiferenciadas que tiene capacidad para autorrenovarse, de ser clonogénicas y de poder diferenciarse a múltiples estirpes celulares. (Weissman, 2000; Moraleda y cols., 2004,)

Tienen la capacidad de dividirse asimétricamente dando lugar a dos células hijas, una de las cuales tiene las mismas propiedades que la célula madre original (autorrenovación) y la otra adquiere la capacidad de poder diferenciarse (Inaba, 2012).

Hay tres aspectos que las hacen únicas en la medicina regenerativa: su estado de indiferenciación, su capacidad para proliferar indefinidamente y por último, su plasticidad y capacidad de dar origen a otros tipos celulares (Caplan,1991)

Poseen plasticidad celular, propiedad de las células madre adultas (CMA) de

diferenciarse en tejidos de otra capa embrionaria, adoptando los perfiles de expresión fenotípica y funcional específicos dichos tejidos.

#### 3.2.1.1. Clasificación según su potencial de diferenciación.

Las células totipotentes son las que tienen la habilidad de que una célula individual pueda dividirse y producir todas las diferentes células de un organismo, incluyendo los tejidos extraembrionarios. De acuerdo con la definición, el cigoto es totipotente, lo que significa que es la única célula que tiene el potencial de desarrollarse en un embrión con todas las células especializadas que forman un ser vivo, así como en la estructura de soporte necesaria para el desarrollo de la placenta fetal (Mitalipov y cols., 2009).

Las células pluripotentes son células capaces de generar de cualquiera de las tres capas del embrión, endodermo, mesodermo o ectodermo, pero no los tejidos extraembrionarios. A estas células, se les denomina células madre embrionarias, y se pueden diferenciar en células de aproximadamente 200 tipos de tejido de un humano. En el año 2012 Gurdon y Yamanaka descubrieron que una célula madura podía reprogramarse para convertirse en pluripotentes (células pluripotenciales inducidas). (Takahashi y Yamanaka 2006)

Las células multipotentes son las células progenitoras que son capaces de diferenciarse en un número limitado de destinos celulares; distintos tipos de células, pero de un mismo linaje celular

Las células unipotentes son las células madre que tienen la capacidad de diferenciarse únicamente en un tipo celular. Las células madre unipotentes son células madre adultas que producen células de un solo linaje, como las células madre germinales, entre ellas las espermatogonias que generan el espermatozoide (Jaenisch y Young, 2008).

#### 3.2.1.2. Clasificación según su origen.

Las células madre embrionarias son células derivadas de la fase inicial embrionaria. Son las únicas que mantienen la totipotencialidad y capacidad de autorrenovación en el embrión, y la mantienen durante un período muy corto de

tiempo, después de lo cual sólo existen células totipotentes en la línea germinal (Bianco y cols., 2001). Derivan de la masa celular interna de los blastocistos de mamífero, y tienen la capacidad de crecer indefinidamente manteniendo su pluripotencialidad y su capacidad de diferenciarse en las células de las tres capas germinales. Podrían ser utilizadas en el tratamiento de múltiples enfermedades, sin embargo existen problemas éticos para su utilización debido al uso de embriones humanos, así como la posibilidad de la respuesta de rechazo en los pacientes trasplantados (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Las células madres adultas, también denominadas somáticas o postnatales, son un subconjunto heterogéneo de células estrómicas, consideradas multipotentes, que pueden residir entre células diferenciadas dentro de una serie de órganos adultos en el cuerpo donde juegan un papel en el mantenimiento de los tejidos, la renovación y reparación. Pueden ser aisladas de muchos tejidos adultos diferentes y demuestran el potencial para dar lugar a células de diversos linajes, adoptando los perfiles de expresión fenotípica y funcional específicos dichos tejidos (Kim, 2000).

Las diferentes células madre adultas son: hematopoyéticas, neuronales, epiteliales, de la piel y mesenquimales.

### **3.2.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.**

Fueron identificadas por Friedenstein y cols. (1966) partir de médula ósea. Son aquellas capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico: dentina, hueso, ligamento periodontal, músculo adipocitos, tejido conectivo, etc. (Caplan, 1991). Por lo tanto, son células multipotentes; aunque recientemente se ha observado que se les puede inducir pluripotencialidad (Takahashi y Yamanaka 2006).

Los criterios para considerar que una célula puede ser considerada una célula madre mesenquimal son:

- 1) En un cultivo estándar tiene que ser adherentes al plástico;
- 2)  $\leq 95\%$  de la población celular debe expresar los marcadores CD105, CD73, y



CD90, cuando se mide por citometría, además deben carecer de la expresión ( $\leq 2\%$  positivo) de los marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, o CD19 y HLA clase II;

3) Las células deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones de diferenciación normales *in vitro* (Dominici y cols., 2006).

Morfológicamente, no se pueden definir o distinguir, debido a que pueden ser grande y planas o alargadas, siendo muy similares a los fibroblastos. Su identificación se basa en la expresión una serie de marcadores moleculares de superficie, aunque ninguno de estos marcadores es específico para CMMs, ya que también han sido detectados en células mesenquimales diferenciadas, endoteliales y epiteliales. También se diferencian por su capacidad de auto-renovación, multipotencia y de formar colonias (es decir, son clonogénicas).

Otros estudios han identificado células similares a células madre mesenquimales derivados de médula ósea, periostio, cartílago articular, membrana sinovial, líquido sinovial, músculo esquelético, tejido adiposo, tendones, sangre, los vasos sanguíneos, la vasculatura del cordón umbilical, tejido placentario tejidos fetales y la piel (Hynes y cols., 2012)

### **3.2.3. CÉLULAS MADRE DENTALES.**

La identificación y el aislamiento de una población de células precursoras de la odontogénesis en de tejido pulpar adulto fue publicado Gronthos y cols. (2000) Este grupo describió la identificación de las células madre de la pulpa dental (DPSCs) en virtud de sus habilidades clonogénicas, las tasas de proliferación rápida, y la capacidad para formar tejidos mineralizados tanto *in vitro* como *in vivo*. (Gronthos y cols. 2000).

Estas células presentan un inmunofenotipo de tipo mesenquimal. Revelaron un alto grado de expresión de los antígenos de superficie CD 73, CD90 y CD105, mientras que resultaron negativos los antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA II. Este perfil cumple los criterios de la International

Society of Cellular Therapy, para considerar una célula como de estirpe mesenquimal (Rodríguez-Lozano y cols., 2011).

Expresan receptores para numerosos mediadores de la inflamación, que pueden aumentar o disminuir el reclutamiento, proliferación y/o diferenciación de las células madre pulpares. A su vez estas células poseen propiedades inmunosupresoras (LePrince y cols., 2012).

Son denominadas células ectomesenquimales, debido a su pronta interacción con la cresta neuronal. Desde esta perspectiva, las células madre dentales derivadas del ectomesénquima pueden tener diferentes características similares a las de las células de la cresta neural. (Huang y cols., 2009)

El primer tipo de células madre dental fue aislada de la pulpa humana y fue denominada como "células madre de la pulpa dental postnatal" (DPSCs) (Gronthos y cols., 2000). Seguidamente se aislaron y caracterizaron 3 tipos más, como son: células madre de los dientes temporales exfoliados (SHED) (Miura y cols., 2003), células madre del ligamento periodontal (Seo y cols., 2004), células madre de la papila apical (SCAP) (Sonoyama y cols., 2006). En estudios recientes se ha identificado un quinto tipo de célula progenitor, las células madre del folículo dental (DFPCs) (Morsczech, 2005).

#### 3.2.3.1. Células madre de la pulpa dental (DPSCs).

El primer tipo de células madre dentales fue aislada a partir de la pulpa de terceros molares sanos exodonciados. (Gronthos y cols. 2000). Mostraron capacidad de diferenciación multipotente, expresaron marcadores indicativos de células madre capacidad clonogénica y potencialidad para regenerar el complejo dentino-pulpar *in vivo* (Hung, 2010). Estas células residen en un microambiente perivascular específico donde mantienen sus características de células madre. Se observó que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de médula ósea (Shi y cols., 2001).

Las DPSCs presentan los marcadores STRO-1, c-Kit y CD34, lo que representa que son capaz de diferenciarse en líneas celulares osteogénicas, adipogénicas y

en linajes miogénicos. Además, la expresión de estos marcadores son indicativos de una población de células madre mesenquimales de origen en la cresta neural (Pisciotta y cols., 2015).

Tras 2 años de criopreservación, las DPSCs mantienen su capacidad para diferenciarse a pre-odontoblastos y a producir tejido óseo, su fenotipo y por tanto su integridad celular. (Peng y cols., 2009). Muestran potencial para conservar propiedades de células madre tras un trasplante *in vivo* a largo plazo (Lei y cols., 2014).

La DPSCs fueron capaces de diferenciarlas hacia odontoblastos y de formar el complejo dentino-pulpar cuando fueron implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas (Gronthos y cols., 2000). Este grupo de odontoblastos fue capaces de expresar sialofosfoproteína dentinaria, indicador de la producción dentinaria (Batouli y cols. 2003). Además, combinadas con una matriz de colágeno y proteínas de la matriz de la dentina, las DPSCs fueron capaces de generar tejido pulpar en ratones inmunodeprimidos (Prescott y cols., 2008).

Presentan un aumento de la expresión del ARN de sialofosfoproteína de la dentina (DSPP) y de fosfoglicoproteína de la matriz extracelular que son indicadores diferenciales de la progresión celular en el linaje odontoblástico (Wei y cols., 2007).

No están claros los factores implicados en la diferenciación odontoblástica debido a la gran heterogeneidad de estas células (Batouli y cols., 2003; Zhang y cols., 2008; Luo y cols., 2014; Iohara y cols., 2009)

Como ya hemos comentado, son capaces de diferenciarse en osteoblastos y condroblastos, proporcionando una estrategia prometedora para el tratamiento de lesiones de hueso y cartílago (Hilkens y cols., 2013). La presencia de osteoblastos cultivados con DPSCs puede promover la diferenciación osteogénica y la proliferación de las células madre pulpaes (Wang y cols., 2013). *In vivo* se puede obtener una subpoblación de células con potencial osteogénico, odontoblastos derivados de células madre pulpaes. Estos osteoblastos derivados de las células madre pulpaes presentan ligeras diferencias con respecto a los

odontoblastos primarios de origen óseo (Carinci y cols., 2008).

Presentan capacidad de diferenciación hacia subconjuntos endocrinos y exocrinos como son las células pancreáticas (Ishkitiev y cols., 2013); también capacidad de diferenciación hepática, obteniendo células con igual morfología y funcionalidad (Ishkitiev y cols., 2012); capacidad de diferenciación en melanocitos y células de Schwann (Al-Zer y cols., 2015) y son capaces de inducir angiogénesis e promover la migración celular endotelial, pudiendo ser útil para patologías correlacionadas con la angiogénesis inadecuada como el accidente cerebrovascular o infarto de miocardio (Bronckaers y cols., 2013); y son capaces de mostrar un fenotipo de mioblastos en cultivo tras seis semanas, con lo que tienen capacidad de formación de músculo ( Zhang y cols., 2006). Las células madre de la pulpa dental tienen una capacidad de reparación cardiomiogénica similar a las células madre procedentes de la médula ósea y tejido adiposo (Gandia y cols., 2008).

Debido a su origen embrionario, las DPSCs tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas, glia y oligodendrocitos (Nakashima y cols., 2009). Podrían ser un modelo ideal para realizar terapia celular en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson. (Iohara y cols., 2006; Zhang y cols., 2006).

Las DPSCs no solo se pueden obtener de dientes sanos, sino también de dientes con pulpitis irreversible (Wang y cols., 2010). Las células aisladas del tejido pulpar normal y las aisladas del tejido pulpar inflamado forman una capa celular homogénea, células similares a fibroblastos, presentando una tasa de proliferación similar y los mismos tipos de líneas de diferenciación celular. Las DPSCs de pulpas inflamadas tienen alteradas algunas de las propiedades de células madre, aunque no se conoce los mecanismos de alteración, pero mantiene el potencial de regeneración de tejido (Alongi y cols., 2010). Aisladas del tejido pulpar inflamado presentan una alta tasa de disfuncionalidad en términos de sus propiedades inmunomoduladoras. Tienen una capacidad para estimular respuestas antiinflamatorias mínima. Esto reduce su relevancia, especialmente cuando se utiliza para enfermedad injerto o posible trasplante de tejidos u órganos (Yazid y cols., 2014).

Las células madres de pulpa obtenidas de dientes con afectación periodontal severa presentan una morfología relativamente similar a las de dientes sin afectación, pero la proliferación celular es menor. Aunque existen estudios que no obtuvieron diferencias en la diferenciación, en la morfología, en el potencial de diferenciación, ni en la tasas de proliferación (Pereira y cols., 2012), existen otros en los que se encontró una disminución del potencial de diferenciación adipogénico, osterogénico y dentinogénico (Sun y cols., 2014). Además estas células muestran potencial para conservar propiedades células madre tras un trasplante *in vivo* a largo plazo. (Lei y cols., 2014)

### 3.2.3.2. Células madre de la papila apical (SCAP).

La papila apical es un tejido blando que rodea el ápice en los dientes jóvenes con ápice abierto en desarrollo (Sonoyama y cols., 2008). Está localizada más apicalmente que la membrana del epitelio y existe una capa rica en células entre la pulpa y la papila apical. La diferencia que existe entre la pulpa dental y la papila apical es que esta es el tejido precursor de la pulpa radicular (Huang y cols., 2009).

Son células clonogénicas, capaces de diferenciarse a odontoblastos, osteoblastos y adipocitos. Existe un marcador específico, CD24, que es expresado por las SCAP, no detectable en otras células madre mesenquimales, incluidas las DPSC. Pueden aislarse de terceros molares extraídos de pacientes jóvenes, obteniendo unas células postnatales de alta plasticidad para tratamientos regenerativos (Sonoyame y cols., 2006).

Según algunos estudios las SCAP son la fuente de aportación de odontoblastos primarios, que se encargan de la formación de la dentina radicular, mientras que las DPSCs son las responsables del recambio de los odontoblastos en la fase reparativa de la dentina (Huang y cols., 2008).

Estas células expresan alto niveles de mediadores de proliferación celular. El desarrollo de los tejidos derivados de las SCAP y la migración celular en los ensayos de curación de heridas fue superior que el presentado por las DPSC del mismo diente (Sonoyame y cols., 2006).

### 3.2.3.3. Células madre del folículo dental (DFSCs).

El folículo dental es un saco de tejido conectivo derivado del ectomesénquima que rodea al germen del diente en desarrollo antes de la erupción.

Las DFSCs se caracterizan por su rápida adhesión en los cultivos y por su expresión de marcadores indicadores de células madre como STRO-1, nestin y notch-1; y cumplen los criterios para ser consideradas células madre de origen mesenquimal (Mori y cols., 2012). Pueden ser fácilmente aisladas del folículo de terceros molares que todavía no hayan erupcionado (en edades tempranas, 7-12 años).

Muestran una proliferación más rápida comparada con las DPSCs, un mayor número de células que expresan el marcador STRO-1 y una capacidad de regenerar dentina in vivo aumentada. Esta capacidad puede ser una ventaja, aunque puede suponer un riesgo potencial de formación de tumores (Peng y cols., 2009).

Tienen un alta tasa de proliferación siendo de fácil acceso. Son capacidad de diferenciación en varias líneas celulares, como odontoblastos, y contribuir a la formación de dentina en presencia de la matriz dentinaria; ligamento periodontal in vivo, tejido fibroso y un tejido similar al cemento cuando se implanta en ratones inmuodeprimidos. (Hynes y cols., 2012) y de formación de cemento y fibroblastos (Handa y cols., 2002). Además tienen capacidad osteogénica, adipogénica y neurogénica. La capacidad condrogénica está en duda en los estudios actualmente. Tiene la posibilidad de crioconservación durante muchos años (Honda y cols., 2010) manteniendo la expresión de los marcadores de células madre (Mori y cols. 2012).

### 3.2.3.4. Células madre de los dientes temporales exfoliados (SHED).

Miura y cols. (2003) probaron que la pulpa remanente de los dientes temporales exfoliados contienen una población de células madre multipotenciales. Se pueden obtener a través de métodos no invasivos, de muy fácil acceso, presentan una disposición natural y presentan muy pocos problemas legales o éticos; siendo

capaces de proporcionar suficientes células para la aplicación clínica potencial.

A diferencia de las DPSCs no son capaces de generar un tejido pulpar completo, lo cual indica la posibilidad que sean células más inmaduras que estas. También muestran una mayor tasa de proliferación y una mayor capacidad de autorrenovación que las células madre procedentes de medulla ósea (BMMSC) y las DPSCs. Presentan una alta capacidad para inducir la formación ósea *in vivo*. No se diferencian directamente en osteoblastos, pero sí inducen la formación de hueso nuevo mediante el reclutamiento de células osteogénicas. En otra línea de diferenciación son capaces de adquirir morfología de células hepáticas *in vitro* (Ishkitiev y cols., 2010).

#### 3.2.3.5. Células Madre del ligamento periodontal (PDLSCs).

El ligamento periodontal es un tejido conectivo que se encuentra entre el cemento radicular y la pared interna del hueso alveolar. El periodonto es un tejido especializado derivado del folículo dental y de las células de la cresta neural.

Las células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) son células clonogénicas, de alta proliferación y capaces de regenerar un tejido similar a cemento/ligamento periodontal y con morfología similares a fibroblastos. Tienen marcadores de superficie similares a los registrados para diferentes poblaciones de células madre mesenquimales como Stro-1 y CD146/Muc18. Cumplen las características para ser consideradas células mesenquimales indiferenciadas (Seo y cols., 2004).

Exhibe un número más alto de duplicaciones de la población en comparación con BMMSC (El-Sayed y cols., 2013). Pueden ser aisladas dentro del tejido de granulación de defectos intraóseos ocasionados a consecuencia de enfermedad periodontal (Park y cols., 2011).

Las PDLSCs tienen capacidad para diferenciarse a cementoblastos, a células formadoras de colágeno y a adipocitos. Por tanto, tienen capacidad osteogénica pero en menor medida que las BMMSC. En cambio la capacidad adipogénica es

similar. *In vivo* son capaces de diferenciarse a cementoblastos funcionales y producir cemento cuando son trasplantados en la superficie dorsal de ratones inmunodeprimidos (Yang y cols., 2009). Contribuyen a la reparación del tejido periodontal cuando son trasplantadas en defectos periodontales inducidos en el área molar de la mandíbula de ratas inmunocomprometidas. Se pueden integrar en la mandíbula para reparar el defecto periodontal y conectar las superficies del hueso alveolar y del diente. Estos datos fundamentan el empleo de estas células en la terapia de regeneración del tejido destruido por la enfermedad periodontal (Yang y cols., 2009).

El trasplante de PDLSCs autólogas puede generar nuevo cemento y fibras de Sharpey 's de ligamento periodontal, así como el hueso alveolar en el modelo de periodontitis avanzada en perros Beagle (Park y cols., 2011).

La población celular puede producir mineralización de la matriz extracelular y diferenciación adipocítica y condrogénica. Cuando se estudia la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica en situación de un entorno inflamatorio, ambas disminuyen; sobre todo en la osteogénica (Yang y cols., 2013).

En un estudio en el que se utilizaron celular madre de la papila apical y células madre del ligamento periodontal se generó dentina y ligamento periodontal con la posibilidad de obtener una estructura similar al complejo periodonto-raíz con la estructura de andamiaje basada en trifosfato cálcico e hidroxapatita. Tras ocho semanas implantadas se obtuvo cemento radicular. Las fibras colágenas generadas *in vivo* fueron capaces de conectar el nuevo tejido similar al cemento imitando las fibras de Sharpey (Sonoyama y cols., 2006).

Una subpoblación de PDLSCs que expresan marcadores específicos (Oct4, Nanog, Sox2 and Klf4) fue capaz de diferenciarse en líneas celulares neurogénicas, cardiogénica, osteogénica y condrogénicas (mesodermo). La diferenciación de hPDLSCs en células productoras de insulina es sugestiva de la diferenciación de pancreática, lo que indica que las PDLSCs pueden ser capaces de diferenciarse en el linaje endodérmico. Esto nos sugiere la posible capacidad pluripotente de estas células (Huang y cols., 2009).



Lee y cols. (2014). demostraron la capacidad de diferenciación en tejido similar a los islotes pancreáticos en cultivos 3D *in vitro*, que puede proporcionar una nueva población de células con una posible alternativa para la reparación pancreática y el tratamiento de pacientes con diabetes.

Los cultivos de células autólogas del ligamento periodontal ayudan en el restablecimiento de la arquitectura periodontal en los dientes autotransplantados, en los que no existen células periodontales viables (Wang y cols. ,2010).

PDLSCs presentan capacidad potencial de reparar daño en el nervio dentario. El trasplante de células a la zona dañada del nervio produce una recuperación de la función sensitiva. La inyección local de células proporciona una regeneración similar a la obtenida con la administración autóloga de células de Schwann (Li, 2013).

Además las PDLSCs tiene potencial, si se siguen protocolos adecuados, de diferenciación tienen potencial de diferenciación neuronal *in vitro* (Li, 2010).

3.2.3.6. Otras células madre que se pueden obtener de los tejidos orales.

- Células madre de tejido gingival (GMSC).

Son células de fácil acceso que presentan características que incluyen la proliferación *in vitro* como células adherentes a plástico, capacidad de autorrenovación, con una morfología similar a fibroblastos; capacidad de formación de colonias, potencial de diferenciación a múltiples líneas celulares, incluyendo tejidos mesodérmico (adipocitos, osteocitos), endodérmico, y neuroectodérmico, y la expresión de marcadores de superficie de células mesenquimales (Ge y cols., 2012).

Poseen capacidad inmunosupresora, pueden provocar un potente efecto inhibitor sobre la proliferación de células T en respuesta a la estimulación por mitógenos y de suprimir la proliferación de células mononucleares en sangre periférica (Zhang y cols., 2009); son capaces de ser inducidas a la diferenciación en medios específicos en líneas osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas (Mitrano y cols., 2010).

- Células madre de tejido inflamatorio periapical (PL-MSC).

Recientemente se han aislado células madre de tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas. Estas células fueron positivas para los marcadores de CMM STRO-1, CD90 y CD146. Tras el segundo pase, las células mostraron niveles bajos de STRO-1 y CD146 y moderados de CD90, CD73 y CD105 (Liao y cols., 2011).

Presentaron capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos en un experimento *in vitro*. En un estudio *in vivo* formaron tejido mineralizado en ratas inmunocomprometidas (Dokić y cols., 2012), sin embargo Liao y cols. (2011) obtuvieron resultados en los que las células mostraron capacidad osteogénica pero no adipogénica.

- Células madre de la lámina propia mucosa oral (OMLP-PCs).

Son células que tiene su origen en la cresta neural, por lo que mantienen el potencial de diferenciación tanto en la línea mesenquimal como en la neuronal. Son capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, células del endodermo y células neurales -neuronas y células de Schwann (Davies y cols., 2010)

Son de fácil acceso, ya que pueden ser obtenidas a partir de una biopsia mínimamente invasiva de la mucosa bucal, que cura sin la formación de cicatriz o con una mínima formación de esta (Davis y cols., 2011).

Poseen el potencial de suprimir la proliferación de linfocitos de sangre periférica. Este efecto modulador inmunológico les proporciona una amplia posibilidad de usos en aplicaciones de ingeniería de tejidos alogénicos, así como su potencial en el tratamiento directo de los trastornos relacionados con la inmunidad (Davies y cols., 2011).

- Células madre de la médula ósea de mandíbula (OMSCs).

Son células capaces de formar colonias de células clonogénicas adherentes procedentes de una sola célula que muestra una morfología similar a fibroblastos.

Como el hueso de la mandíbula contiene una cantidad limitada de componente medular, es difícil su recolección y ampliación (Yamaza y cols., 2011). Una vez aisladas presentan una mayor capacidad de proliferación y de unidades formadoras de colonias que las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSCs). Expresan los marcadores de las células mesenquimales, pero no expresan marcadores hematopoyéticos, que si son observados en otras células de origen ósea como las obtenidas de la cresta ilíaca. Tienen un potencial osteogénico *in vitro* e *in vivo* mayor que las células obtenidas de la cresta ilíaca. Su potencial condrogénico y adipogénico es menor que el de las BMMSCs obtenidas de la cresta ilíaca.

