



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio *In Vitro* de la Citotoxicidad de Materiales
Biocerámicos Utilizados en Endodoncia sobre Células
Mesenquimales de Origen Dental**

D. Christopher Joseph Tomás Catalá

2019

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOTOXICIDAD DE MATERIALES BIOCERÁMICOS
UTILIZADOS EN ENDODONCIA SOBRE CÉLULAS MESENQUIMALES DE ORIGEN DENTAL**

Memoria presentada por
Christopher Joseph Tomás Catalá
Para optar al Grado de
Doctor en Odontología por la
Universidad de Murcia

TUTOR:

José María Moraleda Jiménez

DIRECTORES:

Francisco Javier Rodríguez Lozano

Adrián Lozano Alcañiz

Ricardo Elías Oñate Sánchez



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Javier Rodríguez Lozano, Doctor de Universidad del Área de ESTOMATOLOGÍA en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio in vitro de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental", realizada por D. Christopher Joseph Tomás Catalá, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de marzo de 2019



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Ricardo Elías Oñate Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Área de ESTOMATOLOGÍA en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio in vitro de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental", realizada por D. Christopher Joseph Tomás Catalá, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de marzo de 2019



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

Unitat Docent de Patologia i Terapèutica Dentàries

D. Adrián Lozano Alcañiz, Profesor del Máster de Endodoncia del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina i Odontología de la Universitat de València,

hace constar que,

la tesis doctoral titulada “Estudio *in vitro* de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental”, presentada por el licenciado en Odontología D. Christopher Joseph Tomás Catalá, ha sido realizada bajo mi dirección y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Lo que firmo a los efectos oportunos,

Prof. Dr. Adrián Lozano Alcañiz

Valencia, 28 de marzo de 2019

AGRADECIMIENTOS

Desde que este trabajo empezó a tomar forma, muchas han sido las personas que, de un modo u otro, han aportado su granito de arena al mismo. Quisiera expresar mi agradecimiento en unas líneas.

En primer lugar, a mi tutor Jose María Moraleda Jiménez, por tenderme la mano en este fantástico mundo de la investigación. A mis directores Ricardo Elías Oñate Sánchez, por las sabias palabras en todo momento y a Adrián Lozano Alcañiz, por las aportaciones siempre valiosas. A Francisco Javier Rodríguez Lozano, por concederme la oportunidad de empaparme de tu sabiduría y tu buen hacer, porque eres un ejemplo de persona y de investigador y sin duda alguna, una de las personas a las que más admiro. Nunca nadie me había ofrecido tanto. Todos mis logros tienen una parte de ti. Mil gracias de todo corazón.

A María del Mar Collado González por tu pasión, atención e infinita paciencia. Sin tus lecciones no podría haber llevado a término este trabajo. Te estoy eternamente agradecido.

Gracias a Irene Palazón Pérez y a David Martínez Alpañez por su amistad y apoyo siempre. Sois parte de mi familia. A mis profesores del máster de endodoncia, por iniciarme en este mundo intrigante del tratamiento de conductos.

A mis tíos Leonor Tomás Vercher, Josefa Catalá Miró, Jose Miguel Alemany Puig y Carlos Vidal; por creer siempre en mí y apoyarme en cada paso, y a mis primos Josie Vidal, John Vidal y Beatriz Alemany Tomás por su apoyo y sus palabras de ánimo incondicionales. A mi abuela Leonor en especial, que me guarda y me acompaña siempre, porque su luz y su ímpetu viajan en cada una de nuestras generaciones.

Muy especialmente quisiera dedicar este trabajo a mis padres José Tomás Vercher y Pilar Catalá Miró por su infinita paciencia, por apoyarme siempre con amor en mis aspiraciones, por transmitirme la perseverancia para superar cualquier dificultad y por ser la brújula de mis mejores decisiones. Siempre habéis sido y sois mi fuerza en los momentos importantes. Os quiero.

FINANCIACIÓN

Trabajo financiado por la Red Española de Terapia Celular (TerCel) otorgada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) (RD07/0010/2012 y RD12/0019/0001) y el Programa Conjunto para la Investigación Biomédica en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa del ISCiii y la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS).

ÍNDICE

Resumen.	i
Summary.	ii
Palabras clave y abreviaturas.	iii
I – INTRODUCCIÓN.	1
1. Objetivos de la obturación del sistema de conductos.	2
2. Técnicas de obturación ortógrada del sistema de conductos.	4
1. Técnicas de obturación con materiales distintos a la gutapercha.	5
1.1. Obturación con Resorcinol-Formaldehído.	5
1.2. Obturación con Conos de Plata.	5
1.3. Obturación con Resilón.	6
2. Técnica de obturación con materiales distintos a la gutapercha.	7
2.1. Técnicas de obturación en frío.	7
2.1.1. Técnicas con gutapercha reblandecida.	7
2.1.2. Técnica de la condensación lateral.	7
2.1.3. Técnica de cono único.	9
2.2. Técnicas de obturación en caliente.	9
2.2.1. Técnica de la condensación vertical.	9
2.2.2. Técnica de termocompactación.	11
2.2.3. Técnicas termoplásticas.	12
2.2.3.1. Técnica con transportadores.	12
2.2.3.2. Técnica de la ola continua.	13