Existen similitudes o diferencias menores en su inmunoreactividad. En ratones estas células presentan una interacción menor con las células. (Akitoye y cols., 2006 )



## **4. JUSTIFICACIÓN.**



Desde la aparición del MTA y su aplicación en el campo de la Endodoncia han aparecido distintos materiales basados en silicatos de calcio con el fin de mejorar las propiedades y ampliar las aplicaciones clínicas de aquel. Inicialmente, estos materiales tenían las mismas aplicaciones que el MTA. La posibilidad de su uso como selladores endodóncicos, junto con las mejoras incorporadas en cuanto a sus propiedades y características de uso clínico, ha hecho que estos nuevos materiales se estén desarrollando notablemente en la actualidad. Así, han aparecido y continúan desarrollándose nuevos productos con distintas indicaciones.

La rápida evolución en este ámbito requiere una constante investigación aplicada para establecer sus posibilidades, limitaciones e indicaciones: estudios clínicos, análisis de propiedades físico-mecánicas y, por supuesto, estudios de orden biológico, como, por ejemplo los estudios de biocompatibilidad.

Con la presente investigación se pretende aportar conocimiento sobre este último aspecto, para ello se estudiarán dos de estos nuevos materiales de tipo biocerámicos con indicación como cementos selladores de conductos en cuanto a su efecto sobre células madre.





## **5. OBJETIVOS.**



## **Objetivo General.**

Evaluar la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos, uno de resina epóxica y dos biosilicatos sobre células madres del ligamento periodontal.

## **Objetivos Específicos.**

Para cada material estudiado:

- Evaluar la proliferación celular.
- Establecer los niveles de apoptosis celular.
- Describir la capacidad de migración de células madres.
- Evaluar la adhesión celular.
- Evaluar la morfología celular.

Comparar los efectos de los distintos materiales analizados entre si.

Hipótesis nula: los cementos biocerámicos estudiados no presentan citotoxicidad para las células madre.



## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. Obtención de las células madre del ligamento periodontal.**

El proceso fue el siguiente:

- Obtención de dientes (n=8)<sup>1</sup>
- Deposito en cultivo celular (MEM; Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Conservación a 4-8°C)
- Separación del ligamento periodontal.
- Centrifugación.
- Disgregación enzimática y mecánica.
- Estimación de la Viabilidad (Hemocitometro y Azul Tripam)
- Cultivo celular (MEM) a 37°C 5%CO<sub>2</sub> 95% Humedad.
- Identificación de las células madre del ligamento periodontal (Citometría de flujo).<sup>2</sup>

1. Los dientes (tercero molares impactados) fueron cedidos para la investigación a través de un consentimiento. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Murcia (NO. 300 305440013)

2. Para confirmar el fenotipo mesenquimático de las células madre de ligamento periodontal aisladas se estudio la expresión de diferentes marcadores mesenquimáticos mediante citometría de flujo. Los anticuerpos usados fueron: CD73-APC (clon AD2), CD90-FITC (clon DG3), CD105-PE (clon 43A4E1), CD14-PerCP (clon TÜK4), CD20-PerCP (clon LT20.B4), CD34-PerCP (clon AC136) y CD45-PerCP (clone 5B1) -human MSC phenotyping cocktail, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania-.

## **2. Ensayo experimental.**

### **2.1 Materiales.**

Los materiales de estudio fueron: MTA Fillapex (Angelus Industria de Produtos Odontologicos S/A, Londrina, PR, Brasil), TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire, La-

Chaux-de-Fonds, Suiza) y AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemania).  
(Tabla 6)

Material	Tipo	Presentación	Componentes
TotalFill	Biocerámico	Pasta premezclada	FKG Dentaire, EEUU. Óxido de circonio, silicatos de calcio, fosfato monocalcico, hidróxido de calcio, agentes de relleno y espesantes.
Fillapex,	Biocerámico	Pasta-Pasta	Angelus, Brasil. Resina salicilato, Resina diluyente, Resina natural, óxido de Bismuto, Sílica nanoparticulada, Mineral Trióxido Agregado.
AH Plus	Base de resina epóxica	Pasta-Pasta	Dentsply, Alemania. Pasta A: Resina epoxi de Bisfenol-A, Resina epoxi de Bisfenol-F ,Tungstenato de calcio Oxido de zirconio, Silice, Oxido de hierro Pasta B: Dibenzil-diamina Aminoadamantano Triciclo-decano-diamina Tungstenato de calcio Oxido de zirconio , Silice, Aceite de silicona

Tabla 6. Presentación y composición de los materiales utilizados.

## 2.2 Preparación de los extractos.

Para realizar el estudio se ha pretendido simular las condiciones en que los distintos materiales iban a interactuar con el ligamento periodontal. Puesto que son materiales destinados a fraguar dentro de la raíz, que es una estructura porosa y se relaciona con las células del ligamento periodontal a través del conducto radicular principal o accesorios, se eligió el método de elución, en el que se extrae una sustancia por absorción, que llamaremos extracto o eluato, mediante un disolvente que entra en contacto con el material, que llamamos



eluyente. El eluyente es el medio de cultivo que se incubó durante 24 horas con el material de estudio, y el extracto resultante se aplicará en distintas concentraciones sobre las células.

En el ensayo se aplicó cada concentración de eluyente a tres pocillos diferentes, y tres semanas más tarde se repitió todo el ensayo, por lo que se hizo por sextuplicado. Además de las diluciones, se empleó un control negativo (medio de cultivo), y un blanco (medio de cultivo sin células, para contrarrestar la contaminación colorimétrica del propio medio de cultivo).

La preparación de los extractos de los distintos materiales se realiza siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para tests de citotoxicidad *in vitro*. (Rodríguez-Lozano y cols., 2013). Para ello, se mezclaron los materiales y se prepararon según las instrucciones del fabricante en condiciones de esterilidad. Una vez mezclados, se colocaron fragmentos de los materiales de 2-3 mm de alto y 35 mm de diámetro en placas estériles de 6 mm de alto y 35 mm de diámetro y se dejaron fraguar en una cámara de humedad (según el material) a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez fraguados todos los materiales, se cubrieron con medio de cultivo, (MEM; Sigma-Aldrich, Madrid, España), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland), L-glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Austria) y penicilina /estreptomicina (PAA Laboratories), en una relación de 3 cm<sup>2</sup> de material en la placa por cada mililitro de medio de cultivo según la norma ISO 10993-5, y se dejaron 24h en la incubadora de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, se recogió con una jeringa estéril el medio de cultivo que se había incubado con los materiales de estudio y se filtró para eliminar residuos, con un filtro para tamaño de partícula 0,22 µm (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.) y con capacidad para un volumen de 1-10 ml de volumen filtrado.

A partir de aquí se obtuvo un resultante, que fue la concentración total, a partir de la cual se fueron preparando las diluciones 1/2 y 1/4.

### **2.3** Ensayo de proliferación celular MTT.

La tasa de proliferación células en presencia de las diferentes eluciones de los selladores se evaluó utilizando un ensayo MTT (MTT Cell Growth Kit, Chemicon, Rosemont, EE.UU.). Con esta técnica se quiso evidenciar la proliferación de las hPDLSCs en presencia del extracto sin diluir y con las diluciones 1/2 y 1/4 . Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa sobre el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como resultado se genera formazán, un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo.

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

- a) Se sembraron hPDLSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo.
- b) Tras 24 horas de incubación a 37°C , 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad, se aplicaron 100µl/ pocillo de diluciones 1/1,1/2, 1/4, y se incubaron a 24, 48 y 72h a 37°C , 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.
- c) Transcurrido el tiempo de incubación (24h, 48 ó 72 horas), se sustituyó el DMEM con rojo fenol por 400 µl de DMEM sin rojo fenol.
- d) El reactivo MTT se añadió a cada uno de los pocillos para quedar a una concentración final de 3,8 mg/ml y se incubó a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.
- e) Tras la incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 400 µl de DMSO por pocillo.
- f) Se trasvasaron 200 µl del contenido de cada pocillo a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 570 nm con medida de referencia a 620 nm utilizando un lector de microplacas automático (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, EE.UU.)

#### **2.4. Ensayo de Apoptosis celular.**

El procedimiento fue el siguiente:

- a) Se sembraron hPDLSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo.
- b) Tras 24 horas de incubación a 37°C , 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad, se aplicó 100µl/ pocillo de diluciones 1/1, 1/2, 1/4, y se incubó a 24, 48 y 72h a 37°C , 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Como control positivo se usó Estaurosporina (Sigma Aldrich, Madrid, España) 250 µL en las mismas condiciones.
- c) Una vez retirado el medio de cultivo, la placa se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con una solución Hoechst 33342 en PBS con una concentración final de 1 mg/ml.
- d) Tras retirar la solución y añadir PBS se valoró la muerte contando al menos 200 células y calculando el porcentaje de células vivas para cada condición usando microscopio de fluorescencia (Leica DMI 4000B, Wetzlar, Alemania).

Para valorar morfológicamente la apoptosis celular, se usó Hoechst 33342, colorante derivado del benzimidazol, que emite una fluorescencia azul cuando es excitado por luz ultravioleta. Este compuesto no es un intercalante de DNA, pero se une a DNA específicamente, preferentemente a regiones ricas en bases adenina-timidina (A-T), marcando fuertemente los núcleos celulares de las células alteradas. Las células viables mostraron una morfología normal y una fluorescencia azul baja y homogénea, mientras que las células muertas exhibían una morfología alterada y una fluorescencia azul intensa. De esta manera, los núcleos picnóticos y apoptóticos fueron fácilmente identificables.

## **2.5** Ensayo de migración celular.

Para este ensayo, cultivamos hPDLSCs a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaran la confluencia. En ese momento, despejamos de células de varias zonas (*wounds*) paralelas utilizando una punta de 200 µl de pipeta estéril, cambiamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas

y administramos las diluciones por triplicado. Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como referencia marcas realizadas en el fondo del pocillo con rotulador permanente, tras despejar las zonas (0 horas), a las 24 y a las 48 horas de tratamiento, utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Tokio, Japón).

Las imágenes obtenidas fueron corregidas con Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems, McLean , VA , EE.UU. ), mientras que se utilizó el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.) para medir la superficie cubierta por las células. Se determinó la distancia más corta entre las células que habían migrado a la región descubierta y sus respectivos puntos de partida. El número de células que habían migrado a la zona despejada hasta las 48h fue igualmente cuantificado.

## **2.6** Ensayo de Adhesión celular.

Para este experimento se utilizó colágeno tipo I (Enzo Life Sciences, Loerrach, Alemania). El procedimiento fue el siguiente:

- a) Primero se realizó el proceso de gelificación según las normas del fabricante. Para ello se usó una placa de 96 pocillos.
- b) Tras la formación del gel, los pocillos recubiertos con colágeno se lavaron con PBS y los sitios de unión no específicos se bloquearon usando 1 % de albúmina de suero bovino (BSA ) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 37°C durante 1 h.
- c) Posteriormente  $3 \times 10^3$  hPDLSCs se resuspendieron en las diferentes diluciones (1:1, 1:2 , o 1:4 ) y se dejaron adherir durante 24, 48, y 72 horas a 37°C. Como control se usó un medio completo.
- d) Tras el tiempo establecido, se retiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- e) El recuento de adherencia se hizo en 10 campos al azar para muestra y después, se calculó el número medio de células adheridas en cada condición experimental.

## **2.7** Estudio microscópico de la morfología celular.

Se utilizó la microscopía electrónica de barrido (MEB) para analizar la morfología celular en cada sellador endodóntico. Diferentes muestras de TotalFill BC sellador, MTA Fillapex, y AH Plus se conformaron en un disco de 1,6 mm de espesor por 5 mm de diámetro utilizando moldes de teflón.

Quince discos de cada material se prepararon y se subdividieron en 3 grupos, de 5 muestras cada uno. Para eliminar posibles subproductos tóxicos todos los discos se incubaron primero a 37°C en placas de cultivo de 24 pocillos que contienen 1 ml de agua destilada que se cambiaron al día durante 5 días. Después, las PDLSCs se sembraron directamente sobre cada disco a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml.

Después de 4 días de cultivo, las muestras sembradas con hPDLSCs fueron retirados de los pocillos de cultivo, se enjuagaron con PBS y se fijaron con 3% de glutaraldehído en 0,1 M tampón de cacodilato de 1,5 h a 4°C. Luego, se aclararon de nuevo y después fijados en tetróxido de osmio durante 1 hora antes de ser deshidratados en una serie de soluciones de etanol graduadas (30, 50, 70, 90% vol/vol). El secado final se realizó por el método de punto crítico (CPDO2 Balzers Union). Finalmente, las muestras metalizadas con oro fueron examinados por MEB.

## **2.8** Análisis estadístico.

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 15.0) para Windows. en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

Estadística inferencial:

Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería

rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado "p-valor") no sea superior al nivel crítico estándar de 0,05. Para la comparación de grupos se usó un ANOVA de una cola seguido de un test de Bonferroni.

### **III. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.**



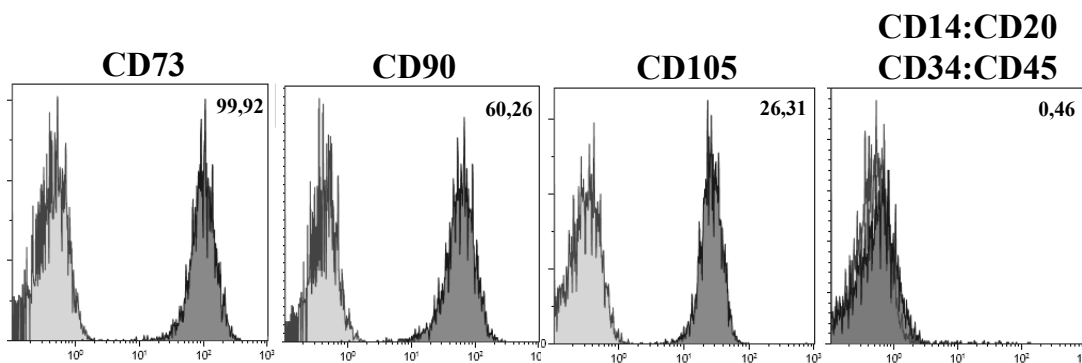


# 1. RESULTADOS



## 1. 1 Obtención de las células madre del ligamento periodontal

Tras el aislamiento y el cultivo, se realizó la confirmación del fenotipo de células madre mesenquimal por citometría de flujo. Más del 95% de las células madre de ligamento periodontal, presentaron resultados positivos de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105; y negativos para los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45. (gráfica 1).



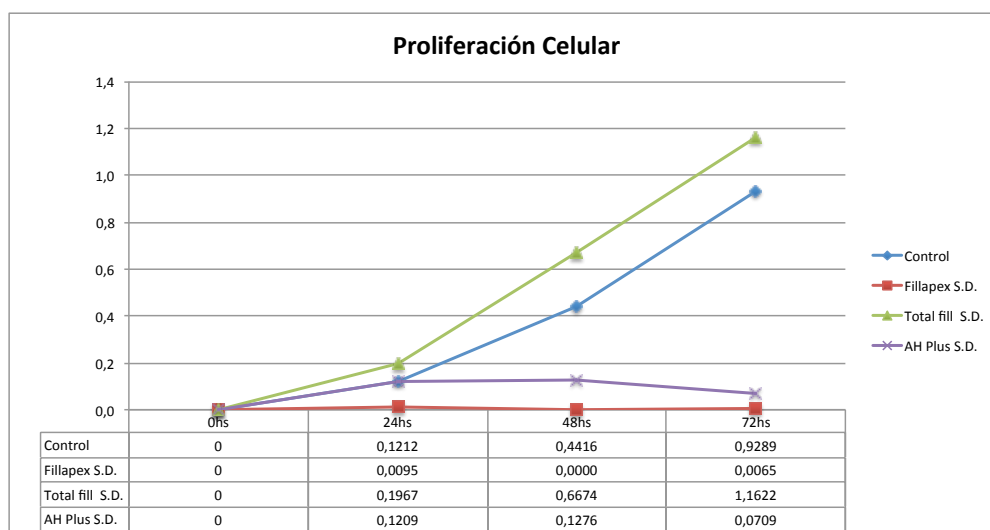
Gráfica 1. Expresión de marcadores específicos mediante citometría de flujo

## 1.2 Ensayo experimental.

### 1.2.1 Ensayo de proliferación celular MTT.

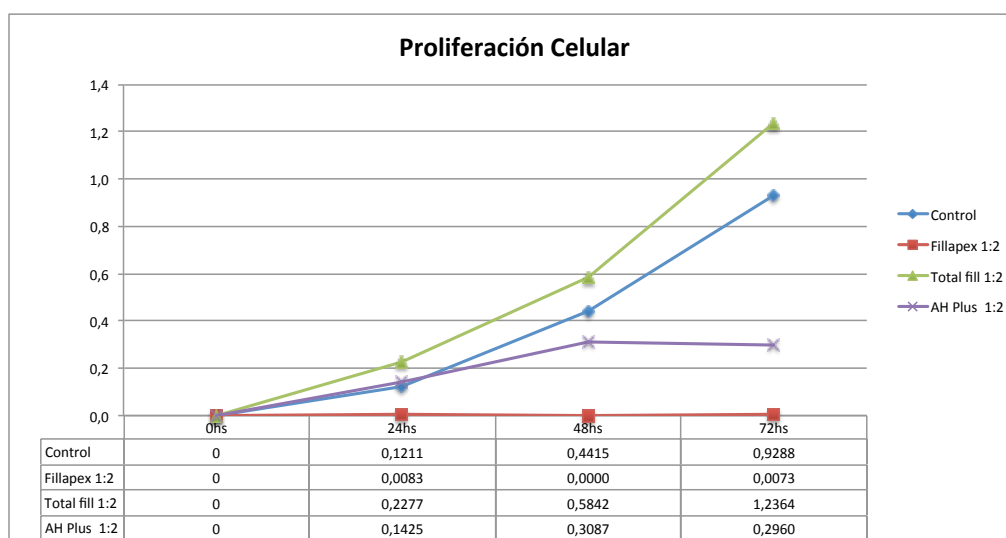
Se midió la proliferación celular de las células madre del ligamento periodontal tras la exposición a diferentes diluciones de los selladores endodóncicos estudiados (sin diluir; dilución 1/2 , dilución 1/4 ), a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Cuando se utilizó el sellador sin diluir (gráfica 2), se halló una reducción significativa del crecimiento celular con MTA Fillapex y con AH plus en todos los tiempos, mientras que con TotalFill BC Sealer el crecimiento celular fue significativamente superior al del grupo control ( $p < 0,05$ ).



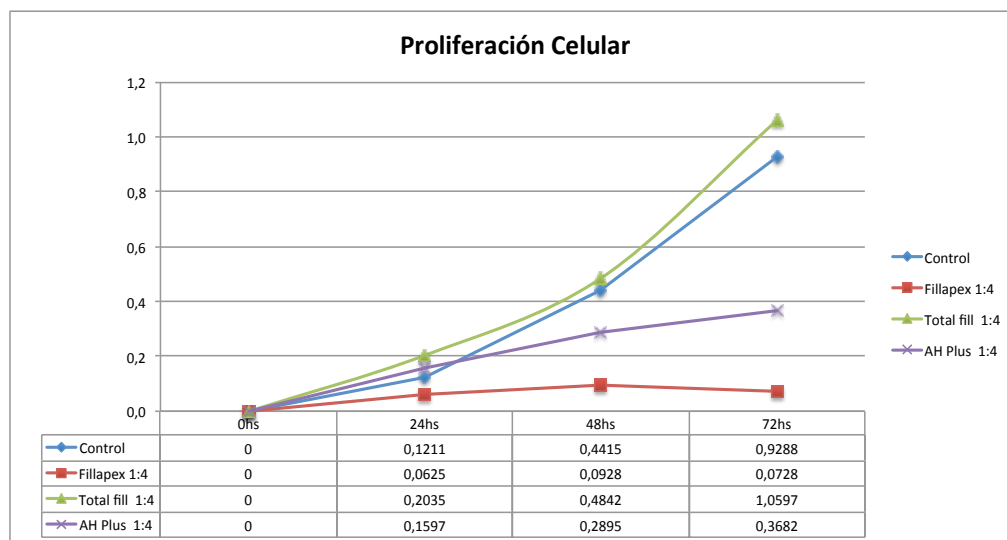
Gráfica 2: Proliferación celular de los diferentes selladores aplicados sin diluir

Para la dilución 1:2, los datos se muestran en la gráfica 3, puede apreciarse que las células incubadas en presencia de MTA Fillapex presentaron una proliferación celular disminuida en todas los tiempos evaluados respecto al grupo control. Con AH Plus, se hallaron diferencias estadísticamente significativas a las 48 y 72 horas ( $p < 0,05$ ) respecto al control, mientras que con TotalFill la proliferación celular fue significativamente superior a la del grupo control ( $p < 0,05$ ).



Gráfica 3: Proliferación celular de los diferentes selladores aplicados a dilución 1:2

Para la dilución 1:4, también el grupo MTA Fillapex indujo la menor proliferación celular en todos los tiempos, significativamente inferior a la del grupo control ( $p < 0,05$ ). Para AH plus a las 48 y 72 horas se halló una proliferación significativamente menor que la del grupo control ( $p < 0,05$ ), mientras que la proliferación inducida por Totalfill fue similar a la del grupo control (gráfica 4).



Gráfica 4: Proliferación celular de los diferentes selladores aplicados a dilución 1:4

A modo de resumen, el cemento Totalfill permitió la mayor proliferación celular, superior a la del grupo control en todas las diluciones, en segundo lugar se posicionó AH plus, apreciándose que a concentraciones más bajas permitía mayor proliferación celular, sin embargo, para todas las concentraciones, a medida que aumentaban los tiempos la capacidad de proliferación celular se reducía. Fue MTA Fillapex el cemento que menor proliferación celular indujo en todos los tiempos y diluciones.

### 1.2.2 Efecto de los diferentes selladores en la morfología celular y apoptosis.

Se realizó un análisis de la morfología de las células viables resultantes tras la incubación con las diferentes diluciones de los selladores.

Debido a que las células apoptóticas muestran unos núcleos condensados o fragmentados, visibles con un colorante que emite una fluorescencia azul cuando es excitado por luz ultravioleta, se puede hacer una valoración de la cantidad de

células que han sufrido apoptosis. Como control positivo se utilizaron células tratadas con estaurosporina (STS), y como control negativo se utilizaron las células periodontales obtenidas sobre el medio de cultivo sin ningún tipo de material.

En la figura 1, se muestran imágenes del cultivo de los controles positivo y negativo, las imágenes azul intenso y más desestructuradas corresponden a células muertas, mientras que las menos brillantes y uniformes corresponden a células vivas.

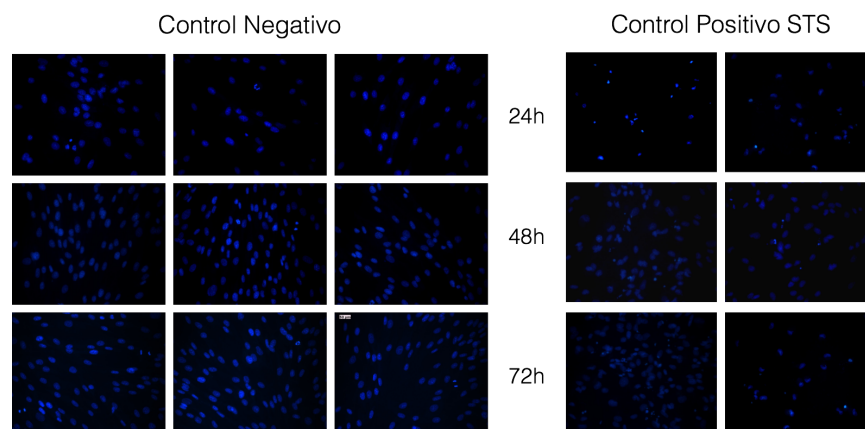


Figura 1. Imágenes de la apoptosis celular ocasionada por los controles negativo y positivo

En la Figura 2, se muestran imágenes de la apoptosis provocada por Fillapex con las diferentes diluciones y tiempos. Desde un punto de vista morfológico, se aprecia que una evidente fragmentación de la cromatina e irregularidades morfológicas del núcleo que sugieren un estado de apoptosis celular.

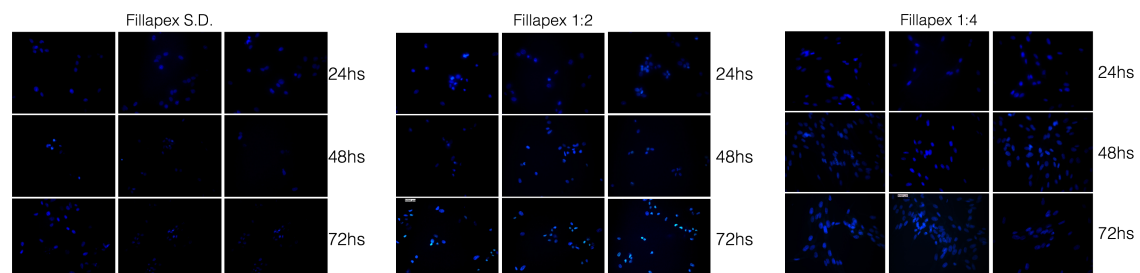


Figura 2. Imágenes de la apoptosis celular ocasionada por Fillapex

En la Figura 3, se muestran imágenes de la apoptosis provocada por Totalfill con las diferentes diluciones y tiempos. Desde un punto de vista morfológico, se aprecia que no se aprecian alteraciones del núcleo ni fragmentación de la cromatina.

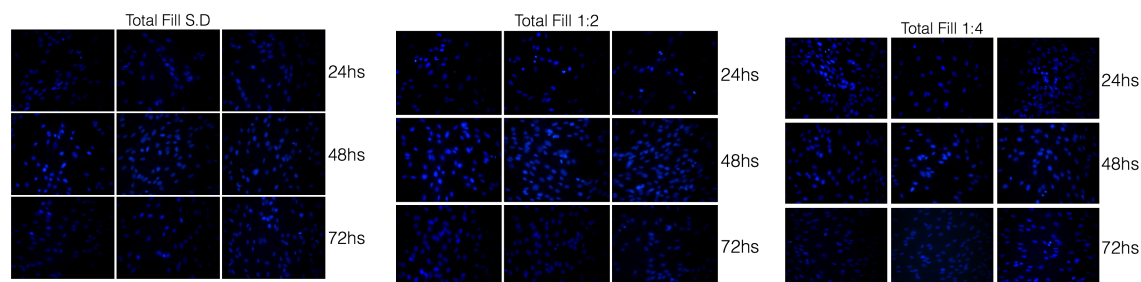


Figura 3. Imágenes de la apoptosis celular ocasionada por Totalfill

En la Figura 4, se muestran imágenes de la apoptosis provocada por AH plus con las diferentes diluciones y tiempos. Desde un punto de vista morfológico, se aprecia leve fragmentación de la cromatina, aunque en muy pocas células y en ningún caso como en el caso de Fillapex.

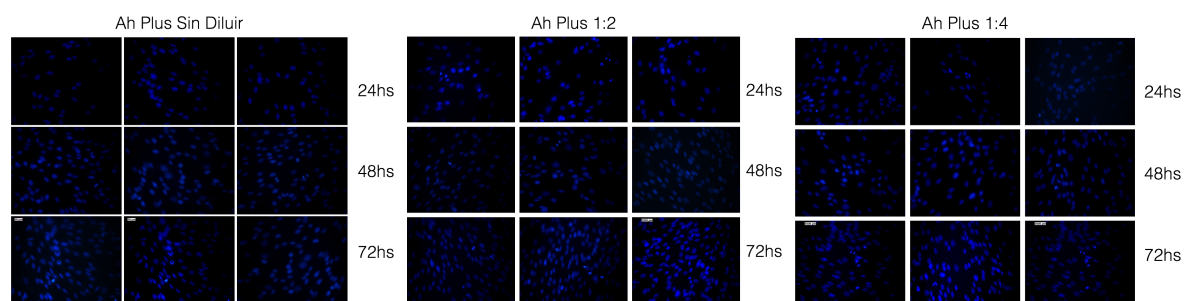


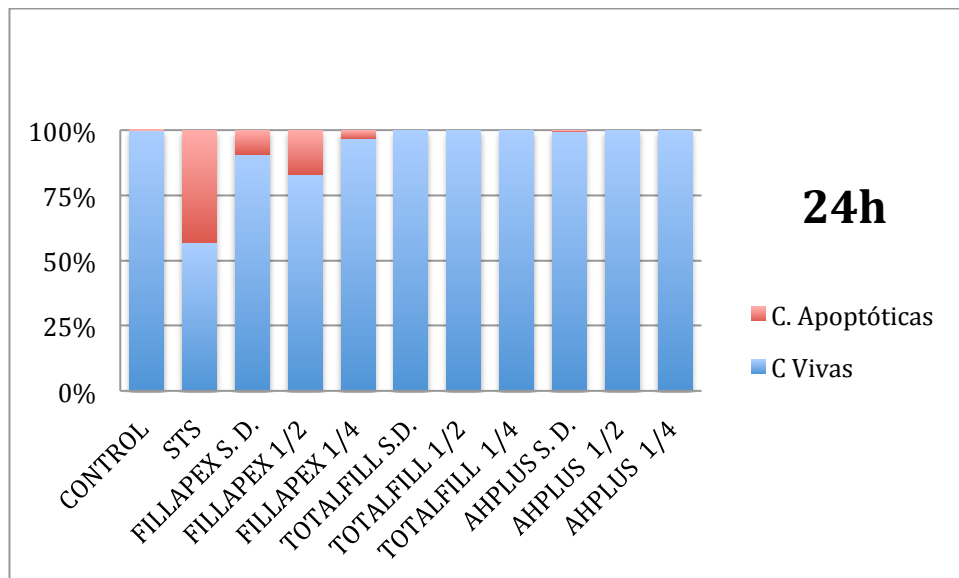
Figura 4. Imágenes de la apoptosis celular ocasionada por AH plus

La valoración numérica de la apoptosis celular producida por los diferentes selladores a los diferentes tiempos y diluciones, están representados en las gráficas 5 a 7.

En todas las muestras expuestas a diluciones de MTA Fillapex en 24 h se puede observar una disminución de las células vivas. Esta disminución en los grupos sin diluir y dilución 1:2 fue del 9,2 y del 16 %, presentando diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente).

La disminución de células vivas en el grupo de dilución 1:4 fue de 3,2 % , sin presentar diferencias significativas con respecto al grupo control (gráfica 5).

A las 24 horas los cultivos expuestos a diluciones de TotalFill y AH Plus no presentaron diferencias ni entre si, ni con el grupo control en todas sus diluciones (gráfica 5).

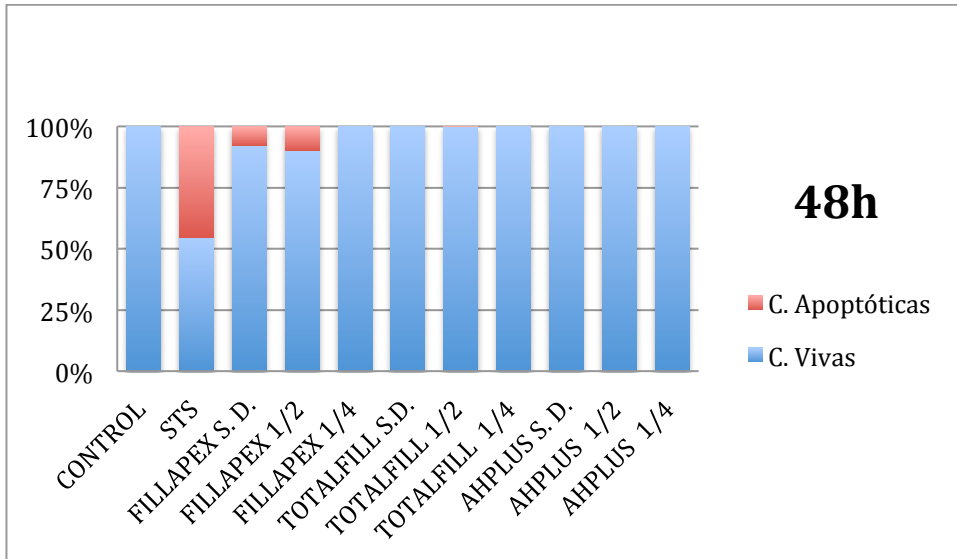


Gráfica 5. Porcentaje de células apoptóticas y vivas a las 24 horas

Tanto a las 48 h como a las 72 h el MTA Filapex presentó nuevamente resultados de disminución estadísticamente significativos de células vivas en el grupo sin diluir y en la dilución 1:2. En cambio en el grupo de dilución 1:4 no presento ninguna célula muerta ni en proceso de división en ambos grupos de tiempo

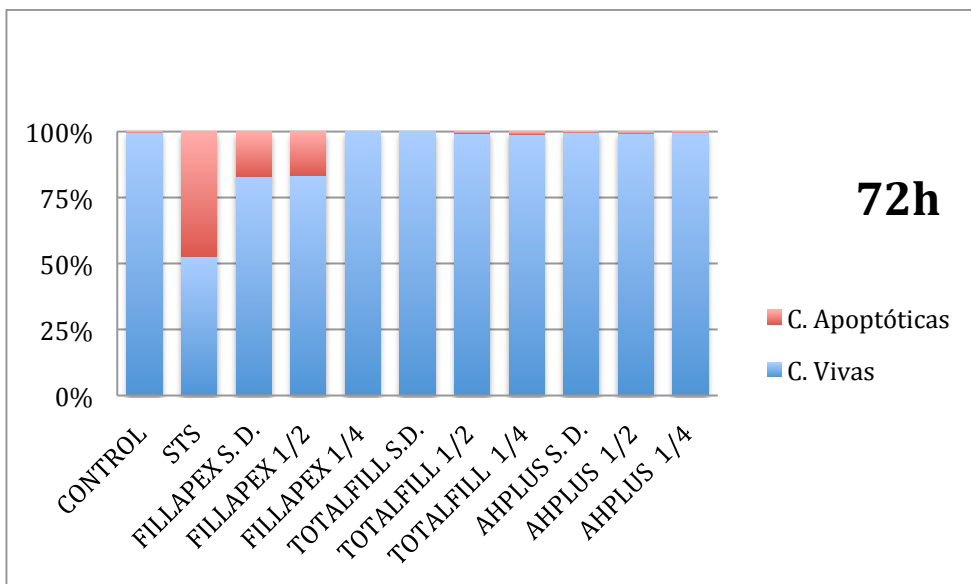
En las muestras analizadas a las 48 y 72 h de cultivo no se hallaron diferencias significativas entre los grupos Totalfil y AH Plus con respecto al grupo control (gráficas 6 y 7).





Gráfica 6. Porcentaje de células apoptóticas y vivas a las 48 horas.

A las 72 h de incubación, los dos únicos grupos que consiguen un cien por cien de células vivas son el grupo de MTA fillapex, en una dilución 1:4 y grupo sin dilución de TotalFill sin dilución (gráfica 7).



Gráfica 7. Porcentaje de células apoptóticas y vivas a las 72 horas.

### 1.2.3 Ensayo de Migración celular.

Los resultados de los ensayos de migración células, se realizaron mediante un modelo de curación de herida (wound healing), se toman imágenes de las zonas despejadas y se observa la recolonización o no de las células. (Fig 5-8). La figura 5, muestra el avance en el crecimiento celular para el grupo control, se aprecia que a medida que aumenta el tiempo de cultivo se aprecia mayor cantidad de células.

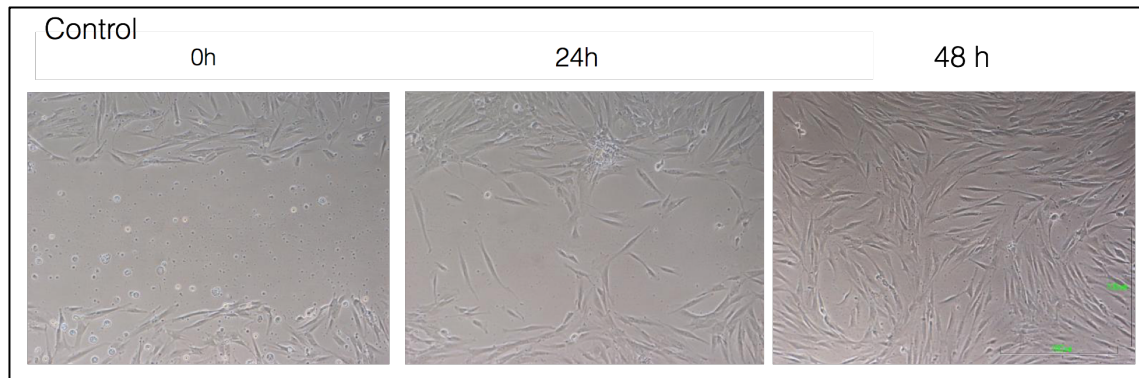


Figura 5. Imágenes del crecimiento celular en el grupo control

En todos los extractos de dilución del MTA Fillapex se observa una ausencia de migración en todas las diluciones a las 24h y 48 h en los grupo sin dilución y dilución 1:2, tan solo se aprecia una leve migración en la dilución 1:4 a las 48 h (figura 6).

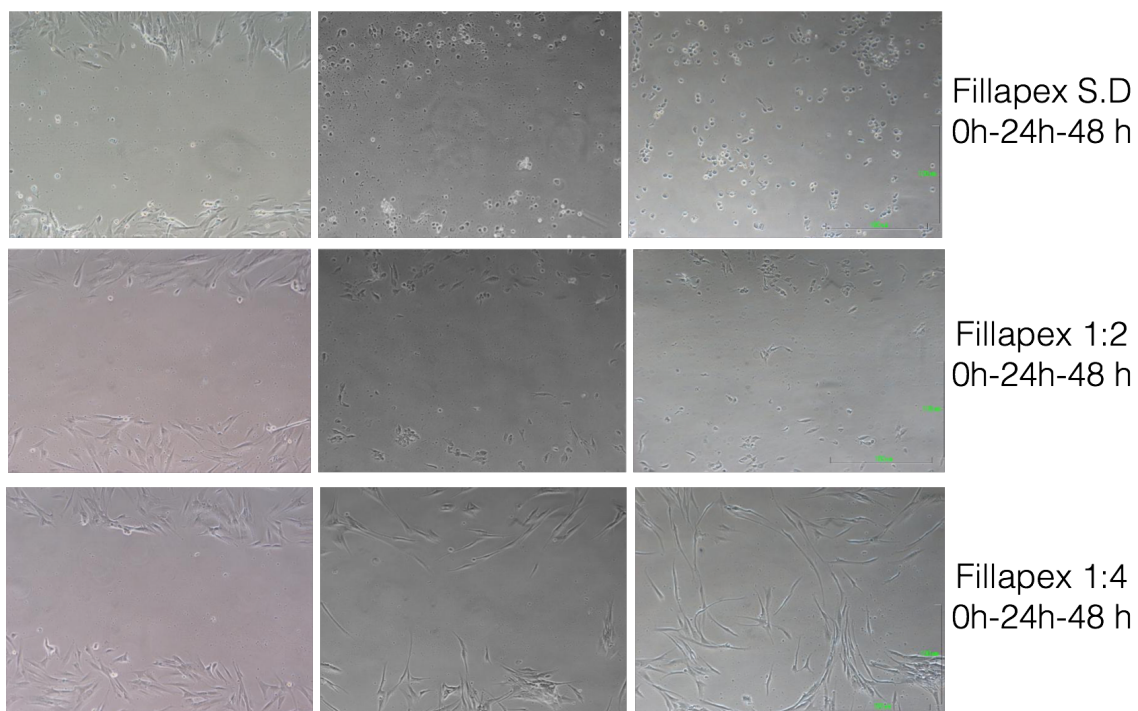


Figura 6. Imágenes del crecimiento celular en el grupo MTA Fillapex

En contraste, los datos obtenidos con los extractos de diluciones de TotalFill BC mostraron migración celular de células pulpares del ligamento periodontal en todas las diluciones. A las 48 h todos los grupos presentaron un cierre completo de la herida (figura 7).

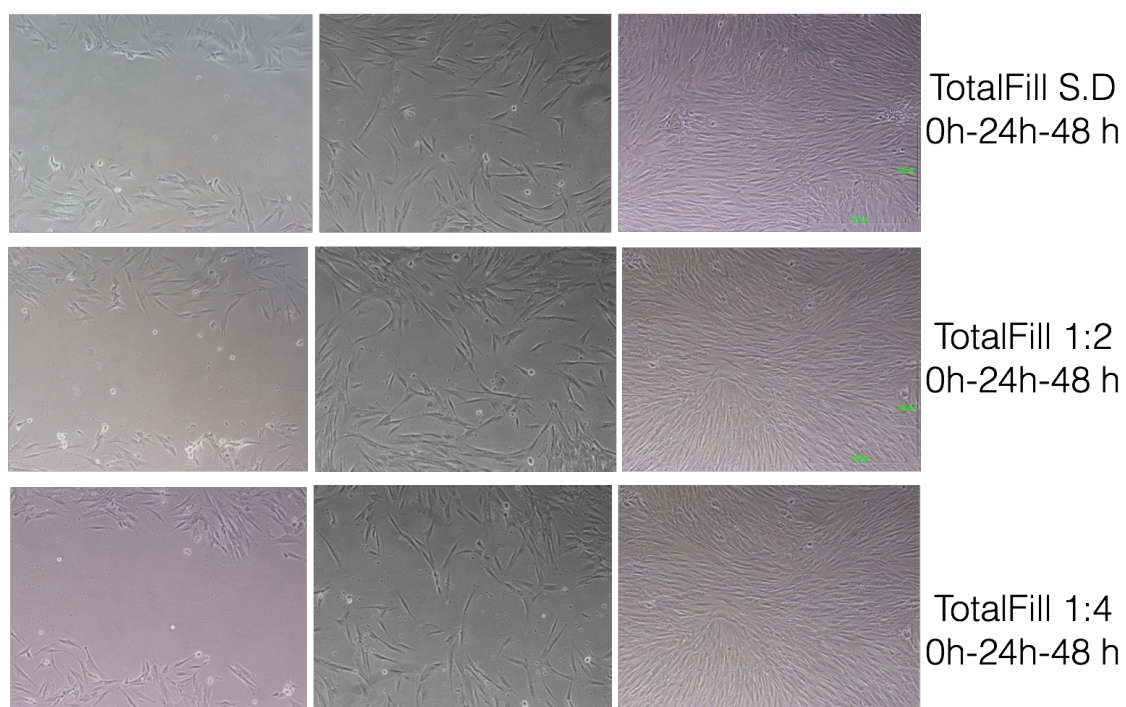


Figura 7. Imágenes del crecimiento celular en el grupo TotalFill

Con AH Plus, se aprecia que a medida que aumenta el tiempo y disminuye la concentración del cemento en el cultivo, aumenta el crecimiento celular, hallándose a las 48 horas con dilución 1:4 un cierre completo de la herida. (figura 8)

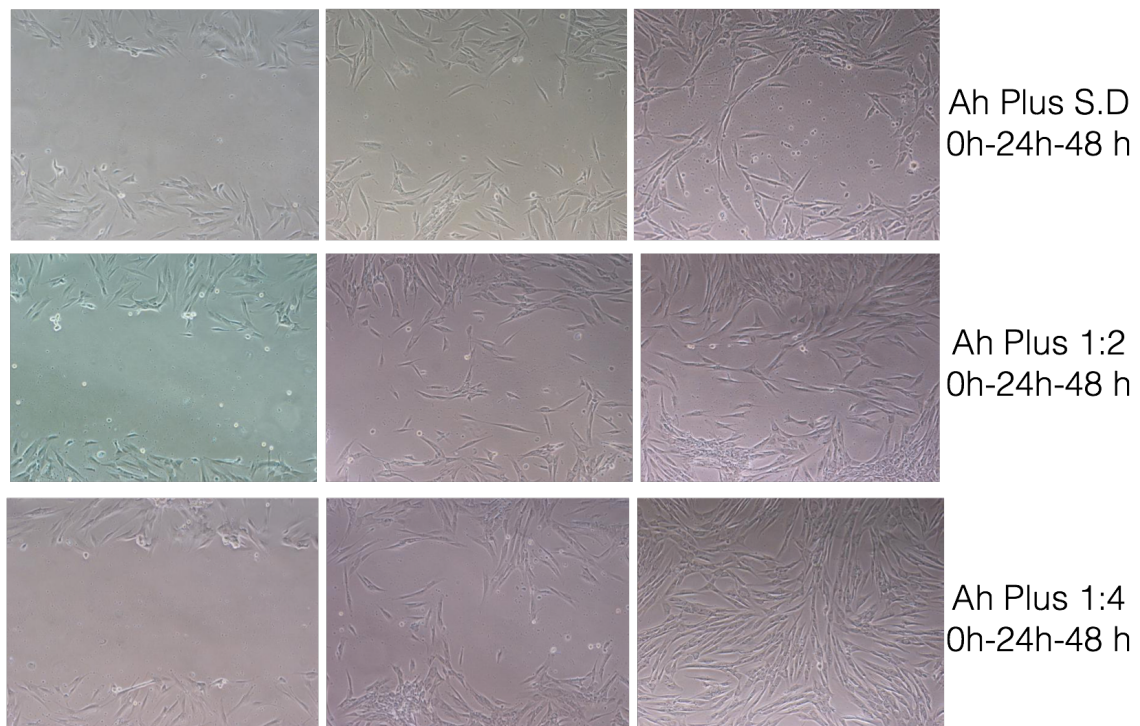
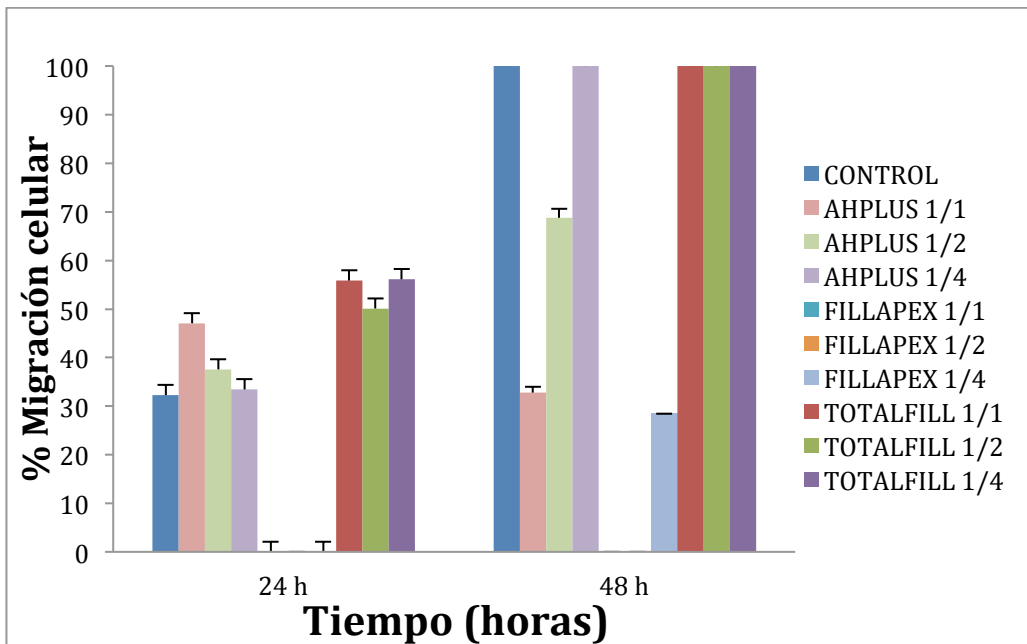


Figura 8. Imágenes del crecimiento celular en el grupo AH Plus

En la gráfica 8 se muestra el porcentaje de migración celular a las 24 y 48 horas en todos los grupos, se aprecia un 100% de migración celular a las 48 horas en el grupo control, todos los grupos con TotalFill y en el grupo AH Plus a dilución 1:4.,



Gráfica 8. Porcentaje de migración celular a las 24 y 48 horas

#### 1.2.4 Ensayo de Adhesión celular.

Se analizó como afectaban los diferentes extractos de los selladores a la habilidad de adhesión de las fibras de Colágeno tipo I. Se realizó la evaluación en 10 campos al azar para muestra y después, se calculó el número medio de células adheridas en cada condición experimental. En las fig 9-12 se puede observar las imágenes con las células que presentaron adhesión.

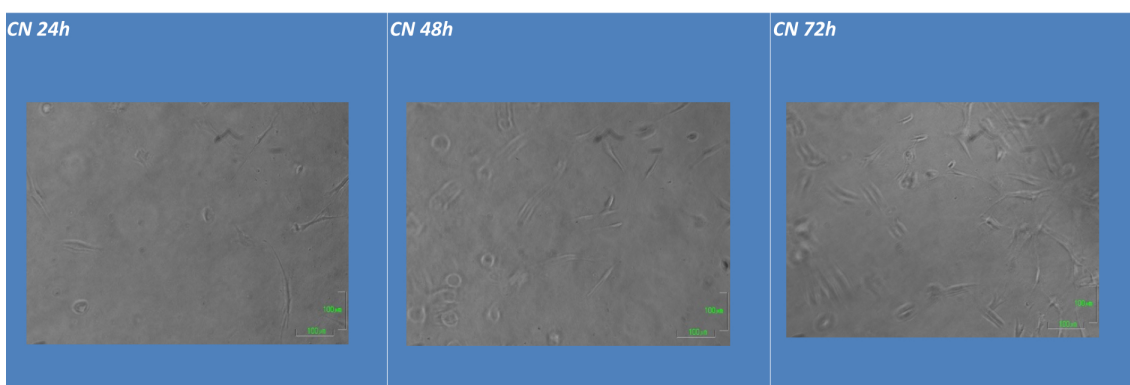


Figura 9. Adhesión de las fibras de Colágeno tipo I en el grupo control

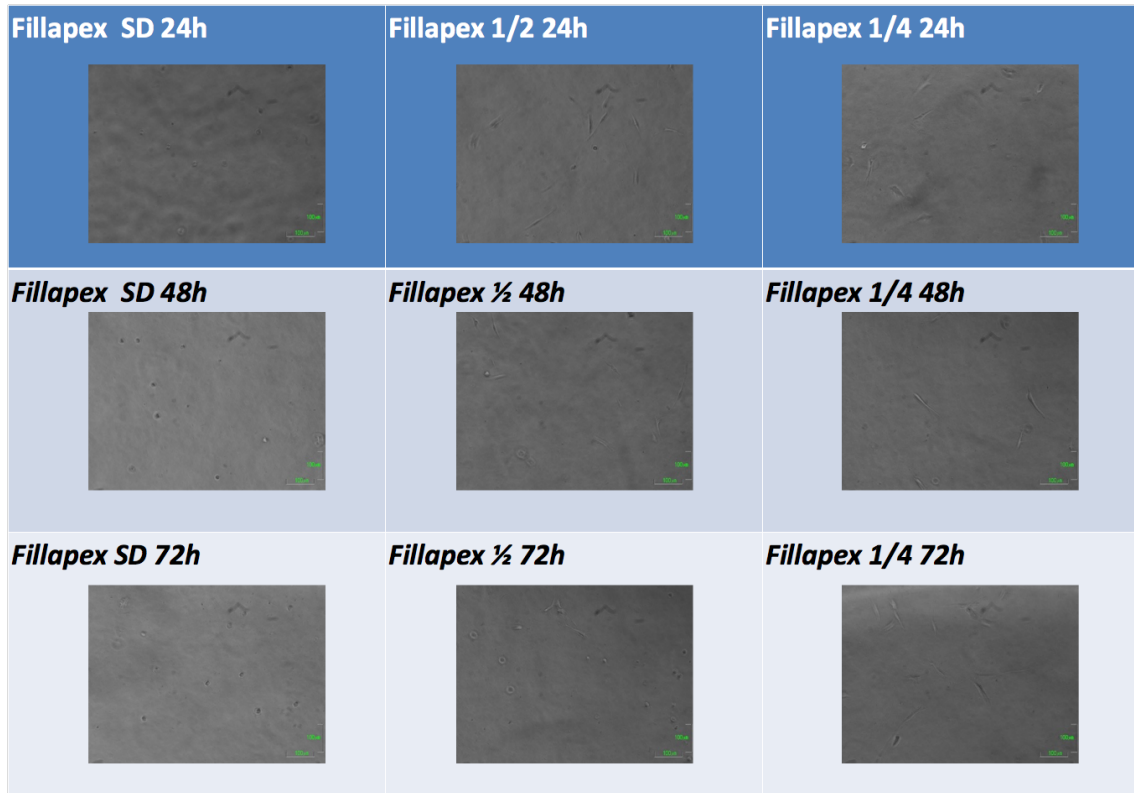


Figura 10. Adhesión de las fibras de Colágeno tipo I en el grupo Fillapex.

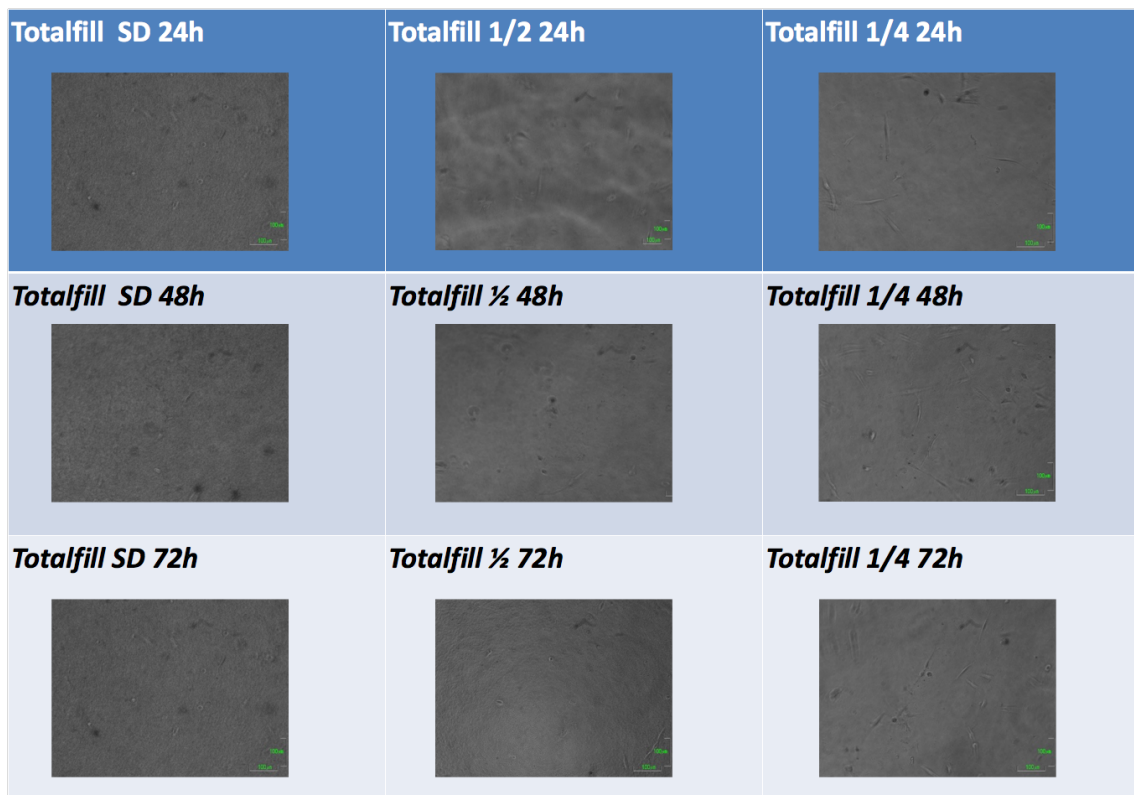


Figura 11. Adhesión de las fibras de Colágeno tipo I en el grupo TotalFill

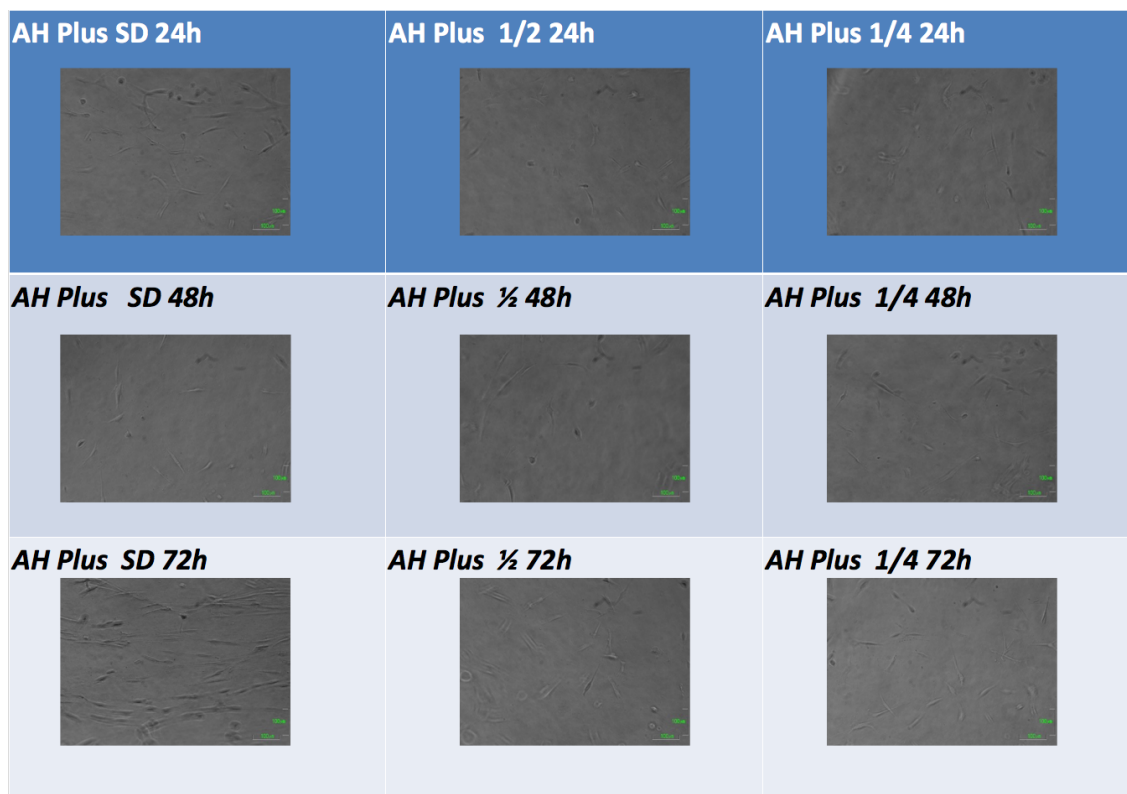


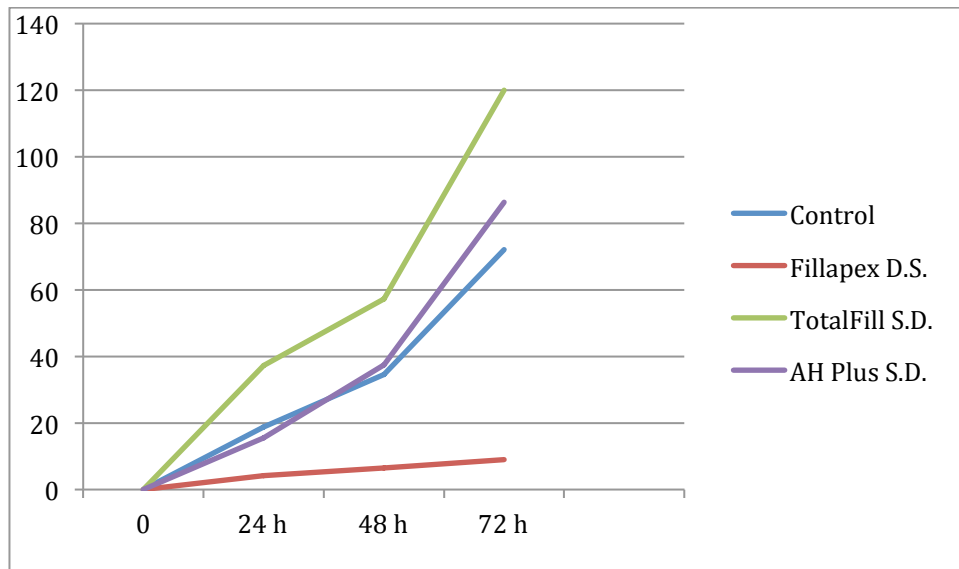
Figura 12. Adhesión de las fibras de Colágeno tipo I en el grupo AH Plus

La gráficas 9-11, muestra los datos relativos a adherencia al colágeno tipo 1 para todos los materiales evaluados en los diferentes tiempos y diluciones. En presencia de extractos de MTA Fillapex, la adhesión al sustrato de las células fue baja en todas las diluciones y en todos los tiempo, hallándose diferencias significativas respecto al grupo control para todos los tiempos y diluciones excepto para la dilución 1:4 a 24 y 72 h. También la adhesión fue significativamente inferior a la hallada para todos los grupos de AH Plus y del TotalFill, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

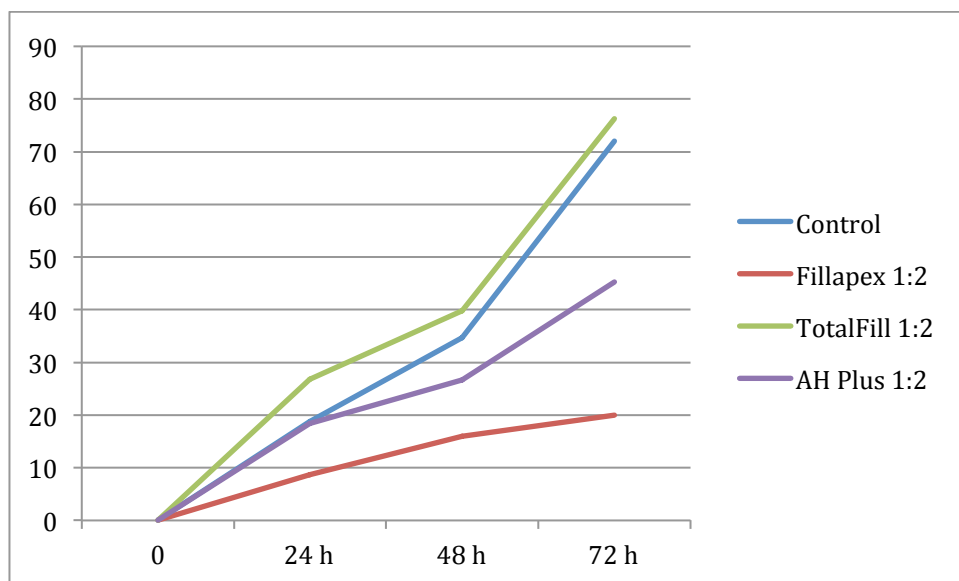
El grupo del AH Plus presentó un valor de adhesión muy similares al grupo control, siendo algo inferior en los grupos que se mantuvieron 72h, con diluciones de 1:2 y 1:4, sin que tuvieran significación estadística ( $p > 0,05$ ).

Al igual que en los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación, los niveles de adhesión en presencia de los extractos de TotalFill fueron similares a

los del grupo control, incluso significativamente mayores en algunos casos como en la concentración 1:1 a 24 y 72 ( $p < 0,001$ ).

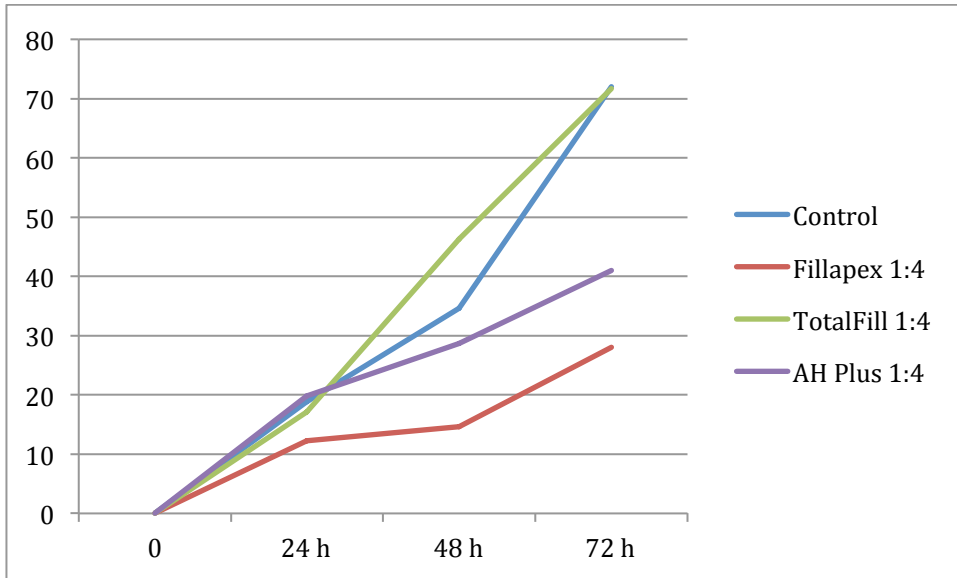


Gráfica 9. Número de células adheridas a fibras de colágeno tipo I por campo a los diferentes materiales sin diluir.



Gráfica 10. Número de células adheridas a fibras de colágeno tipo I por campo a los diferentes materiales en la dilución 1:2.

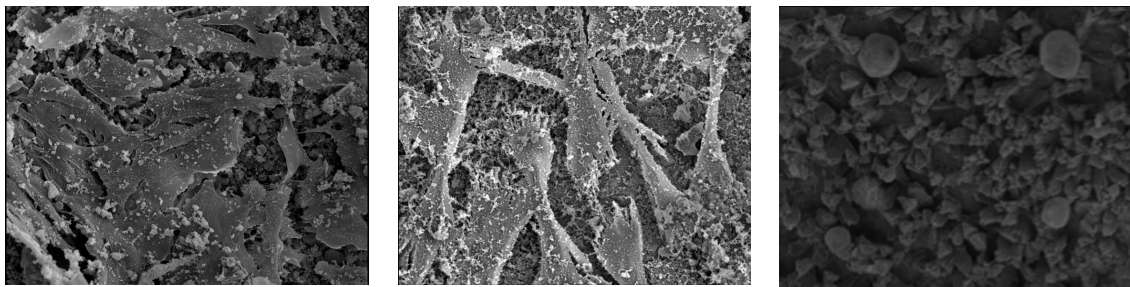




Gráfica 11. Número de células adheridas a fibras de colágeno tipo I por campo a los diferentes materiales en la dilución 1:4.

### 1.2.5 Estudio microscópico de la morfología celular.

Se observó la morfología y la adhesión de las hPDLSCs en la superficie de discos de los tres tipos de selladores tras 72 h de cultivo. La morfología de las células sembradas sobre AH Plus y Total Fill presentaban características similares, mostrando un alto nivel de propagación y producción de matriz extracelular. Sin embargo, los discos de MTA Fillapex presentaron una fijación celular muy limitada, apareciendo sólo unas pocas células redondas en la superficie del material, como se aprecia en la figura R13.



Celulas sembradas sobre AH Plus

Celulas sembradas sobre TotalFill

Celulas sembradas sobre Fillapex

Figura 13. Morfología de la adhesión de las hPDLSCs a las 72 horas de cultivo



## **2. DISCUSIÓN**



## 2.1 Sobre la metodología

Los ensayos *in vitro* constituyen métodos muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales, con una serie de ventajas: no requieren el uso de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y la relación costo/efectividad de los mismos. Los cultivos de células son modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad (Rodríguez-Lozano y cols., 2013), lo que es una ventaja importante para la evaluación de la toxicidad de rutina de los biomateriales, aunque no siempre las respuestas *in vitro* son indicadoras de reacciones *in vivo*, ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son solo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*.

Uno de los principales atractivos del uso del cultivo de tejidos es la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente controlado (10993-5., 2009). Es por este motivo por el que se ha diseñado el trabajo con células humanas procedentes del ligamento periodontal. Está descrito en la literatura que, además de obtener un sellado mecánico con los cementos selladores de endodoncia, es primordial obtener un sellado biológico donde la respuesta periápice-sellador garantice una reparación fisiológica de la zona (Silva y cols., 2014). Las células más implicadas en esta zona son las del ligamento periodontal, de ahí nuestra elección como línea celular (Rodríguez-Lozano y cols., 2012).

El aislamiento celular fue realizado mediante la técnica descrita por Seo y cols. (2004). Esta técnica que combina disgregación celular de forma mecánica y enzimática se consideró más conveniente que la técnica de explante o cultivo de tejido (Zhu y cols., 2014), donde, en el caso de ligamento periodontal, existe más riesgo de contaminación del cultivo primario. Del mismo modo, el recuento y la viabilidad se hizo mediante la cámara de Neubauer y el azul tripán, técnica universalmente conocida y, dada la heterogeneidad del cultivo primario, más sensible que usar el lector automático (*TC20<sup>TM</sup> Automatic Cell Counter* de BioRad) (Rodríguez-Lozano y cols., 2014).

Se realizó la identificación del tipo celular usado, tal y como recomienda la Sociedad Internacional de Terapia Celular, con el fin de conocer el tipo de población celular con el que estamos trabajando (Dominici y cols., 2006). Las células del ligamento periodontal son de origen mesenquimal y son consideradas como células madre con capacidad para diferenciarse en cementoblastos y osteoblastos en la zona del ápice radicular. La técnica usada para la identificación fue la citometría de flujo, que se usa de forma rutinaria para la identificación de marcadores que poseen diferentes líneas celulares (Rodríguez-Lozano y cols., 2015).

Los materiales analizados en este trabajo fueron dos biosilicatos: MTA Fillapex (Angelus Industria de Produtos Odontologicos S/A, Londrina, PR, Brazil), TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire, La-Chaux-de-Fonds, Switzerland) y un sellador de resina epóxica, como control, AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany). Solo hemos tenido en cuenta cementos selladores endodóncicos a base de biosilicatos y no cementos reparadores en base a biosilicatos tipo *putty*. Los cementos reparadores y los selladores presentan diferencias tanto en su composición, como en sus características e indicaciones para su uso en la práctica clínica. Para la realización de este estudio se escogieron estos selladores debido a que el AH Plus se puede considerar el sellador *gold standar* en las pruebas de los selladores en endodoncia (Özcan y cols., 2012); y los dos selladores en base a biosilicatos son productos que están presentes en el mercado desde hace no mucho tiempo y de los que no existían estudios de citotoxicidad con células madre del ligamento periodontal.

Hemos usado el método indirecto de elución mediante extractos, siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993 para tests de citotoxicidad *in vitro*. Este tipo de evaluación de biocompatibilidad es comúnmente usado en Endodoncia (Bin, 2012; Silva y cols., 2013), de hecho son pocos los estudios que se hacen por contacto directo. Para algunos autores el ensayo de contacto material/célula, también llamado test directo, es el tipo de

estudio que replica mejor las condiciones que se dan *in vivo* (Cao y cols, 2005). Sin embargo, no representa ninguna de las defensas con las que cuenta el organismo, por lo que puede resultar una versión aumentada de lo que ocurriría en la misma situación clínica. No obstante, con el fin de tener también una visión del test directo, hemos realizado una observación con microscopio de barrido, donde mediante la confección de discos procedentes del material de estudio, hemos podido evaluar la fijación de estas células. Este tipo de ensayo mixto (test indirecto + test directo) también ha sido utilizado para evaluar otros selladores endodóncicos (Zhou y cols., 2015).

La forma de cuantificar la proliferación celular en presencia de las diferentes diluciones de los materiales ha sido mediante MTT. Esta prueba es usada como prueba básica de citotoxicidad *in vitro*, ya que representa una prueba muy sensible, de bajo coste y aporta mucha información. Otro beneficio de esta técnica es se necesita poca cantidad de células para obtener un resultado óptimo. La literatura avala el uso del MTT en el campo de los selladores en Endodoncia, siendo una prueba esencial de citotoxicidad en casi todos los artículos encontrados (Al-Hiyasat y cols., 2010; Camps y cols., 2015; Lee y cols., 2013; Parirokh y cols., 2015; Silva y cols., 2015; Widbiller, 2015; Yoshino y cols., 2013).

La técnica para comprobar la apoptosis celular fue mediante inmunofluorescencia. Existen diversas técnicas para evaluar la apoptosis como puede ser la citada inmunofluorescencia, la citometría de flujo, el *western blot*, la electroforesis del ADN y la detección *in situ* mediante la técnica de TUNEL (Meehan y cols., 2015; Rodríguez-Lozano y cols., 2014). Hemos usado la inmunofluorescencia, por la menor cantidad de células necesaria para el experimento y porque es un método fácil de usar. En el campo dental, otros autores como Rodríguez-Lozano y cols. (2013) han usado esta misma técnica con esta misma línea celular con resultados excelentes.

La evaluación de la migración celular, fue realizada mediante la técnica de creación de una "herida" o "*wound healing*", donde se mide la capacidad para recolonizar la zona dañada por parte de nuestras células. Esta técnica está descrita como la técnica adecuada para analizar la migración celular (Weinreb y Nemcovsky, 2015). Con selladores endodóncicos, Zhu y cols. (2014) han usado esta misma técnica para evaluar la capacidad de migración celular. Consideramos esta prueba puesto que el cemento sellador a nivel del periápice debe facilitar la migración celular de las células próximas del ligamento periodontal, con el fin de obtener un sellado biológico.

La adhesión celular es un aspecto a tener en cuenta en la biocompatibilidad de los selladores endodóncicos. Una buena adhesión celular, permitirá al sellador ejercer un efecto sobre las mismas, que en el caso de las PDLSCs podría inducir la diferenciación hacia cementoblastos (Chang y cols., 2014). La técnica usada con colágeno I, es un método sencillo, reproducible y con un excelente coste/beneficio. Zhu y cols. (2014) han usado nuestra misma técnica para evaluar la capacidad de adhesión celular en presencia de diferentes diluciones de los biomateriales.

La morfología de las células es importante para conocer cuál es su estado, con la microscopia electrónica de barrido tenemos una constatación de si las células se encuentran bien fijadas al disco, ya que presentan una morfología alargada de tipo fibroblástica, mientras que una célula en estado de apoptosis y mal adherida presenta una morfología redondeada que termina muriendo y despegándose del biomaterial (Güven y cols., 2013; Widbiller y cols., 2015). Zhou y cols. (2015), también han observado este fenómeno con otros selladores endodóncicos.

## **2.2** Sobre los resultados.

Las técnicas de obturación con pastas y cementos como único material de sellado no son aconsejables en la Endodoncia moderna (Gutmann, 2002). Los componentes de estas pastas pueden filtrar hacia los tejidos perirradiculares, con riesgo de inflamación tisular crónica o de toxicidad celular. Debido a la porosidad



de los rellenos de las pastas y a su composición, la mayoría de estos materiales desaparecen, aunque sea parcialmente, con el transcurso del tiempo, lo que conduce a una filtración apical y elevan la probabilidad de un fracaso.

Los componentes de algunas de estas pastas se pueden detectar sistemáticamente en muestras de sangre y en varios órganos vitales. Algunos de estos son antigénicos y pueden causar respuestas inmunológicas. El control apical de estas pastas es muy complicado, sobre todo cuando no existe una correcta conformación apical o existe una perforación radicular (Spångberg 2002).

El AH Plus, cemento ampliamente utilizado en el campo de la Endodoncia, fue utilizado en nuestro estudio no solo para comparar los resultados de los cementos en base de biosilicatos, sino también para poder evaluar su citotoxicidad con células madre del ligamento periodontal.

Pudimos observar que su comportamiento en la proliferación células hasta las 72 h produjo un alto nivel de citotoxicidad en las células, comparativamente con el grupo control.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los obtenidos en otro en el que se comparó la citotoxicidad *in vitro* de AH Plus, N2, Endomethasone, Apexit, y del Ketac Endo en las primeras 24 h, justo tras la mezcla. Los especímenes fueron colocados en contacto con fibroblastos del ligamento periodontal 0, 1, 5 y 24 h, utilizando un ensayo de MTT. Los extractos de Endomethasone y de N2 inhibieron completamente el metabolismo de la célula. El AH Plus presentó una inhibición significativa de la actividad mitocondrial. (Schwarze y cols., 2002a).

El mismo grupo (Schwarze y cols., 2002b) evaluó citotoxicidad de los mismos selladores, en fibroblastos del ligamento periodontal, manteniendo los extractos en agua destilada durante un período de un año. Los mayores efectos citotóxicos fueron encontrados en extractos del sellador N2 y en el grupo de

Endomethasone de 10 semanas. El resto de materiales evaluados, no presentaron alteraciones significativas el metabolismo de las células.

Miletić y cols. (2005) evaluaron la citotoxicidad de AH Plus y RoekoSeal *in vitro* en el mismo tipo celular, en tiempos de de 1 h, 24 h y 48 h, 7 días y 1 mes , obteniendo que el AH Plus fue significativamente más citotóxico después de 1 hora, 24 h y 48 h, resultados que a las 48 h coinciden con los de nuestro.

Bouillaguet y cols. (2006) evaluaron la citotoxicidad de AH Plus, Epiphany, Resilón y Guttaflow utilizando el método MTT en cultivos de células y evaluando en términos de 24 y 72 h. Los resultados indicaron que la mayoría de los materiales poseen riesgos citotóxicos significativos y que la citotoxicidad se incrementa con el tiempo. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en nuestro estudio, el AH Plus, sobre todo sin diluir, aumenta su citotoxicidad con el tiempo hasta las 72 h.

Huang y cols. (2001) evaluaron la genotoxicidad inducida por selladores endodónticos a base de óxido de cinc y eugenol: Canals, Canals-N y Tubliseal; a base de hidróxido de calcio: Sealapex; y a base de resina epóxica: Topseal, AH26 y AH Plus. Utilizaron cultivos de células de carcinoma oral y electroforesis para su lectura. Se observó que el mayor nivel de daño en el DNA fue producido por los selladores de resina, seguidos por los selladores de óxido de cinc y eugenol.

En otro artículo, el mismo grupo de investigación (Huang y cols., 2002) evaluó la citotoxicidad inducida de siete selladores distintos, con tres bases de composición diferentes. Dos selladores de resina epóxicas: AH26 y AH Plus, tres selladores de óxido de cinc con eugenol: Canals, Endomethasone y N2, y un sellador de hidróxido de calcio: Sealapex. Estos fueron evaluados en células del ligamento periodontal humano por MTT. Los tiempos de cultivo fueron 1, 2, 3 y 7 días. Los componentes de los selladores compuestos resinosos, selladores compuestos a base de óxido de cinc y eugenol y el sellador a base de hidróxido de calcio fueron

citotóxicos para células primarias del ligamento periodontal. El sellador con hidróxido de calcio (Sealapex) fue el que presentó la menor citotoxicidad entre los selladores experimentados en ambos cultivos. La citotoxicidad fue en orden decreciente de: N2, Endomethasone, AH26, AH Plus, Canals y Sealapex.

Huang y cols. (2005) evaluaron la citotoxicidad de los selladores endodóncicos AH Plus y N2 a través de la expresión génica de IL-6 e IL-8. Concluyeron que ambos selladores pueden tener un papel importante en el desarrollo de la inflamación periapical.

Eldeniz y cols. (2007) compararon, en fibroblastos gingivales y en fibroblastos L929, la citotoxicidad de ocho selladores endodóncicos: RC Sealer, Epiphany, EndoRez, Guttaflow, Acroseal, AH Plus, RoekoSeal y Apexit. Observaron que los selladores de resina y los de hidróxido de calcio (Apexit y Acroseal) fueron significativamente más tóxicos que los otros selladores.

Camargo y cols. (2009) evaluaron el comportamiento citotóxico de distintas diluciones los selladores Acroseal, Epiphany y AH Plus con fibroblastos de pulpas humanas. Acroseal fue el que presentó la mayor toxicidad. Epiphany y AH Plus mostraron niveles semejantes de toxicidad entre sí pero menores que Acroseal. Concluyeron que todos los selladores se mostraron citotóxicos y, por lo tanto, pueden alterar las funciones específicas de los tejidos orales y causar inflamación.

Tai y cols. (2001) determinaron la citocompatibilidad de tres diferentes elusiones de selladores de conductos en 2 tipos diferentes de fibroblastos orales (derivados de la encía y de la mucosa bucal) primarios de humanos y una célula de linaje permanente de Hámster (V79 células), mediante el método de MTT. Los resultados mostraron que AH Plus, Canals y N2 fueron citotóxicos para los cultivos primarios de fibroblastos orales humanos y para las células V79. La citotoxicidad disminuyó, en este orden: N2>AH Plus>Canals.

En un estudio en el que se analizaron extractos diluidos y no diluidos, Correa y cols. (2009) evaluaron la citotoxicidad de AH Plus, Fill Canal (sellador de óxido de cinc y eugenol) y L&C (pasta comercial de hidróxido de calcio), sobre monocitos humanos. Los extractos no diluidos de AH Plus y Fill Canal presentaron una citotoxicidad superior al 90%. Los porcentajes de células muertas disminuyeron a medida que aumentaba la dilución. Diluciones menores a 1% causaron muerte celular mínima en comparación con el grupo de control. Los resultados mostraron que L&C fue menos citotóxico para las células monocíticas que AH Plus y Fill Canal. Con lo que confirma que la concentración de sellador en la dilución afecta la citotoxicidad del AH Plus.

Sin embargo existen otros estudios en los que el resultado de citocompatibilidad del AH Plus fue mayor. En un estudio in vitro con células L929 (fibroblastos de ratones) se evaluó el efecto citotóxico de tres selladores endodóncicos de resina: AH26, AH Plus y Topseal. AH26 fue severamente citotóxico; AH Plus y Topseal, mostraron una baja toxicidad (Koulaouzidou y cols., 1998).

Al-Hiyasat y cols. (2010) investigaron la citotoxicidad de cuatro selladores para conductos con base de resina: AH Plus, EndoREZ, Epiphany y Metaseal, un sellador de última generación que contiene 4-META metacrilato. La actividad citotóxica fue medida con fibroblastos Balb/C 3T3 durante 48 h utilizando el ensayo MTT. Todos los materiales fueron citotóxicos en diferentes grados, aunque el AH Plus presentó un nivel leve de citotoxicidad y, comparativamente, fue el menos citotóxico seguido por EndoRez, Epiphany y Metaseal, que fue el más citotóxico. La toxicidad del AH Plus está derivada de los componentes de resina epóxica liberados tras el fraguado. La toxicidad del AH Plus disminuye con el tiempo, pero en periodos de tiempo más largos.

Camps y About (2003), utilizando también el ensayo de MTT y la viabilidad de fibroblastos como protocolo de evaluación de citotoxicidad, compararon AH Plus, Cortisomol y Sealapex, éste demostró ser el sellador más citotóxico, independiente del tiempo de contacto con el cultivo de células. El AH Plus no fue considerado citotóxico con fibroblastos L929. Tanto en este estudio, como en el

anterior una de las posibles razones de la diferencia de resultado puede ser el tipo de células que utilizadas.

Karapınar-Kazandağ y cols. (2011) investigaron la citotoxicidad de AH Plus, RoekoSeal, EndoREZ, Epiphany y Activ GP en fibroblastos L929 de ratones y en células de pulpas de dientes primarios. Pusieron en contacto los materiales con medios de cultivo en distintas diluciones (100%, 50% y 25%) incubados durante distintos períodos (1, 4 y 7 días) y realizaron el análisis con el ensayo de colorimetría MTS. Observaron que la citotoxicidad de los selladores aumentaba con el tiempo de exposición a las células. En nuestro estudio el AH Plus tuvo la misma relación de aumento de citotoxicidad con el tiempo en todas las diluciones. La diferencia es que en este estudio observaron que el AH Plus tuvo valores de citotoxicidad mínima. Los selladores exhibieron diferentes grados de citotoxicidad dependiendo de concentración, dato que también coincide con los resultados de nuestro estudio en el caso del AH Plus.

Los dos cementos selladores de silicato cálcico que hemos evaluado en este trabajo pertenecen a la familia de los llamados biosilicatos, materiales que en por su composición presentan unas excelentes propiedades tanto físico-mecánicas como biológicas. Dentro de este grupo de materiales, está el MTA, del cual, desde su aparición en 1993 (Lee y cols. 1993), se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra su biocompatibilidad. En estos momentos es un material ampliamente usado clínicamente.

Uno de estos primeros estudios comparó la actividad citotóxica del MTA. Se estudiaron cuatro cementos de retroobtención apical, obteniendo, que tras la incubación de 24 h de fibroblastos de ratón, el MTA fue menos tóxico que la amalgama, el IRM y el SuperEva (Torabinejad y cols., 1995).

Estos nuevos cementos selladores de conductos presentan una composición similar a los cementos reparadores a base de biosilicatos, con lo que es posible la

comparación de los resultados citotóxicos que han obtenido en los diferentes artículos publicados en la literatura científica.

Ma y cols. (2011) compararon la respuesta citotóxica del Endosequence Root Repair Material Putty (ERRM Putty), Pasta (ERRM Pasta) comparado con el Proroot MTA, sobre fibroblastos humanos gingivales, incubados a 1, 3 y 7 días con extractos de varias concentraciones de los materiales, antes y tras 7 días de fraguado. También se realizó un ensayo de adhesión, en el que se utilizaron las muestras de los materiales fraguados durante 7 días. Con el material en fresco, a las 24 h ningún material, a ninguna concentración, obtuvo los valores de viabilidad celular del grupo control. En nuestro estudio no valoramos el material antes de su fraguado completo, pudiendo ser la liberación de hidróxido de calcio durante el fraguado el causante de la disminución de la viabilidad celular. Hasta las 72 h todos los grupos de material sin fraguar tuvieron los valores del grupo control. A los 7 días la viabilidad celular fue nuevamente inferior al control. En el material fraguado durante 7 días, todas las muestras fueron similares al grupo control a las 24 h. A las 72h todos los grupos mostraron valores superiores al grupo control. Estos tiempos son coincidentes con nuestro estudio, donde el TotalFill aumento hasta el tercer día, siempre obteniendo valores superiores al grupo control. El TotalFill y los ERRM, son productos de la misma casa comercial con composiciones similares, los cementos de reparación tienen óxido de tantalio como único material diferencial. Desde el punto de vista clínico la diferencia fundamental es su estado, mientras que los cementos reparadores son pastas, de diferente densidad, el cemento sellador se presenta como un líquido viscoso. A los 7 días de cultivo todos los grupos mostraron unos valores de viabilidad significativamente inferiores al grupo control. En nuestro estudio no disponemos datos a 7 días debido al diseño del mismo. En el ensayo de adhesión, tras 2 días existió una expansión y adhesión de los fibroblastos gingivales sobre la superficie de las muestras. Después de 7 días de incubación, había un mayor número de células unidas que en contacto entre sí por sus procesos y forman una capa de matriz en la superficie de ERRM Putty, ERRM Paste y el MTA. En nuestros datos, los valores de adhesión que

presentaron las células en los grupos del TotalFill fueron superiores al grupo control. Y en este casi sí se apreció un ligero aumento en la diferencias con el control con una mayor concentración.

Bryan y cols. (2010) evaluaron la citotoxicidad y el potencial osteogénico de un cemento experimental basado en silicato cálcico, AH Plus y un cemento de óxido de cinc con eugenol, en células preodontoblasticas de ratón. El primer valor se tomo a las 72 h, que se consideró semana 0, luego se realizaron mediciones durante 5 semanas. Se evaluaron diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. A las 72 h la citotoxicidad del cemento en experimental y el grupo del AH Plus fue severa, disminuyendo progresivamente. En los resultados de la primera y segunda semana el cemento de silicato cálcico presentó una citotoxicidad leve, y tras ese tiempo de evaluación hasta la quinta semana no presentó citotoxicidad. El dato inicial no coincide con nuestro estudio, en el que los resultados de viabilidad celular en las primeras horas fueron superiores al grupo control y se mantuvieron hasta las 72 h tiempo más largo de evaluación en nuestro estudio. El AH Plus a las 72 h también presentó una citotoxicidad severa, que disminuyó con el tiempo. EL AH Plus a 72 h obtuvo resultados similares en nuestro estudio, en el que obtuvo un valor, que según los parámetros de este estudio se consideraría de citotoxicidad (<30% del grupo control). AH Plus en la primera semana presentó unos valores de citotoxicidad moderada, a partir de ahí iguala los valores del cemento experimental. A pesar de no disponer de datos a más tiempo en nuestros estudio no se ve la línea de progresión de disminución de la citotoxicidad, sino se puede observar lo contrario en el corto plazo de tiempo evaluado.

Ambos materiales a partir de la tercera semana fueron considerados no tóxicos. La actividad de la fosfatasa alcalina, marcador de la formación ósea, en el grupo del AH Plus fue similar a la del grupo control y superior al grupo del cemento experimental.

En la evaluación de las diluciones se obtuvo una relación de toxicidad dependiente de la concentración en las muestras.

AH Plus ha necesita más de 2 semanas para no ser citotóxico. Hasta la existencia de los selladores de silicato cálcico la citotoxicidad de los selladores presentaban una acción citotóxica dependiente de la concentración. Los mejores resultados los presentaban las mayores diluciones. Esta norma no se cumple en el TotalFill.

Wu y cols. (2015) analizaron la adhesión por densidad óptica y la actividad mitocondrial a las 12, 24 and 48 h del MTA en odontoblastos humanos.

Se observó una actividad metabólica similar en las muestras de MTA y el grupo control. No existieron diferencias entre los resultados de las muestras sin fraguar y las fraguadas. La adhesión celular con el MTA fue ligeramente superior al grupo control. Existió un aumento de los valores de densidad óptica con el paso del tiempo de incubación, tanto en los cementos frescos como en los fraguados. Estos datos concuerdan por los obtenidos por los grupos de TotalFill, que presentó unos valores de adhesión superiores la grupo control. Sin embargo, el otro sellador, Fillapex (biosilicato), presentó unos valores de adhesión muy bajos.

De-Deus y cols. (2012) estudiaron la respuesta citotóxica de dos cementos reparadores en base de silicato cálcico iRoot BP Plus, MTA de Angelus y un sellador de óxido de cinc con eugenol, usados para el sellado de ápices abiertos con células osteoblásticas. Los dientes se obturaron y se colocaron directamente en el medio de cultivo siendo evaluados a las 24 y 48 h.

El MTA presentó a las 24 h unos resultados muy similares a los del grupo control. Estos datos se mantuvieron a las 48h. El iRoot BP Plus mostró un mayor crecimiento celular que el grupo control, pero sin diferencias significativas. Mientras que a las 48 h se observó una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto a los otros dos grupos, llegando a observarse un 30% menos que el grupo control. El iRoot BP es un cemento con una base similar al TotalFill BC Sealer, pero en su versión cemento reparador. En nuestro estudio a las 24 h los datos también son superiores al grupo control, aunque sí que presentan diferencias significativas con el grupo control. A las 48 h, a diferencia



de la reducción de la viabilidad celular obtenida en ese estudio, los valores obtenidos por el TotalFill son similares a los del grupo control. Las diferencias en las líneas celulares puede ser una de las diferencias con nuestros resultados. Otro dato a tener en cuenta es que el material fue puesto en contacto justo tras la obturación, sin que el material estuviera fraguado. La morfología general y la distribución de las células después de la exposición a los extractos materiales no presentaron alteraciones después del tratamiento con BP iRoot Plus o extractos ProRoot MTA.

Otro de los cementos reparadores de silicato cálcico, con múltiples usos en Odontología, es Biodentine (Septodont, Saint Maur Des Fosses, Francia). Zanini y cols. (2012) utilizaron células pulpares de roedores para valorar su citotoxicidad en diluciones de varias concentraciones, para determinar el efecto de la dosis en la viabilidad celular. Tras 4 días de cultivo celular se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de colorimetría (MTS) a 2, 3 y 5 días. El MTS presentó primero un efecto inhibitorio durante dos días, sin que los valores alcanzaran el 80% del grupo control. Esta disminución inicial no se observa en nuestros resultados. Puede ser causada por la liberación de hidróxido de calcio por el cemento que induce un incremento en el pH. Tras esto, al tercer día presentó una estimulación en los parámetros de evaluación del crecimiento celular, con valores mínimamente superiores al grupo control. Al quinto día presentó mejores resultados, con diferencias significativas, con respecto al grupo control.

En otro estudio, además del Biodentine se evaluó la citotoxicidad de varios cementos reparadores en base a biosilicatos, el Calcium Enriched Mixture (CEM cement, BioniqueDent, Tehran, Iran) and Tech Biosealer Endo (Isasan SRL, Revello Porro, Italia). Se compararon con el ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, EEUU) manteniendo estos tras la mezcla a 37° con 95% humedad y 5% CO<sub>2</sub>, 24h, 7 y 28 días. Tras estos tiempos se realizó con la incubación de 24h y 48h de monocitos humanos.

No existió diferencia entre los materiales en la viabilidad células a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h, los monocitos cultivados en presencia de ProRoot MTA y

Biodentine presentaron un porcentaje significativamente mayor de viabilidad que los grupos de Tech Biosealer y CEM cement.

En ambos tiempos de cultivo (24 h y 48 h) aumentó la viabilidad de los monocitos según el tiempo que haya estado el material mantenido desde la mezcla hasta su contacto con las células. A los 28 días los grupos tuvieron los mejores resultados. Todos los materiales biocerámicos mostraron niveles de biocompatibilidad aceptables. En los resultados de nuestro estudio los niveles de citotoxicidad obtenidos por el MTA Fillapex fueron significativamente altos. Esto hace que no cumpla la característica de biocompatibilidad de los otros cementos a base a silicato cálcico (Khedmat y cols, 2014).

Willershausen y cols. (2013) evaluaron la influencia de cuatro cementos reparadores, MTA Angelus, White MTA Angelus, ProRoot MTA y EndoSequence Root Repair Material, en dos líneas celulares diferentes, fibroblastos del ligamento periodontal y osteoblastos humanos. Tras el fraguado se incubaron durante 6 h, 24 h, 72 h y 96 h. Se calculó el porcentaje de células viables considerando el grupo control como el 100% de la viabilidad celular.

En los grupos de los cementos la proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal fue menor a la del grupo control. Todos los grupos obtuvieron valores similares. A las 96 horas todos los grupos presentaron una baja citotoxicidad.

En cambio, en cuanto a la proliferación de los osteoblastos, el EndoSequence Root Repair Material obtuvo unos resultados muy similares al grupo control, siendo estos superiores a los otros grupos. Los niveles de proliferación celular de los grupos de estudio fue muy similar cuantitativamente en las dos líneas celulares. El nivel de crecimiento en el grupo control fue mayor en el grupo de los fibroblastos del ligamento periodontal comparado con el grupo control de los osteoblastos. Esto puede conllevar diferencia si los resultados de citotoxicidad los analizamos porcentualmente, dando el cien por cien al grupo control.

Ciasca y cols. (2012) utilizaron odontoblastos humanos para comparar los cementos reparadores EndoSequence Root Repair Material, ERRM fluido y ProRoot MTA, y se usó AH Plus como control positivo.

En la primera fase, en la que se evaluó el contacto directo de las células tras 48 h, el MTA, y ambas presentaciones de ERRM no afectaron el crecimiento ni a la morfología celular. EL AH Plus, causó el desprendimiento de las células, derivando en una masiva muerte celular. La presencia de AH Plus produjo una zona clara rodeando el material en donde no se pudieron observar células. En este estudio no se describe si se permitió el fraguado completo de estos.

En una segunda fase se estudió la expresión de citoquinas por PCR. El orden de la presencia de citoquinas menor a las 24 h fue: MTA, ERRM y ERRM fluido, sin que existieran diferencias significativas. A las 48h se redujo la expresión de citoquinas en todas las muestras. Esto nos permite concluir que estos cementos pierden citotoxicidad con el tiempo. Los resultados también indican que el Endo Sequence Root Repair Material presenta una biocompatibilidad similar al MTA.

Zhu y cols. (2014) realizaron un estudio en el que se evaluó la adhesión, migración y fijación de células madre pulpares con biosilicatos, BioAggregate (Innovative Bioceramics, Vancouver, BC, Canada) y el ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK)

Para la valoración de la viabilidad celular se utilizaron eluciones en varias concentraciones (sin diluir, 1:2, 1:4), con medidas a 24 h, 48 h y 72 h. Se midió la densidad óptica de las células por ensayo de inmunoabsorción..

El BioAggregate presentó mejores resultados que el grupo control y que el MTA. Los resultados presentados por el TotalFill BC Sealer son similares a los presentados por el BioAggregate. En cambio el MTA Fillapex presenta unos resultados muy inferiores tanto a el grupo control como los otros selladores.

El ensayo de adhesión celular se realizó utilizando colágeno de tipo I y una medición a 24hs. Todos los grupos tuvieron valores muy similares al grupo control. El BioAggregate sin diluir fue el único valor mayores con respecto al grupo control, los grupos tuvieron valores muy similares. Este dato coincide con los resultados del TotalFill en la misma concentración y tiempo. A las 24 hs el

MTA Fillapex presentó unos resultados significativamente inferiores a los del grupo control.

Coincidiendo con nuestra metodología, la evaluación de la migración celular se realizó mediante un ensayo de "curación de herida" a las 24 h. En nuestro estudio se realizaron mediciones a las 24 y a las 48 h. Zhu y cols. (2014) encontraron que los selladores estudiados promueven la migración HDPC de una manera dependiente de la concentración, resultado que coincide con nuestros resultados en el caso del TotalFill. En caso del MTA Fillapex no existió migración. Para este estudio las células utilizadas fueron células madre pulpares, debido a que los cementos reparadores, que entre sus indicaciones presentan su uso como recubrimiento pulpar directo; podrían tener que estar en contacto con el tejido pulpar expuesto y con las células madre que puedan existir en él. En nuestro estudio utilizamos células madre del ligamento periodontal, debido a que son las células que pueden verse afectadas con el contacto con los selladores radiculares.

La fijación celular y la morfología de las células fijadas se observó con microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observaron un elevado número de células de morfología alargadas sobre los discos de BioAggregate y MTA. También se observaron numerosas extensiones citoplasmáticas delgadas que se proyectaban desde la célula a la superficie circundante o células adyacentes.

En nuestro estudio, el número de células fijadas sobre el Fillapex fue muy reducido, mientras que las fijadas en los discos de TotalFill presentaban una morfología fibroblástica, bien adheridas y en elevado número.

La adhesión celular y la migración están estrechamente coordinados y procesos críticos para la reparación de tejidos en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas.

Mukhtar-Fayyad (2011) realizó un estudio donde evaluó la citotoxicidad del BioAggregate y iRoot mediante MTT, usando 5 diluciones (sin diluir, 1:2, 1:10, 1:50, y 1:100) que se expusieron las células 24, 72h y 7 días.

Los resultados obtenidos por las muestras a altas concentraciones (sin diluir, y la 1:2 y 1:10) fueron significativamente más bajas que el grupo control. Con las concentraciones de 1:50 y 1:100 los resultados fueron muy cercanos al grupo

control. El iRoot obtuvo valores indicativos de ligera toxicidad, mientras que el BioAggregate se pudo considerar moderadamente citotóxico.

Este estudio coincide en dos de los tiempo (24 y 72 h) y 2 concentraciones (sin diluir y 1:2) con nuestro estudio.

En los resultados obtenidos en nuestro estudio de los valores de viabilidad celular, para todas las concentraciones y tiempos coincidentes, los datos del TotalFill fueron muy superiores a los descritos para el iRoot y para al BioAggregate, siendo superiores también al grupo control. Una de las posible explicaciones de esta variación en los resultados es que el tiempo de fraguado del estudio fue el que recomienda el fabricante, que según algunos estudios es demasiado corto para el fraguado completo del material (Loushine y cols., 2011). En este estudio no se especifican las condiciones de humedad mantenidas durante el fraguado. El fraguado de los selladores en base a silicatos necesita humedad, con lo que una posible ausencia de humedad puede tener influencia en los resultados. Con lo que podemos estar analizando datos de un material sin un fraguado completo.

Los valores que obtiene Mukhtar-Fayyadson en su estudio son porcentuales con respecto a el grupo control. Otra de las posibles razones de la diferencia de resultados puede ser que, al analizar diferencias porcentuales con el grupo control, no se analizan datos cuantitativos del crecimiento celular, con lo que no podemos realizar una comparación cuantitativa del las células con nuestro estudio. El valor porcentual, además, dependerá del tipo y potencial de crecimiento de las células utilizadas.

En este estudio el efecto citotóxico fue dependiente de la concentración del extracto en la elusión, sin que el tiempo fuera un parámetro influyente. En nuestro estudio el TotalFill tuvo una mayor proliferación porcentual comparativa con el grupo control a las 24 h en todas las concentraciones. Y a partir de ese momento, las diferencias a favor del grupo del TotalFill con respecto al grupo control disminuyen.

El MTA Fillapex presentó valores mucho más bajos que los obtenidos por los dos selladores analizados en el estudio en los tiempo y diluciones coincidentes. En nuestro estudio el sellador que presenta una reducción importante de la

viabilidad celular, según el avance de las medidas de tiempo con respecto al grupo control, es el AH Plus. También existe una relación importante con la concentración.

Zhang y cols. (2010) evaluaron la citotoxicidad del iRoot SP, comparándolo con otro sellador de resina epóxica, el AH Plus y con un cemento reparador, el MTA, en fibroblastos de ratón. Se utilizó un ensayo de difusión de filtro y un ensayo de MTT. En el primero se realizó la evaluación del material justo tras la mezcla y tras permitir el fraguado durante 24 h, mientras que para el segundo solo se evaluaron las muestras fraguadas. El iRoot se consideró ligeramente citotóxico. En nuestro estudio no se valoró el material antes de su fraguado. Tras el fraguado, al igual que en nuestro estudio, el sellador se pudo considerar no citotóxico. La citotoxicidad inicial del iRoot se puede deber a que la superficie tiene un pH alcalino debido a que durante su fraguado se produce hidróxido de calcio (Zhang, 2009).

El AH plus presento valores moderada y ligeramente citotóxicos, antes y después del fraguado, respectivamente, presentando diferencias significativas con el grupo control y el grupo del iRoot. En este estudio presenta unos valores de citotoxicidad similares. Esto podría deberse al contacto con pequeñas cantidades de formaldehído o por la liberación de amina y componentes de la resina epóxica del sellador (Azar, 2000).

Zhou y cols. (2015) evaluaron los mismos selladores que utilizamos en nuestro estudio en fibroblastos humanos. Se realizó la evaluación tras la mezcla y tras el fraguado del material (triple del tiempo que recomienda el fabricante). El medio de cultivo de puso en contacto durante 24 h, considerado tiempo 0, y se obtuvieron resultados cada siete días, hasta las 4 semanas. Las Diluciones utilizadas fueron 1:2, 1:8, 1:32 y 1:128.

En el estudio de citotoxicidad Fillapex sin fraguar no permitió viabilidad celular en la concentración mas alta (1:2) y el resto de diluciones no presentaron diferencias con el grupo control. Con el material fraguado, no permitió la viabilidad celular en la concentración 1:2, dato que coincide con nuestros

resultados. En las dos elusiones de menor concentración no presentó diferencias con el grupo control, presentando una relación de toxicidad dependiente de la concentración.

AH Plus presentó una alta citotoxicidad sin fraguar en altas concentraciones y similar al control en baja concentración. Con material fraguado solo mostró citotoxicidad en la concentración más alta (1:2), el resto de los grupos fueron similares al grupo control. Estos datos no coinciden con los obtenidos en nuestros resultados. Los resultados fueron, dependientes tanto del tiempo como de la dosis. Estos datos no coinciden con los obtenidos en nuestros resultados, ya que no dependieron de la concentración de la misma manera.

El BC Sealer presentó unos resultados iguales a los del grupo control, en todas las concentraciones y tiempos, fraguado como sin fraguar. Resultado que coincide con el obtenido en nuestro estudio, lo que indica su citocompatibilidad.

La adhesión se evaluó a 24 y 72 h, y a los 7 días. Los dos primeros tiempos coinciden con nuestro estudio. Existió una adhesión y propagación de células sembradas en AH Plus y BC Sealer a lo largo de la superficie del material, ambas con típica morfología de fibroblastos, tras una noche. El número de células adheridas se incrementó con el tiempo. Tras siete días, las superficies de ambos grupos estaba totalmente recubierta de células, con una mayor densidad de fibroblastos en el AH Plus. En nuestro estudio comparamos la adhesión celular con el grupo control, obteniendo mejores resultados con el TotaFill BC Sealer, pero sin diferencias con el AH Plus; el crecimiento celular también aumentó con el tiempo en ambos grupos. Para MTA Fillapex las células no presentaban la morfología típica, eran redondas y débilmente unidas a la superficie del material en todos los tiempo observados. No se apreció proliferación celular, como en nuestro estudio.

Chang y cols. (2014) compararon la citotoxicidad, la respuesta inflamatoria, el efecto osteogénico y el mecanismo de señalización de estas actividades biológicas, de cuatro selladores radiculares Sealapex, Apatite Root Seales (RS; Dentsply Sankin, Tokyo, Japan), MTA Fillapex y iRoot SP.

Tras la obtención de resultados de viabilidad celular a 3, 7 y 14 días, ninguno de los selladores probados tuvo un efecto citotóxico sobre células del ligamento periodontal, según lo determinado por el ensayo MTT. Los datos en relación al BC Sealer son similares a nuestros resultados. Los datos obtenidos en el caso del Fillapex a las 72h, no coinciden, siendo muy inferiores en nuestro estudio. La discrepancia en los resultados puede deberse probablemente a las diferencias tipos de células, condiciones y medios experimentales.

A través de la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina, se encontró que el MTA Fillapex, ARS, y iRoot SP promueven la diferenciación osteoblástica de PDLCs en un mayor grado que Sealapex. Evaluando los mediadores de la inflamación, se observó que Sealapex presentaba valores de expresión mayores que el resto de selladores. Ninguno produjo una respuesta inflamatoria severa.

Guven y cols. (2013) realizaron un estudio en el que compararon la citotoxicidad a través de MTT y un ensayo de adhesión celular, de los cementos selladores iRoot, MTA Fillapex y AH Plus con células madre germinales de dientes humanos. Los periodos de evaluación del material ya fraguado fueron de 24 y 72 h, y 7 y 14 días. Los dos primeros tiempos son coincidentes con los de nuestro estudio, sin embargo en este estudio se prolonga la obtención de resultados, los cuales indicaron que el MTA Fillapex tuvo una citotoxicidad significativamente mayor que el grupo control. El iRoot obtuvo resultados similares al grupo control. El AH Plus mostró niveles similares al grupo control y al iRoot en la primera (24 h) y última (14 días) medición, obteniendo valores significativamente más bajos a las 72 h y a los 7 días. En nuestro estudio el Totalfill también tuvo resultados más bajos de citotoxicidad que el grupo control. Este aumento en la viabilidad celular a mayor tiempo no lo podemos evaluar por la ausencia de datos en nuestro estudio.

Los mayores niveles de adhesión en todos los tiempos los obtuvo el iRoot, siendo similares a los del grupo control. En nuestro estudio los mayores resultados también fueron obtenidos por el grupo del TotalFill BC Sealer, con valores superiores a los del grupo control. Igual que en nuestro estudio, tras el



valor a las 24 horas, MTA Fillapex produjo un elevado efecto citotóxico, reduciendo el número de células adheridas a la superficie.

En el grupo del AH Plus, durante el primer día, existió una baja adherencia de células que aumentó con el paso del tiempo. En nuestros datos la adherencia también van disminuyendo, tanto en el grupo control como en el TotalFill con el aumento del tiempo.

Zoufan y cols. (2011), evaluaron cuatro selladores EndoSequence BC sealers , AH Plus, GuttaFlo y Tubli-Seal, tras la mezcla y fraguados (3 días), utilizando fibroblastos de ratón. Se utilizaron tres concentraciones. Se cultivaron las células 24 y 72 horas con cada elusión.

El AH Plus en fresco, fue el que mostró una mayor citotoxicidad. Con los selladores fraguados, el AH plus fue más citotóxico a las 24 h con una sola disolución, mientras que a las 72 h fue con las dos.

La alta toxicidad del AH Plus tras su mezcla se podría deber a la liberación inicial de formaldehído y por el componente de resina epóxicas.

En los grupos del BC Sealer, los porcentajes de viabilidad celular estuvieron entre el 90 y el 100% en todas las eluciones. Estos datos, aunque confieren unos valores de no citotoxicidad, son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. Los valores siempre fueron superiores a los del grupo control.

En las pruebas realizadas con los selladores fraguados la diferencia en la concentración de células influye en los resultados.

Cuando BC Sealer fue dejado en la mesa de trabajo a temperatura ambiente no fraguó, incluso después de 2 meses. Cuando el BC se colocó en una incubadora de células durante 24 h liberó un líquido de color claro, pudiendo ser agua resultante de la reacción de fraguado.

Loushine y cols. (2011) realizaron un estudio de citotoxicidad *in vitro* con osteoblastos de ratón, comparando la respuesta de tres selladores (BC Sealer, AH Plus y Pulp Canal Sealer EW). La evaluación se hizo a las 24 h tras la mezcla del sellado y durante 5 semanas, realizando una valoración porcentual con respecto al grupo control. Todas las muestras presentaron una severa

citotoxicidad a las 24 h. El AH Plus disminuyó la citotoxicidad de manera gradual durante las 6 semanas, pudiendo considerarse no citotóxico a partir de la tercera semana. Sin embargo, el Endosequence BC Sealer mantuvo la citotoxicidad hasta la quinta semana, llegando solo a partir de la sexta semana a considerarse moderadamente tóxico. Este estudio reporta valores con una gran diferencia a los obtenidos en nuestro estudio, siendo los más bajos de la literatura evaluada.

El exceso de humedad en los conductos también puede alterar el fraguado.

La diferencia en los resultados puede estar relacionada con la diferente línea celular utilizada para el estudio, así como la forma en la que fueron expuestas las células a los extractos analizados.

Antes de su fraguado final, los selladores tiene la posibilidad potencial de liberar productos citotóxicos, causando una irritación tisular y ralentizando o evitando la curación. El exceso de humedad en los conductos también puede alterar el fraguado. Por lo que en el artículo de Loushine y cols. (2011) concluye que existe una correlación entre el tiempo de fraguado del cemento y su nivel de toxicidad.

Se pudo observar un fluido en las muestras de EndoSequence BC Sealer cuando este fragua en una cámara de humedad relativa del 100%, igual que se observó en el estudio de Zoufan y cols. (2011). En nuestro estudio, observamos tanto en Totalfill como en Fillapex diferentes fluidos tras el fraguado. En relación al MTA Fillapex observamos una solución de tipo resinosa que continuamente estaba presente en el medio de cultivo mientras que en Totalfill un pequeño exudado claro que se eliminó antes de añadir medio de cultivo y que no volvió a aparecer durante todo el experimento.

Bin y cols. (2012) realizaron un estudio en el que se evaluó el MTA Fillapex, comparándolo con el WMTA (MTA blanco) y con el AH Plus. Se usaron extractos a varias concentraciones, analizando las muestras tras las 24 h, 48 h y 72 h de fraguado, todos con un tiempo de contacto con las células de 24 h. En este estudio, el MTA Fillapex fue el sellador más citotóxico, dato que concuerda con nuestros resultados. El MTA Fillapex presentó una alta citotoxicidad en los grupos de altas concentraciones (1:1, 1:2, y 1:4). En los grupos de menores

concentraciones los resultados mejoran. EL AH Plus en altas concentraciones presentaba unos altos niveles de citotoxicidad. En nuestro estudio también presentan diferencias con el grupo control. En nuestro estudio los valores iniciales de crecimiento celular son mayores, y luego se enlentece el crecimiento. La diferencia en la primera muestra horaria podría deberse a que se cultivan las células con el sellador recién mezclado, sin que exista un tiempo de fraguado.

El MTA Fillapex se comparó en un estudio de evaluación de la citotoxicidad de selladores en fibroblastos con el AH Plus, Epiphany, Endomethasone N, EndoReZ, Pulp Canal Sealer eWT, RoekoSeal y Sealapex a través de un ensayo por MTT. Se evaluó inmediatamente tras la mezcla y durante obteniendo resultados semanalmente durante 5 semanas. Al igual que en otros estudios, se valoró la citotoxicidad de manera porcentual con respecto al grupo control.

El Fillapex obtuvo los peores valores de todos los selladores comparados, presentando una citotoxicidad severa hasta la tercera semana, a partir de la cual no superó los valores de citotoxicidad moderada, con diferencia significativas a las 5 semanas con todos los selladores. Ninguno de los otros selladores presentó citotoxicidad tras 5 semanas. Los malos resultados del Fillapex coinciden con nuestros resultados, aunque en nuestro estudio no existe una mejora de resultados con el paso del tiempo. El periodo que evaluamos fue considerablemente menor. El AH Plus presentó valores de citotoxicidad moderada tras la mezcla, leve a los 7 días; el resto de valores estaban dentro del rango de no citotóxicos. En los tiempos analizados en nuestro estudio, más cortos, no apreciamos la tendencia de mejora en los valores de viabilidad celular que existen en este estudio con el paso del tiempo (Silva y cols., 2013a).

En otro estudio del mismo grupo (Silva y cols., 2013b) se evaluaron las propiedades citotóxicas del MTA Fillapex y el AH Plus a través de un estudio por MTT. Las mediciones fueron realizadas tras la mezcla del material y una por semana durante 4 semanas sucesivas, usando muestras sin diluir.

Los resultados obtenidos por el MTA Fillapex indican que fue severamente citotóxico durante todo el período experimental y fue significativamente más

citotóxico que AH Plus. Estos resultados coinciden con los datos de nuestro estudio. El AH Plus obtuvo un resultado moderadamente tóxico en fresco, medianamente tóxico la primera semana y no fue citotóxico tras dos semanas. El aumento de la viabilidad celular que se presenta en este estudio, hasta llegar a los niveles del grupo control, no se aprecia en las primeras 72 h, tiempo más largo de nuestro estudio.

Se realizó un estudio de citotoxicidad de un nuevo sellador de conducto BioRoot RCS (biosilicato), comparándolo con el Pulp Canal Sealer, un sellador de óxido de cinc con eugenol. Se realizó un estudio de contacto directo, contacto indirecto y un estudio de proliferación celular. Este trabajo muestra que el cemento de silicato tricálcico (BioRoot RCS) es menos tóxico para las células PDL que el Pulp Canal Sealer. El extracto de BioRoot RCS presentó una disminución significativa en la viabilidad celular tras 2 días de contacto. (Camps y cols. 2015).

Zmener y cols. (2012), en un estudio de implantación subcutánea, compararon la citotoxicidad de Fillapex y el cemento de Grossman (control positivo).

Tras 10 días existía presencia de tejido conectivo fibroso, que fue aumentando en grosor tras 30 y 90 días con un infiltrado inflamatorio severo. A los 90 días las ocho muestras del Fillapex continuaban presentando una reacción severa, mientras que 7 de las 8 muestras del cemento de Grossman habían reducido su inflamación presentando una reacción moderada, presentando diferencias significativas.

Es posible que las resinas no polimerizadas tras la degradación por acción enzimática produzcan subproductos tóxicos causante de las reacciones inflamatorias severas.

Concluyeron que Fillapex cuando se implanta en tejidos subcutáneos en ratas mantiene su toxicidad incluso después de 90 días.

La respuesta tisular del tejido conectivo subcutáneo del MTA Fillapex fue comparada con el MTA y el Selapex en ratas (Gomes-Filho y cols. 2012), desde 7 hasta 90 días, valorando el grado de inflamación y la presencia de necrosis. A los

7 días todas las muestras presentaban inflamación, que se fue reduciendo con el tiempo. A partir de los 15 días los grupos del MTA Fillapex y el MTA presentaron valores de inflamación leve, sin diferencia significativa entre ellos. Tampoco presentaron presencia de necrosis en ningún caso. Solo el grupo del Selapex presentaba valores de inflamación intensa que se redujo a los 30 días. Concluyendo que, en el modelo de rata, el MTA Fillapex produjo reacciones tisulares similares al MTA. Estos resultados no coinciden con el resto de estudios de implantación subcutánea y con los resultados de los estudios *in vitro* como el nuestro.

Gomes-Filho y cols. (2013) compararon el resultado histológico de selladores (Sealapex, Endo-CPM y MTA Fillapex). Todas las muestras presentaron áreas de resorción en el cemento radicular en diferentes áreas. En estas había tanto zonas activas como inactivas. Presentaron un infiltrado inflamatorio intenso en el área periapical.

Con el MTA Fillapex en 1 caso sucedió el cierre biológico de ápice mientras que 9 presentaron una ausencia completa o parcial de respuesta. Tanto la extensión como la intensidad del proceso inflamatorio se valoró en un grado 4 sobre 4 puntos. Los resultados del resto de los selladores fueron muy similares. Concluyeron que el MTA Fillapex obtuvo resultados similares a los obtenidos con Sealapex y Endo-CPM, con respecto a los diferentes criterios histopatológicos analizados.

Marques y cols. (2013) analizaron la reacción inflamatoria en tejido subcutáneo en ratas comparando el MTA Fillapex con un cemento de óxido de cinc con eugenol a 7 y 15 días. La evaluación histológica mostró que ambos materiales causaron una intensa/moderada reacción inflamatoria a los 7 días que disminuyó con el tiempo. Mientras que a los 15 días presentaban un grado de inflamación moderado, con la existencia de muchas fibras de colágeno indicando la curación del tejido. El grupo del MTA Fillapex obtuvo los mejores resultados. Los cementos de óxido de cinc con eugenol causaron un infiltrado inflamatorio severo.

Bósio y cols. (2014) también compararon la respuesta tisular en tejido conectivo subcutáneo de ratas. Los materiales fueron dos cementos selladores de conductos radiculares iRoot SP, Fillapex y dos cementos reparadores Bioaggregate y White MTA. Se evaluó el grado de inflamación, la presencia o no de la macrófagosn células gigantes multinucleadas y tejido necrótico, en periodos de 7, 15, 30 y 90 días. Los cementos reparadores tuvieron los mejores resultados, con respuestas similares respecto a los del grupo control. Esta diferencia fue significativa con respecto a los dos cementos selladores hasta los 15 días. A partir de los 30 días la diferencias fueron significativas solo con el grupo del Fillapex. Los materiales fueron biocompatibles, excepto MTA Fillapex, que siguió siendo tóxico para el tejido subcutáneo, incluso después de 90 días. Los resultados obtenidos en este estudio están en la línea de los resultados *in vitro* obtenidos en nuestra investigación.

En otro estudio de implantación subcutánea se realizó una comparación entre dos cementos reparadores biocerámicos, el MTA y el Endosequence Bioceramic Root Repair (EBRR) Material a 7 y 30 días.

Los dos grupos presentaron una capsula de tejido fibroso, que aumentó su grosor con el paso del tiempo, significativamente mayor que la del grupo control. Tanto el MTA como el EBRR produjeron una reacción inflamatoria significativamente mayor que los observados en el grupo control. Esta reacción de moderada a severa a los 7 días, fue disminuyendo significativamente hasta los 30 días. Comparando los dos grupos, ERRM produjo efectos significativamente menos perjudiciales que MTA (Khalil y Abunasef, 2015).

Las células madre son células indiferenciadas que tiene capacidad para autorrenovarse y diferenciarse a múltiples estirpes celulares (Weissman, 2000; Moraleda, 2004,) y su estudio ha avanzado mucho en las últimas décadas. El uso de diferentes líneas celulares de células madre dentales para la realización de pruebas citotóxicas con selladores abre una nueva línea de estudio en la biocompatibilidad de los cemento endodóncicos.

No hemos encontrado ningún estudio en el que se evalúe la citotoxicidad de los cementos selladores en las células madre del ligamento periodontal.

D'Anto y cols. (2010) estudiaron la capacidad dos cementos de silicato cálcico, el MTA y el cemento Portland, para inducir proliferación, adhesión y migración de las células madre de médula ósea humana (hMSCs). La viabilidad y proliferación celular se analizó tras un periodo de incubación de 1 hasta 28 días. En las muestras del MTA se observó una reducción significativa en la adhesión celular con respecto al grupo control. En el grupo del cemento Portland se vieron células de forma circular, de las cuales muy pocas estaban vivas.

Durante los 7 primeros días no existió diferencia en la proliferación celular en los grupos del MTA con respecto al grupo control. A partir del día 14 el MTA tuvo una mayor proliferación celular con diferencias significativas con respecto al grupo control. El cemento Portland tuvo unos resultados menores en todos los casos, con diferencias significativas a partir del tercer día.

La migración de células madre de médula ósea humana fue significativamente mayor en comparación con el grupo control negativo y el grupo de cemento Portland. Sin embargo, la capacidad migratoria de las células madre de médula ósea fue más marcada en el grupo de control positivo que en el grupo MTA. El cemento Portland obtuvo resultados similares a los observados en el grupo de control negativo. En este estudio se presenta la primera evidencia *in vitro* de un efecto de migración de células madre mesenquimales por el MTA. En nuestro estudio los dos cementos selladores de silicato cálcico producen un efecto totalmente diferente en cuanto a la migración celular. El Fillapex, en las concentraciones utilizadas, no permite prácticamente la viabilidad celular, con lo que los valores de migración son nulos. El TotalFill presenta valores superiores al grupo control, induciendo una mayor migración celular a las 24 h. A las 48 h, en el ensayo de "curación de herida", hay un cierre completo en ambos grupos. Por lo que su capacidad de inducción a la migración celular es al menos la misma que el grupo control.

En otro estudio (Schneider 2014) en el que se evalúa la proliferación y la migración celular, se utilizaron células madre de la papila apical con MTA blanco (WMTA). Al igual que en nuestro estudio, se realizó la caracterización inmunofenotípica de las células. Esto es imprescindible para asegurar el tipo de células con el que se está realizando el ensayo.

Se evaluó el MTA tras 1 h y 24 h de fraguado. Ambos produjeron una inducción en la migración celular temprana y a corto plazo. Desde al primera hasta la sexta hora produjo una inducción a la migración significativamente superior al grupo control. Este efecto se redujo gradualmente hasta las 48h. A las 72 h hubo otro pequeño aumento en la inducción de la migración.

Las células fueron expuestas a los grupos durante una hora, tras lo que se valoró la proliferación celular. Los grupos de MTA presentaron un aumento significativo a las 24 h de la proliferación celular con respecto al grupo control. Nuestros datos coinciden con el grupo del TotalFill. A los 5 días solo el MTA fraguado durante 24 h presentó diferencias significativas. Eso se puede deber a que las diferentes liberaciones de calcio según el fraguado del material. El calcio podría inducir una reacción tóxica e inflamatoria (Gandolfi y cols. 2010). A los 7 días el grupo control presentó mejores resultados que los grupos del MTA.



## **IV. CONCLUSIONES**



Tras el análisis de los resultados obtenidos en las condiciones de este estudio, y respondiendo a los objetivos planteados, se puede concluir que cada material tiene un comportamiento diferente, con las siguientes características:

TotalFill mejora la proliferación de las células madre del ligamento periodontal. AH Plus presenta unos valores de proliferación celular disminuidos. MTA Fillapex disminuye considerablemente la proliferación de las células madre del ligamento periodontal

TotalFill no produce apoptosis de las células madre del ligamento periodontal, mientras que MTA Fillapex la aumenta y AH Plus no produjo un aumento de la apoptosis celular.

La migración celular se incremento con TotalFill, se redujo con AH Plus y fue inexistente con MTA Fillapex en las células madre del ligamento periodontal.

La adhesión celular mejoró con TotalFill y disminuyó con AH Plus y MTA Fillapex. La disminución en este grupo fue mayor que la ofrecida por AH Plus.

La morfología de las células sembradas sobre AH Plus y TotalFill fue correcta. MTA Fillapex presentó una fijación celular muy limitada.

La hipótesis nula se cumple parcialmente. Se puede establecer que TotalFill no presenta citotoxicidad, mientras que tanto MTA Fillapex como AH Plus presentan citotoxicidad en las células madre del ligamento periodontal.



## **IV. BIBLIOGRAFÍA.**



10993-5. I (2009). Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for in vitro cytotoxicity.

Akintoye, S. O., Lam, T., Shi, S., Brahim, J., Collins, M. T., Robey, P. G. (2006). Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*, 38(6), 758-768.

Al-Haddad, A., Abu, K. N., Che, A. A. Z. (2014). Interfacial adaptation and thickness of bioceramic-based root canal sealers. *Dental materials journal*, 34(4), 516-521

Al-Hiyasat, A. S., Tayyar, M., Darmani, H. (2010). Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International endodontic journal*, 43(2), 148-153.

Alongi, D. J., Yamaza, T., Song, Y., Fouad, A. F., Romberg, E. E., Shi, S., Tuan, R.S., Huang, G.T. (2010). Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative medicine*, 5(4), 617-631

Alzer H., Apel, C., Heiland M., Friedrich R E, Jung O., Kroeger N, Smeets R. (2015). Enrichment and Schwann Cell Differentiation of Neural Crest-derived Dental Pulp Stem Cells. *In Vivo*, 29(3), 319-326.

America Asssocation of Endodontics. (1998) Position Statement., 211 E. Chicago Ave., Suite 1100, Chicago.

America Asssocation of Endodontics. (2007) Position Statement., 211 E. Chicago Ave., Suite 1100, Chicago.

Amin, S. A. W., Seyam, R. S., El-Samman, M. A. (2012). The effect of prior calcium hydroxide intracanal placement on the bond strength of two calcium

silicate-based and an epoxy resin-based endodontic sealer. *Journal of endodontics*, 38(5), 696-699

Amoroso-Silva, P. A., Guimarães, B. M., Marciano, M. A., Duarte, M. A. H., Cavenago, B. C., Ordinola-Zapata, R., De Moraes, I. G. (2014). Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microscopy research and technique*, 77(12), 1031-1036.

Assmann, E., Scarparo, R. K., Böttcher, D. E., Grecca, F. S. (2012). Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *Journal of endodontics*, 38(2), 219-221.

Araki, K., Suda, H., Spångberg, L. S. (1994). Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of endodontics*, 20(2), 67-70.

Azar, N. G., Heidari, M., Bahrami, Z. S., Shokri, F. (2000). In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *Journal of endodontics*, 26(8), 462-465

Balguerie, E., van der Sluis, L., Vallaey, K., Gurgel-Georgelin, M., Diemer, F. (2011). Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron microscopic study. *Journal of endodontics*, 37(11), 1576-1579.

Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., Robey, G., Shi, S. (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of Dental Research*, 82(12) 976-981

Beltes, P., Koulaouzidou, E., Kolokuris, I., Kortsaris, A. H. (1997). In vitro evaluation of the cytotoxicity of two glass-ionomer root canal sealers. *Journal of endodontics*, 23(9), 572-574.



Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192.

Bin, C. V., Valera, M. C., Camargo, S. E., Rabelo, S. B., Silva, G. O., Balducci, I., Camargo, C. H. R. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*, 38(4), 495-500.

Borges, R. P., Sousa-Neto, M. D., Versiani, M. A., Rached-Júnior, F. A., De-Deus, G., Miranda, C. E. S., Pécora, J. D. (2012). Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International endodontic journal*, 45(5), 419-428.

Borges, Á. H., Orçati Dorileo, M. C. G., Villa, R. D., Borba, A. M., Semenoff, T. A. D. V., Guedes, O. A., Araújo Estrela, C.R., Bandeca, M. C. (2014). Physicochemical Properties and Surfaces Morphologies Evaluation of MTA FillApex and AH Plus. *The Scientific World Journal*, 2-6

Bósio, C. C., Felipe, G. S., Bortoluzzi, E. A., Felipe, M. C. S., Felipe, W. T., Rivero, E. R. C. (2014). Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *International endodontic journal*, 47(7), 667-674.

Bouillaguet, S., Wataha, J. C., Tay, F. R., Brackett, M. G., Lockwood, P. E. (2006). Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, 32(10), 989-992.

Boutsioukis, C., Noula, G., Lambrianidis, T. (2008). Ex vivo study of the efficiency of two techniques for the removal of mineral trioxide aggregate used as a root canal filling material. *Journal of endodontics*, 34(10), 1239-1242

Briseño, B. M., Willershausen, B. (1990). Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. I. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *Journal of endodontics*, 16(8), 383-386.

Briseño, B. M., Willershausen, B. (1991). Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. silicone-and resin-based sealers. *Journal of endodontics*, 17(11), 537-540.

Bronckaers, A., Hilkens, P., Fanton, Y., Struys, T., Gervois, P., Politis, C., Martens, W., Lambrichts, I. (2013). Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One*, 8(8), e71104

Bryan, T. E., Khechen, K., Brackett, M. G., Messer, R. L., El-Awady, A., Primus, C. M., Gutman, J., Tay, F. R. (2010). In Vitro Osteogenic Potential of an Experimental Calcium Silicate-based Root Canal Sealer. *Journal of endodontics*, 36(7), 1163-1169.

Buchanan, S. (1996). The continuous wave of obturation technique: 'centered' condensation of warm gutta percha in 12 seconds. *Dentistry today*, 15(1), 60-2.

Buchanan S. (2004) The Continuous Wave of Condensation Obturation Technique. In: Castellucci A. *Endodontics* vol. 2. 2da ed. Italia. Edizioni Odontoiatriche il Tridente; 690-702.

Butt, N., Talwar, S. (2013). In-vitro evaluation of various solvents for retrieval of mineral trioxide aggregate and their effect on microhardness of dentin. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 16(3), 199

Camargo, C. H. R., Camargo, S. E. A., Valera, M. C., Hiller, K. A., Schmalz, G., Schweikl, H. (2009). The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology*, 108(6), 952-960

Camilleri, J., Gandolfi, M. G., Siboni, F., Prati, C. (2011). Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *International endodontic journal*, 44(1), 9-20.

Camilleri, J. (2015). Sealers and Warm Gutta-percha Obturation Techniques. *Journal of endodontics*, 41(1), 72-78.

Camps, J., About, I. (2003). Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *Journal of endodontics*, 29(9), 583-586.

Camps, J., Jeanneau, C., Laurent, P., About, I. (2015). Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *Journal of endodontics*. 41 (9), 1469 – 1473

Cao, T., Saw, T. Y., Heng, B. C., Liu, H., Yap, A. U. J., Ng, M. L. (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of applied toxicology*, 25(2), 101-108.

Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650.

Carinci, F., Papaccio, G., Laino, G., Palmieri, A., Brunelli, G., D'Aquino, R., Graciano, A., Lanza, V., Scapoli, L., Martinelli, M. (2008). Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *Journal of craniofacial surgery*, 19(3), 616-625.

Carvalho-Junior, J. R., Correr-Sobrinho, L., Correr, A. B., Sinhoreti, M. A., Consani, S., Sousa-Neto, M. D. (2007). Radiopacity of root filling materials using digital radiography. *International endodontic journal*, 40(7), 514-520.

Celikten, B., Uzuntas, C. F., Gulsahi, K. (2015). Resistance to Fracture of Dental Roots Obturated with Different Materials. *BioMed research international*, 2015, 1-5.

Chandra, S. S., Shankar, P., Indira, R. (2012). Depth of penetration of four resin sealers into radicular dentinal tubules: a confocal microscopic study. *Journal of endodontics*, 38(10), 1412-1416.

Chang, S. W., Lee, S. Y., Kang, S. K., Kum, K. Y., Kim, E. C. (2014). In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. *Journal of endodontics*, 40(10), 1642-1648.

Ciasca, M., Aminoshariae, A., Jin, G., Montagnese, T., Mickel, A. (2012). A comparison of the cytotoxicity and proinflammatory cytokine production of EndoSequence root repair material and ProRoot mineral trioxide aggregate in human osteoblast cell culture using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of endodontics*, 38(4), 486-489

Çobankara, F. K., Adanır, N., Belli, S. (2004). Evaluation of the influence of smear layer on the apical and coronal sealing ability of two sealers. *Journal of Endodontics*, 30(6), 406-409.

Combe, E. C., Cohen, B. D., Cummings, K. (2001). Alpha- and beta-forms of gutta-percha in products for root canal filling. *International endodontic journal*, 34(6), 447-451.

Correa, G. T. B., Veranio, G. A. C., Silva, L. E., Hirata Junior, R., Coil, J. M., Scelza, M. F. Z. (2009). Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *Journal of applied oral science*, 17(5), 457-461

D'Antò, V., Di Caprio, M. P., Ametrano, G., Simeone, M., Rengo, S., Spagnuolo, G. (2010). Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *Journal of endodontics*, 36(11), 1839-1843

Davies, L. C., Locke, M., Webb, R. D., Roberts, J. T., Langley, M., Thomas, D. W., Archer, C.W., Stephens, P. (2010). A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem cells and development*, 19(6), 819-830.

Davies, L. C., Lönnies, H., Locke, M., Sundberg, B., Rosendahl, K., Götherström, C., Blanc, C., Stephens, P. (2011). Oral mucosal progenitor cells are potently immunosuppressive in a dose-independent manner. *Stem cells and development*, 21(9), 1478-1487

De Almeida, W. A., Leonardo, M. R., Silva, L. A. B. (2000). Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *International endodontic journal*, 33(1), 25-27.

De-Deus, G., Coutinho-Filho, T., Reis, C., Murad, C., Paciornik, S. (2006). Polymicrobial leakage of four root canal sealers at two different thicknesses. *Journal of Endodontics*, 32(10), 998-1001

De-Deus, G., Canabarro, A., Alves, G. G., Marins, J. R., Linhares, A. B. R., Granjeiro, J. M. (2012). Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *International endodontic journal*, 45(6), 508-513

de Miranda Candeiro, G. T., Correia, F. C., Duarte, M. A. H., Ribeiro-Siqueira, D. C., Gavini, G. (2012). Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Journal of endodontics*, 38(6), 842-845.

Dokić, J., Tomić, S., Cerović, S., Todorović, V., Rudolf, R., Čolić, M. (2012). Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *Journal of clinical periodontology*, 39(9), 807-816

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop D.J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317

Donnelly, A., Sword, J., Nishitani, Y., Yoshiyama, M., Agee, K., Tay, F. R., Pashley, D. H. (2007). Water sorption and solubility of methacrylate resin-based root canal sealers. *Journal of Endodontics*, 33(8), 990-994.

Dudeja, C., Taneja, S., Kumari, M., Singh, N. (2015). An in vitro comparison of effect on fracture strength, pH and calcium ion diffusion from various biomimetic materials when used for repair of simulated root resorption defects. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 18(4), 279.

El-Sayed, K. F., Dörfer, C., Fändrich, F., Gieseler, F., Moustafa, M. H., Ungefroren, H. (2013). Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. In *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II* (pp. 89-103). Springer Berlin Heidelberg

Eldeniz, A. U., Mustafa, K., Ørstavik, D., Dahl, J. E. (2007). Cytotoxicity of new resin, calcium hydroxide-and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International endodontic journal*, 40(5), 329-337.

Ersahan, S., Aydin, C. (2010). Dislocation resistance of iRoot SP, a calcium silicate-based sealer, from radicular dentine. *Journal of endodontics*, 36(12), 2000-2002

Ersahan, S., Aydin, C. (2013). Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin-and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(3-4), 857-862

Ehsani, M., Dehghani, A., Abesi, F., Khafri, S., Dehkordi, S. G. (2014). Evaluation of apical micro-leakage of different endodontic sealers in the presence and absence of moisture. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 8(3), 125.

Faria-Júnior, N. B., Tanomaru-Filho, M., Berbert, F. L. C. V., Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2013). Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International endodontic journal*, 46(8), 755-762.

Fisher, M. A., Berzins, D. W., Bahcall, J. K. (2007). An in vitro comparison of bond strength of various obturation materials to root canal dentin using a push-out test design. *Journal of endodontics*, 33(7), 856-858.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381-390.

Friedman, C. E., Sandrik, J. L., Heuer, M. A., Rapp, G. W. (1977). Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials. *Journal of endodontics*, 3(8), 304-308.

Friedman, C. M., Sandrik, J. L., Heuer, M. A., Rapp, G. W. (1975). Composition and mechanical properties of gutta-percha endodontic points. *Journal of dental research*, 54(5), 921-925.

Gade, V. J., Belsare, L. D., Patil, S., Bhede, R., Gade, J. R. (2015). Evaluation of push-out bond strength of endosequence BC sealer with lateral condensation and thermoplasticized technique: An in vitro study. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 18(2), 124.

Gandia, C., Arminan, A. N. A., García-Verdugo, J. M., Lledo, E., Ruiz, A., Minana, M. D., Sepulveda, P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells*, 26(3), 638-645.

Gandolfi, M. G., Taddei, P., Tinti, A., Prati, C. (2010). Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *International endodontic journal*, 43(10), 917-929

Garrido, A. D. B., Lia, R. C. C., França, S. C., Da Silva, J. F., Astolfi-Filho, S., Sousa-Neto, M. D. (2010). Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *International endodontic journal*, 43(4), 283-291.

Ge, S., Mrozik, K. M., Menicanin, D., Gronthos, S., Bartold, P. M. (2012). Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regenerative medicine*, 7(6), 819-832

Geurtsen, W., Leyhausen, G. (1997). Biological aspects of root canal filling materials—histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clinical oral investigations*, 1(1), 5-11.

Gomes-Filho, J. E., Watanabe, S., Lodi, C. S., Cintra, L. T. A., Nery, M. J., Dezan, E., Bernabé, P. (2012). Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dental traumatology*, 28(6), 452-456



Gomes-Filho, J. E., Watanabe, S., Cintra, L. T. A., Nery, M. J., Dezan-Júnior, E., Queiroz, I. O. A., Lodi C.S., Basso, M. D. (2013). Effect of MTA-based sealer on the healing of periapical lesions. *Journal of applied oral science*, 21(3), 235-242

Goodman, A., Schilder, H., Aldrich, W. (1974). The thermomechanical properties of gutta-percha: II. The history and molecular chemistry of gutta-percha. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 37(6), 954-961.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625-13630.

Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 81(8), 531-535.

Gurgel-Filho, E. D., Feitosa, J. A., Teixeira, F. B., de Paula, R. M., Silva, J. A., Souza-Filho, F. J. (2003). Chemical and X-ray analyses of five brands of dental gutta-percha cone. *International endodontic journal*, 36(4), 302-307.

Gutmann JL, Witherspoon DE. (2002) Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: Cohen S, Burns RC, ed. *Pathways of the pulp*. 8th ed. St. Louis: Mosby; 293-364.

Güven, E. P., Yalvac, M. E., Kayahan, M. B., Sunay, H., Sahin, F., Bayirli, G. (2013). Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *Journal of applied oral science*, 21(4), 351-357.

Haapasalo, M., Parhar, M., Huang, X., Wei, X., Lin, J., Shen, Y. (2015). Clinical use of bioceramic materials. *Endodontic topics*, 32(1), 97-117.

Habal, M. B. (1984). The biologic basis for the clinical application of the silicones: a correlate to their biocompatibility. *Archives of surgery*, 119(7), 843-848.

Han, L., Okiji, T. (2013). Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *International endodontic journal*, 46(9), 808-814.

Handa, K., Saito, M., Yamauchi, M., Kiyono, T., Sato, S., Teranaka, T., Narayanan, A. S. (2002). Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*, 31(5), 606-611

Hess, D., Solomon, E., Spears, R., He, J. (2011). Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *Journal of endodontics*, 37(11), 1547-1549

Hilken, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., Bronckaers, A. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and tissue research*, 353(1), 65-78

Honda, M. J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., Morsczech, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of oral science*, 52(4), 541-552

Huang, C. C., Pelaez, D., Bendala, J. D., Garcia-Godoy, F., Cheung, H. S. (2009). Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regenerative medicine*, 4(6), 809-821

Huang, F. M., Tai, K. W., Chou, M. Y., Chang, Y. C. (2002). Cytotoxicity of resin, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International endodontic journal*, 35(2), 153-158.

Huang, F. M., Tsai, C. H., Yang, S. F., Chang, Y. C. (2005). Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *Journal of endodontics*, 31(9), 679-683.

Huang, G. J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., Shi, S. (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*, 34(6), 645-651

Huang, G. J., Gronthos, S., Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792-806.

Huang, T. H., Lee, D. H., Kao, C. T. (2001). Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based, and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *Journal of endodontics*, 27(12), 744-748

Huang, Y. H., Yang, J. C., Wang, C. W., Lee, S. Y. (2010). Dental stem cells and tooth banking for regenerative medicine. *Journal of experimental & Clinical medicine*, 2(3), 111-117.

Huffman, B. P., Mai, S., Pinna, L., Weller, R. N., Primus, C. M., Gutmann, J. L. Tay, F. R. (2009). Dislocation resistance of ProRoot Endo Sealer, a calcium silicate-based root canal sealer, from radicular dentine. *International endodontic journal*, 42(1), 34-46

Huumonen, S., Lenander-Lumikari, M., Sigurdsson, A., Ørstavik, D. (2003). Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. *International endodontic journal*, 36(4), 296-301.

Hynes, K., Menicanin, D., Gronthos, S., Bartold, P. M. (2012). Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 59(1), 203-227

Inaba, M., Yamashita, Y. M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell stem cell*, 11(4), 461-469.

Ingle J I., Carl W. Newton, John D. West, James L. Gutmann, Gerald N. Glickman, Barry H. Korzon, Howard Martin. (2002) Obturation of the radicular space. En: Ingle J. *Endodontics*. London. Hamilton. 5<sup>a</sup>Ed. 571-668.

International Standard ISO 6876:2012 Dental root canal sealing materials, 2012

Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Tomokiyo, A., Matsushita, K., Nakashima, M. (2006). Side Population Cells Isolated from Porcine Dental Pulp Tissue with Self-Renewal and Multipotency for Dentinogenesis, Chondrogenesis, Adipogenesis, and Neurogenesis. *Stem cells*, 24(11), 2493-2503.

Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Ishizaka, R., Nakamura, H., Into, T., Matsushina, K., Nakashima, M. (2009). Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146-side population cells from a canine tooth. *Regen med*, 4(3):377-85

Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Calenic, B., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitev, V., Haapasalo, M. (2010). Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *Journal of endodontics*, 36(3), 469-474

Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitev, V., Haapasalo, M. (2012). High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *Journal of endodontics*, 38(4), 475-480

Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Kozhuharova, A., Tanaka, T., Okada, M., Mitev, V., Imai, T. (2013). Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117+ stem cells. *Regenerative medicine*, 8(5), 597-69

Jaenisch, R., Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132(4), 567-582.

Kakehashi, S., Stanley, H. R., Fitzgerald, R. J. (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 20(3), 340-349.

Karapınar-Kazandağ, M., Bayrak, Ö. F., Yalvaç, M. E., Ersev, H., Tanalp, J., Şahin, F., Bayırlı, G. (2011). Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *International endodontic journal*, 44(7), 626-634.

Keskin, C., Demiryurek, E. O., Ozyurek, T. (2015). Color Stabilities of Calcium Silicate-based Materials in Contact with Different Irrigation Solutions. *Journal of endodontics*, 41(3), 409-411.

Khalil, W. A., Abunasef, S. K. (2015). Can Mineral Trioxide Aggregate and Nanoparticulate EndoSequence Root Repair Material Produce Injurious Effects to Rat Subcutaneous Tissues?. *Journal of endodontics*, 41 (7), 1151 – 1156

Khedmat, S., Dehghan, S., Hadjati, J., Masoumi, F., Nekoofar, M. H., Dummer, P. M. H. (2014). In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restorative dentistry & endodontics*, 39(3), 149-154.

Kim, Y. K., Grandini, S., Ames, J. M., Gu, L. S., Kim, S. K., Pashley, D. H., Gutman, J., Tay, F. R. (2010). Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *Journal of endodontics*, 36(3), 383-399.

Kopper, P. M. P., Figueiredo, J. A. P., Della Bona, A., Vanni, J. R., Bier, C. A., Bopp, S. (2003). Comparative in vivo analysis of the sealing ability of three

endodontic sealers in post-prepared root canals. *International endodontic journal*, 36(12), 857-863

Koulaouzidou, E. A., Papazisis, K., Beltes, P., Geromicholos, G. D., Kortsarls, A. H. (1998). Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Dental traumatology*, 14(4), 182-185.

Lee, J. S., An, S. Y., Kwon, I. K., Heo, J. S. (2014). Transdifferentiation of human periodontal ligament stem cells into pancreatic cell lineage. *Cell biochemistry and function*, 32(7), 605-611.

Lee, S. J., Monsef, M., Torabinejad, M. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of endodontics*, 19(11), 541-544.

Lee, S. J., Chung, J., Na, H. S., Park, E. J., Jeon, H. J., Kim, H. C. (2013). Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clinical oral investigations*, 17(3), 1009-1015.

Lei, M., Li, K., Li, B., Gao, L. N., Chen, F. M., Jin, Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35(24), 63

Leonardo, M. E. (2005). Tratamiento de conductos radiculares. Principios técnicos y biológicos. Leonardo M.R. Endodoncia. Tratamiento de conductos radiculares. Principios técnicos y biológicos. Vol. 1 y 2 Artes médicas Latinoamericanas. Sao Paulo Brasil. 2005

Leonardo, M. R., Da Silva, L. A. B., Tanomaru Filho, M., Bonifácio, K. C., Ito, I. Y. (2000). In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *Journal of endodontics*, 26(7), 391-394.

Leonardo, R. T., Consolaro, A., Carlos, I. Z., Leonardo, M. R. (2000). Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *Journal of endodontics*, 26(6), 328-330.

Leprince, J. G., Zeitlin, B. D., Tolar, M., Peters, O. A. (2012). Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *International endodontic journal*, 45(8), 689-701.

Leyhausen, G., Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Geurtsen, W. (1999). Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *Journal of endodontics*, 25(2), 109-113.

Li, B., Jung, H. J., Kim, S. M., Kim, M. J., Jahng, J. W., Lee, J. H. (2013). Human periodontal ligament stem cells repair mental nerve injury. *Neural regeneration research*, 8(30), 2827

Li, X., Gong, P., Liao, D. (2010). In vitro neural/glial differentiation potential of periodontal ligament stem cells. *Archives of medical science*, 6 (5), 678-685.

Liao, J., Al Shahrani, M., Al-Habib, M., Tanaka, T., Huang, G. T. J. (2011). Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *Journal of endodontics*, 37(9), 1217-1224

Loushine, B. A., Bryan, T. E., Looney, S. W., Gillen, B. M., Loushine, R. J., Weller, R. N., Pashley, D.H., Tay, F. R. (2011). Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Journal of endodontics*, 37(5), 673-677

Luo, Z., Kohli, M. R., Yu, Q., Kim, S., Qu, T., He, W. X. (2014). Biodentine induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. *Journal of endodontics*, 40(7), 937-942.

Ma, J., Shen, Y., Stojicic, S., Haapasalo, M. (2011). Biocompatibility of two novel root repair materials. *Journal of endodontics*, 37(6), 793-798.

Maisto O A, (1967) *Endodoncia*. Es. 1ª ed. :Buenos Aires. Mundi S.A.

Mamootil, K., Messer, H. H. (2007). Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *International endodontic journal*, 40(11), 873-881

Maniglia-Ferreira, C., Bönecker, G., Silva, J. B. A., De Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., Souza-Filho, F. J. (2008). Degradation of trans-polyisoprene after root filling with thermoplasticized techniques. *International endodontic journal*, 41(4), 296-302.

Maniglia-Ferreira, C., Gurgel-Filho, E. D., Silva Jr, J. B. A., Paula, R. C. M. D., Feitosa, J. P. A., Gomes, B. P. F. D. A., Souza-Filho, F. J. D. (2007). Brazilian gutta-percha points. Part II: thermal properties. *Brazilian oral research*, 21(1), 29-34.

Marciano, J., Michalesco, P. M. (1989). Dental gutta-percha: chemical composition, X-ray identification, enthalpic studies, and clinical implications. *Journal of endodontics*, 15(4), 149-153..

Marlin, J., Schilder, H. (1973). Physical properties of gutta-percha when subjected to heat and vertical condensation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 36(6), 872-879.

Marques, N. C. T., Lourenço Neto, N., Fernandes, A. P., Rodini, C. D. O., Duarte, M. A. H., Oliveira, T. M. (2013). Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. *Brazilian dental journal*, 24(1), 10-14.



McMichen, F. R. S., Pearson, G., Rahbaran, S., Gulabivala, K. (2003). A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *International Endodontic Journal*, 36(9), 629-635.

Meehan, T. L., Yalonetskaya, A., Joudi, T. F., McCall, K. (2015). Detection of Cell Death and Phagocytosis in the *Drosophila* Ovary. *Drosophila Oogenesis: methods and protocols*, 191-206.

Mickel, A. K., Nguyen, T. H., Chogle, S. (2003). Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 29(4), 257-258

Miletić, I., Jukić, S., Anić, I., Željčić, D., Garaj-Vrhovac Osmak, V. (2003). Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *International endodontic journal*, 36(5), 330-335

Miletić, I., Devčić, N., Anić, I., Borčić, J., Karlović, Z., Osmak, M. (2005). The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *Journal of endodontics*, 31(4), 307-309.

Mitalipov S, Wolf D, (2009). Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009 ; 114: 185–199.

Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrion, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., Quintero, A., Chaparro, A., Sanz, A. (2010). Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of periodontology*, 81(6), 917-925.)

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5807-5812

Mohammadi, Z., Dummer, P. M. H. (2011). Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International endodontic journal*, 44(8), 697-730.

Moraleda, J. M., Ruiz, F., Blanquer, M., Arriba, F. (2004). ¿ Que son las células madre. *Hematología Mol*, 3, 2-5

Moreno, W. (1977). Thermomechanically softened gutta-percha root canal filling. *Journal of endodontics*, 3(5), 186-188.

Morgental, R. D., Vier-Pelisser, F. V., Oliveira, S. D. D., Antunes, F. C., Cogo, D. M., Kopper, P. M. P. (2011). Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International endodontic journal*, 44 (12), 1128-1133

Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., Di Benedetto, A., Grassi, F. R. (2012). Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *International journal of medical sciences*, 9(6), 480

Mukhtar-Fayyad, D. (2011). Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology*, 112(6), 137-142

Nagas, E., Uyanik, M. O., Eymirli, A., Cehreli, Z. C., Vallittu, P. K., Lassila, L. V., Durmaz, V. (2012). Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. *Journal of endodontics*, 38(2), 240-244

Nagas, E., Cehreli, Z., Uyanik, M. O., Durmaz, V. (2014). Bond strength of a calcium silicate-based sealer tested in bulk or with different main core materials. *Brazilian oral research*, 28(1), 1-7

Nakashima, M., Iohara, K., Sugiyama, M. (2009). Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(5), 435-440

Neelakantan, P., Grotra, D., Sharma, S. (2013). Retreatability of 2 Mineral Trioxide Aggregate-based Root Canal Sealers: A Cone-beam Computed Tomography Analysis. *Journal of endodontics*, 39(7), 893-896

Nikhil, V., Bansal, P., Sawani, S. (2015). Effect of technique of sealer agitation on percentage and depth of MTA Fillapex sealer penetration: A comparative in-vitro study. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 18(2), 119

Ordinola-Zapata, R., Bramante, C. M., Graeff, M. S., del Carpio Perochena, A., Vivan, R. R., Camargo, E. J., Garica R.B., Bernardineli, N., Gitman J., de Moraes, I. G. (2009). Depth and percentage of penetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compaction technique: a confocal laser scanning microscopy study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108(3), 450-457.

Ørstavik, D. (2005). Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics*, 12(1), 25-38.

Ørstavik, D., Nordahl, I., Tibballs, J. E. (2001). Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dental materials*, 17(6), 512-519.

Osorio, R. M., Hefti, A., Vertucci, F. J., Shawley, A. L. (1998). Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of endodontics*, 24(2), 91-96.

Özcan, E., Çapar, İ. D., Çetin, A. R., Tunçdemir, A. R., Aydınbelge, H. A. (2012). The effect of calcium silicate-based sealer on the push-out bond strength of fibre posts. *Australian dental journal*, 57(2), 166-170.

Özcan, E., Yula, E., Arslanoğlu, Z., İnci, M. (2013). Antifungal activity of several root canal sealers against *Candida albicans*. *Acta odontologica scandinavica*, 71(6), 1481-1485.

Parirokh, M., Forghani, F. R., Paseban, H., Asgary, S., Askarifard, S., Mahani, S. E. (2015). Cytotoxicity of Two Resin-Based Sealers and a Fluoride Varnish on Human Gingival Fibroblasts. *Iranian endodontic journal*, 10(2), 89.

Park, J. C., Kim, J. M., Jung, I. H., Kim, J. C., Choi, S. H., Cho, K. S., Kim, C. S. (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of clinical periodontology*, 38(8), 721-731.

Pawar, S. S., Pujar, M. A., Makandar, S. D. (2014). Evaluation of the apical sealing ability of bioceramic sealer, AH plus & epiphany: An in vitro study. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 17(6), 579.

Peng, L., Ye, L., Zhou, X. D. (2009). Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *International journal of oral science*, 1(1), 6-12.

Perassi, F. T., Bonetti Filho, I., Berbert, F. L. C. V., Carlos, I. Z., de Toledo Leonardo, R. (2004). Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *Journal of endodontics*, 30(7), 534-537

Pereira, L. O., Rubini, M. R., Silva, J. R., Oliveira, D. M., Silva, I. C. R., Poças-Fonseca, M. J., Azevedo, R. B. (2012). Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International endodontic journal*, 45(12), 1080-1090.

Pertot, W. J., Camps, J., Remusat, M., Proust, J. P. (1992). In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 73(5), 613-620.

Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., Bruzuci, De Pol, A. (2015). Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC developmental biology*, 15(1), 14.

Pommel, L., About, I., Pashley, D., Camps, J. (2003). Apical leakage of four endodontic sealers. *Journal of endodontics*, 29(3), 208-210

Prakash, R., Gopikrishna, V., Kandaswamy, D. (2005). Gutta-Percha: An Untold Story. *Endodontology*, 17(2), 32-36.

Prescott, R. S., Alsanea, R., Fayad, M. I., Johnson, B. R., Wenckus, C. S., Hao, J., John A.S., George, A. (2008). In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *Journal of endodontics*, 34(4), 421-426.

Reyhani, M. F., Ghasemi, N., Rahimi, S., Milani, A. S., Mokhtari, H., Shakouie, S., Safarvand, H. (2014). Push-out bond strength of Dorifill, Epiphany and MTA-Fillapex sealers to root canal dentin with and without smear layer. *Iranian endodontic journal*, 9(4), 246

Rodríguez-Lozano, F. J., Bueno, C., Insausti, C. L., Meseguer, L., Ramirez, M. C., Blanquer, M., Martin, N., Martinez, S., Moraleda, J. M. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International endodontic journal*, 44(9), 800-806.

Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. D. C., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, N., Martín, N., Martínez, S. Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 17(6), e1062.

Rodríguez-Lozano, F. J., Serrano-Belmonte, I., Calvo, J. P., Coronado-Parra, M. T., Bernabeu-Esclapez, A., Moraleda, J. M. (2013). Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *Journal of materials science: materials in medicine*, 24(4), 979-988.

Rodríguez-Lozano, F. J., García-Bernal, D., Aznar-Cervantes, S., Ros-Roca, M. A., Algueró, M. C., Atucha, N. M., Lozano-García, A.A., Moraleda, J.M., Cenis, J. L. (2014). Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *Journal of materials science: materials in medicine*, 25(12), 2731-2741.

Rodríguez-Lozano, F. J., García-Bernal, D., de los Ángeles Ros-Roca, M., del Carmen Algueró, M., Oñate-Sánchez, R. E., Camacho-Alonso, F., Moraleda, J. M. (2015). Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cranio-maxillofacial surgery* 43(6):855-862.

Roggendorf, M. J., Ebert, J., Petschelt, A., Frankenberger, R. (2007). Influence of moisture on the apical seal of root canal fillings with five different types of sealer. *Journal of endodontics*, 33(1), 31-33.

Ruparel, N. B., Ruparel, S. B., Chen, P. B., Ishikawa, B., Diogenes, A. (2014). Direct effect of endodontic sealers on trigeminal neuronal activity. *Journal of endodontics*, 40(5), 683-687

Sagsen, B., Ustün, Y., Demirbuga, S., Pala, K. (2011). Push-out bond strength of two new calcium silicate-based endodontic sealers to root canal dentine. *International endodontic journal*, 44(12), 1088-1091.

Sagsen B., Ustün, Y., Pala, K. . D., Demirbuga S. (2012). Resistance to fracture of roots filled with different sealers. *Dental materials journal*, 31(4), 528-532.

Scelza, M. Z., Linhares, A. B., Da Silva, L. E., Granjeiro, J. M., Alves, G. G. (2012). A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International endodontic journal*, 45(1), 12-18.

Schäfer, E., Zandbiglari, T. (2003). Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *International Endodontic Journal*, 36(10), 660-669.

Schäfer, E., Zandbiglari, T., Schäfer, J. (2007). Influence of resin-based adhesive root canal fillings on the resistance to fracture of endodontically treated roots: an in vitro preliminary study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 103(2), 274-279.

Schilder, H. (1967). Filling Root Canals in Three Dimensions. *Dental Clinics of North America*, 723, 44.

Schneider, R., Holland, G. R., Chiego, D., Hu, J. C., Nör, J. E., Botero, T. M. (2014). White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *Journal of endodontics*, 40(7), 931-936.

Schwarze, T., Leyhausen, G., Geurtsen, W. (2002). Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *Journal of endodontics*, 28(11), 749-753.

Schwarze, T., Fiedler, I., Leyhausen, G., Geurtsen, W. (2002). The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *Journal of Endodontics*, 28(11), 784-786.

Seltzer, S., Green, D. B., Weiner, N., DeRenzis, F. (1972). A scanning electron microscope examination of silver cones removed from endodontically treated teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 33(4), 589-605.

Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey P.G., Wang, C.Y., Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429), 149-155.

Sevimay, S., Dalat, D. (2003). Evaluation of penetration and adaptation of three different sealers: a SEM study. *Journal of oral rehabilitation*, 30(9), 951-955.)

Shi, S., Robey, P. G., Gronthos, S. (2001). Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*, 29(6), 532-539.

Shokouhinejad, N., Hoseini, A., Gorjestani, H., Raoof, M., Assadian, H., Shamshiri, A. R. (2012). Effect of phosphate-buffered saline on push-out bond strength of a new bioceramic sealer to root canal dentin. *Dental Research Journal*, 9(5), 595–599

Shokouhinejad, N., Gorjestani, H., Nasseh, A. A., Hoseini, A., Mohammadi, M., Shamshiri, A. R. (2013). Push-out bond strength of gutta-percha with a new bioceramic sealer in the presence or absence of smear layer. *Australian Endodontic Journal*, 39(3), 102-106.

Shokouhinejad, N., Sabeti, M., Gorjestani, H., Saghiri, M. A., Lotfi, M., Hoseini, A. (2011). Penetration of Epiphany, Epiphany self-etch, and AH Plus into dentinal



tubules: a scanning electron microscopy study. *Journal of endodontics*, 37(9), 1316-1319.

Silva, L. A. B., Leonardo, M. R., Faccioli, L. H., Figueiredo, F. (1997). Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *Journal of endodontics*, 23(2), 86-90.

Silva, L. A. B., Barnett, F., Pumarola-Suñé, J., Cañadas, P. S., Nelson-Filho, P., Silva, R. A. B. (2014). Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility in vivo. *Journal of endodontics*, 40(9), 1424-1428.

Silva, E. J., Rosa, T. P., Herrera, D. R., Jacinto, R. C., Gomes, B. P., Zaia, A. A. (2013). Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *Journal of endodontics*, 39(2), 274-277.

Silva, E. J., Santos, C. C., Zaia, A. A. (2013). Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *Journal of applied oral science*, 21(1), 43-47.

Silva, G. O., Cavalcanti, B. N., Oliveira, T. R., Bin, C. V., Camargo, S. E., Camargo, C. H. (2015). Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clinical oral investigations*, 1-5.

Singh, C. V., Rao, S. A., Chandrashekar, V. (2012). An in vitro comparison of penetration depth of two root canal sealers: An SEM study. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 15(3), 261

Siqueira, J. F., Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International endodontic journal*, 32(5), 361-369.

Siqueira, J. F., Favieri, A., Gahyva, S. M., Moraes, S. R., Lima, K. C., Lopes, H. P. (2000). Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *Journal of endodontics*, 26(5), 274-277

Slutzky-Goldberg, I., Slutzky, H., Solomonov, M., Moshonov, J., Weiss, E. I., Matalon, S. (2008). Antibacterial properties of four endodontic sealers. *Journal of endodontics*, 34(6), 735-738

Soares I J, Goldberg F. (2003). *Endodoncia, técnicas y fundamentos*. Es. 1º Ed. Panamericana: Buenos Aires.

Sönmez, I. S., Oba, A. A., Sönmez, D., Almaz, M. E. (2012). In vitro evaluation of apical microleakage of a new MTA-based sealer. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 13(5), 252-255

Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., Gronthos, S., Wang, C.Y., Wang, S., Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one*, 1(1), e79.

Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., Huang, G. T. J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*, 34(2), 166-171.

Sousa, C. J., Montes, C. R., Pascon, E. A., Loyola, A. M., Versiani, M. A. (2006). Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *Journal of Endodontics*, 32(7), 656-662

Souza, E. T. G., Nunes Tameirão, M. D., Roter, J. M., Assis, J. T., Almeida Neves, A., De-Deus, G. A. (2013). Tridimensional quantitative porosity characterization of three set calcium silicate-based repair cements for endodontic use. *Microscopy research and technique*, 76(10), 1093-1098

Spangberg LSW. (2002) Instruments, materials, and devices. In: Cohen S, Burns RC, ed. Pathways of the pulp. 8th ed. St. Louis: Mosby; p. 521-72.

Sun, H. H., Chen, B., Zhu, Q. L., Kong, H., Li, Q. H., Gao, L. N., Xiao, M., Chen F.M., Yu, Q. (2014). Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials*, 35(35), 9459-9472.

Tai, K. W., Huang, F. M., Chang, Y. C. (2001). Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *Journal of endodontics*, 27(9), 571-573.

Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676

Tanalp, J., Dikbas, I., Malkondu, Ö., Ersev, H., Güngör, T., Bayırlı, G. (2012). Comparison of the fracture resistance of simulated immature permanent teeth using various canal filling materials and fiber posts. *Dental Traumatology*, 28(6), 457-464.

Tanomaru-Filho, M., Tanomaru, J. M., Barros, D. B., Watanabe, E., Ito, I. Y. (2007). In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *Journal of oral science*, 49(1), 41-45.

Tay, F. R., Pashley, D. H. (2007). Monoblocks in root canals: a hypothetical or a tangible goal. *Journal of endodontics*, 33(4), 391-398.

Tedesco, M., Felipe, M. C. S., Felipe, W. T., Alves, A. M. H., Bortoluzzi, E. A., Teixeira, C. S. (2014). Adhesive interface and bond strength of endodontic sealers to root canal dentine after immersion in phosphate-buffered saline. *Microscopy research and technique*, 77(12), 1015-1022

Timpawat, S., Amornchat, C., Trisuwan, W. R. (2001). Bacterial coronal leakage after obturation with three root canal sealers. *Journal of endodontics*, 27(1), 36-39.

Topçuoğlu, H. S., Demirbuga, S., Tuncay, Ö., Arslan, H., Kesim, B., Yaşa, B. (2014). The bond strength of endodontic sealers to root dentine exposed to different gutt-apercha solvents. *International endodontic journal*, 47(12), 1100-1106.

Torabinejad, M., Hong, C. U., Ford, T. P., Kettering, J. D. (1995). Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of endodontics*, 21(10), 489-492.

Tronstad, L., Wennberg, A. (1980). In vitro assessment of the toxicity of filling.

Trope, M., Bunes, A., Debelian, G. (2015). Root filling materials and techniques: bioceramics a new hope?. *Endodontic Topics*, 32(1), 86-96.

Tsukada, G., Tanaka, T., Torii, M., Inoue, K. (2004). Shear modulus and thermal properties of gutta percha for root canal filling. *Journal of oral rehabilitation*, 31(11), 1139-1144.

Uzunoglu, E., Yilmaz, Z., Sungur, D. D., Altundasar, E. (2015). Retreatability of Root Canals Obturated Using Gutta-Percha with Bioceramic, MTA and Resin-Based Sealers. *Iranian endodontic journal*, 10(2), 93

Veljović, D., Čolić, M., Kojić, V., Bogdanović, G., Kojić, Z., Banjac, A., Palcevskis, E., Pretovic, R., Janačković, D. (2012). The effect of grain size on the biocompatibility, cell-materials interface, and mechanical properties of microwave-sintered bioceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(11), 3059-3070.)

Viapiana, R., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M., Camilleri, J. (2014). Investigation of the effect of sealer use on the heat generated at the external root surface during root canal obturation using warm vertical compaction technique with System B heat source. *Journal of endodontics*, 40(4), 555-561.)

Viapiana, R., Baluci, C. A., Tanomaru-Filho, M., Camilleri, J. (2015). Investigation of chemical changes in sealers during application of the warm vertical compaction technique. *International endodontic journal*, 48(1), 16-27

Vicente-Gomez A. Obturación de los conductos radiculares. Es. Rodríguez-Ponce A. *Endodoncia. Consideraciones Actuales*. 1ª ed. Madrid: Amolca;2003. p. 189-206.

Vitti, R. P., Prati, C., Silva, E. J. N. L., Sinhoret, M. A. C., Zanchi, C. H., e Silva, M. G., Ogliri, F.A., Piva, E., Gandolfi, M. G. (2013). Physical properties of MTA Fillapex sealer. *Journal of endodontics*, 39(7), 915-918.

Wang, Y., Cheung, G. S. P., Xu, X., Zhao, S., Zhang, C. (2010). The effect of cultured autologous periodontal ligament cells on the healing of delayed autotransplanted dog's teeth. *Journal of endodontics*, 36(2), 264-267

Wang, Y., Yao, J., Yuan, M., Zhang, Z., Hu, W. (2013). Osteoblasts can induce dental pulp stem cells to undergo osteogenic differentiation. *Cytotechnology*, 65(2), 223-231.

Wang, Z. (2015). Bioceramic materials in endodontics. *Endodontic Topics*, 32(1), 3-30.

Wei, X., Ling, J., Wu, L., Liu, L., Xiao, Y. (2007). Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *Journal of endodontics*, 33(6), 703-708.

Weine F. Obturación de conductos con materiales semisólidos. Tratamiento endodóntico. 5ª Edición . Madrid: Mosby. 1995. p. 423-477.

Weinreb M, Nemcovsky CE (2015). In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000 68(1), 41-54.

Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 287(5457), 1442-1446.

Whitworth, J. M., Boursin, E. M. (2000). Dissolution of root canal sealer cements in volatile solvents. *International endodontic journal*, 33(1), 19-24

Widbiller, M., Lindner, S. R., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K. A., Schmalz, G., Galler, K. M. (2015). Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clinical oral investigations*, 1-10.

Willershausen, I., Wolf, T., Kasaj, A., Weyer, V., Willershausen, B., Marroquin, B. B. (2013). Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Archives of oral biology*, 58(9), 1232-1237.

Wu, B. C., Wei, C. K., Hsueh, N. S., Ding, S. J. (2015). Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*, 48(3), 268-276.

Xuereb, M., Vella, P., Damidot, D., Sammut, C. V., Camilleri, J. (2015). In Situ Assessment of the Setting of Tricalcium Silicate-based Sealers Using a Dentin Pressure Model. *Journal of endodontics*, 41(1), 111-124

Yamaza, T., Ren, G., Akiyama, K., Chen, C., Shi, Y., Shi, S. (2011). Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *Journal of dental research*, 90(3), 317-324

Yang, Z. H., Zhang, X. J., Dang, N. N., Ma, Z. F., Xu, L., Wu, J. J., Sun, Y.J., Duan, Y.J., Jin, Y. (2009). Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *Journal of periodontal research*, 44(2), 199-210.

Yang, H., Gao, L. N., An, Y., Hu, C. H., Jin, F., Zhou, J., Jin, Y., Chen, F. M. (2013). Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials*, 34(29), 7033-7047.

Yazid, F. B., Gnanasegaran, N., Kunasekaran, W., Govindasamy, V., Musa, S. (2014). Comparison of immunomodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clinical oral investigations*, 18(9), 2103-2112.

Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR (2013). In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz dent J* 24(2):111-116.

Zanini, M., Sautier, J. M., Berdal, A., Simon, S. (2012). Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *Journal of endodontics*, 38(9), 1220-1226.

Zhang, C., Chang, J., Sonoyama, W., Shi, S., Wang, C. Y. (2008). Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling. *Journal of dental research*, 87(3), 250-255.

Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., Haapasalo, M. (2009). Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 35(7), 1051-1055.

Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., Le, A. D. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 183(12), 7787-7798.

Zhang, W., Li, Z., Peng, B. (2010). Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *International endodontic journal*, 43(9), 769-774.

Zhang W, Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue engineering*, 12(10), 2813-2823.

Zhou, H. M., Du, T. F., Shen, Y., Wang, Z. J., Zheng, Y. F., Haapasalo, M. (2015). In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-containing Endodontic Sealers. *Journal of endodontics*, 41(1), 56-61.

Zhou, H. M., Shen, Y., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y. F., Haapasalo, M. (2013). Physical properties of 5 root canal sealers. *Journal of endodontics*, 39(10), 1281-1286

Zhu, L., Yang, J., Zhang, J., Peng, B. (2014). A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*, 40(8), 1118-1123.

Zoufan, K., Jiang, J., Komabayashi, T., Wang, Y. H., Safavi, K. E., Zhu, Q. (2011). Cytotoxicity evaluation of Gutta flow and endo sequence BC sealers. *Oral*



surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology, 112(5), 657-661.

Zmener, O., Lalis, R. M., Pameijer, C. H., Chaves, C., Kokubu, G., Grana, D. (2012). Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *Journal of endodontics*, 38(9), 1233-1238.