3. Cementos selladores endodónticos.	15
3.1. Cementos a base de óxido de zinc-eugenol.	18
3.2. Cementos a base de hidróxido de calcio.....	19
3.3. Cementos a base de resina epoxy.	20
3.4. Cementos a base de resina- metacrilato.	23
3.5. Cementos a base de silicona.	24
3.6. Cementos a base de MTA.	27
3.7. Cementos a base de fosfato y silicato tricálcico.	29
4. Tejido pulpar y tejidos periapicales.	31
4.1. Fundamentos de los procesos de reparación tisular.	33
4.2. Reacción de los tejidos periapicales ante la extrusión de cementos endodónticos.	34
5. Células madre o “stem cells”.	38
5.1. Células madre mesenquimales.	39
5.2. Células madre mesenquimales de origen dental.	41
6. Pruebas de citotoxicidad para cementos endodónticos.	47
II – JUSTIFICACIÓN.	51
III – OBJETIVOS.	53
IV - MATERIAL Y MÉTODOS.	55
1. AISLAMIENTO CELULAR.	56
1.1 Extracción de ligamento periodontal.	58
1.2 Disgregación mecánica y enzimática.	59
1.3 Identificación celular mediante inmunocitofluorescencia.	60
1.4 Separación, recuento y sembrado de células.	61

2. ENSAYOS EXPERIMENTALES.	63
2.1 Preparación de los extractos.	65
2.2 Ensayo de viabilidad celular MTT.	66
2.3 Ensayo de migración celular.	68
2.4 Ensayos de pH, osmolaridad e ICP-MS.	70
2.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB).	72
2.5.1 Morfología celular y adhesión a los cementos (MEB).	74
2.5.2 Caracterización de los cementos (MEB EDX).	75
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	77
V – RESULTADOS.	78
1. AISLAMIENTO CELULAR.	79
1.1 Identificación celular mediante inmunocitofluorescencia.	80
2. ENSAYOS EXPERIMENTALES.	81
2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT.	81
2.2 Ensayo de migración celular.	87
2.3 Ensayos de pH, osmolaridad e ICP-MS.	93
2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB).	94
2.4.1 Morfología celular y adhesión a los cementos (MEB).	94
2.4.2 Espectrometría dispersiva de rayos X (MEB EDX).	97
VI – DISCUSIÓN.	99
1. Sobre la metodología.	100
2. Sobre la línea celular y su identificación.	101
3. Sobre los materiales y su caracterización.	102
4. Sobre el ensayo de viabilidad celular y citotoxicidad.	104

5. Sobre el ensayo de migración celular.	111
6. Sobre los ensayos de pH, osmolaridad e ICP-MS.	112
7. Sobre la morfología y adhesión celular.	114
VII – CONCLUSIONES.	116
VIII – BIBLIOGRAFÍA.	118
IX – ANEXOS.	134
1. Listado de tablas y figuras.	135
2. Hoja explicativa y consentimiento informado.	140
3. Certificado de aprobación del comité ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.	144
4. Certificado de formación y competencia para la manipulación de células de origen animal.	145
5. Certificado de presentación de póster en las III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.	146
6. Certificado de presentación de ponencia de investigación en las Jornadas “Viernes Endodónico” organizadas por la Universitat de València.	147
7. Certificado de presentación de comunicación oral en la FDI World Dental Congress 2017.	148
8. Artículo de investigación publicado en el Journal of Endodontics.	149
9. Artículo de investigación publicado en el International Endodontic Journal.	150
10. Artículo de investigación publicado en el Journal of Endodontics.	151
11. Artículo de investigación publicado en Dental Materials.	152
12. Artículo de investigación publicado en Nature/Scientific Reports.	153

RESUMEN

Dentro de las técnicas de obturación de los conductos radiculares en endodoncia, las técnicas más utilizadas incluyen un material semirrígido central, normalmente gutapercha, y un cemento sellador. Estos materiales quedan confinados en el interior del conducto y en íntimo contacto con los tejidos periapicales e incluso en ocasiones, se produce su extrusión hacia dichos tejidos. Debido a esta situación, necesitamos utilizar materiales que respeten dichos tejidos y favorezcan la curación y regeneración de los tejidos dañados. Desde la aparición en los años 90 del agregado de trióxido mineral, muchos han sido los intentos de combinar este mineral tricálcico con materiales ya utilizados para sellar los conductos. Es por ello que resulta de interés para la comunidad científica el estudio de materiales de reciente comercialización en el mercado cuyas propiedades biológicas no han sido evaluadas.

El objetivo del presente estudio es evaluar de manera *in vitro* la citotoxicidad de los cementos selladores biocerámicos utilizados en endodoncia GuttaFlow Bioseal®, GuttaFlow 2®, MTA Fillapex® en contacto con células madre del ligamento periodontal humano (hPDLSCs) tomando AH Plus®, ya estudiado, como cemento de referencia.

A partir de células obtenidas del ligamento periodontal de dientes humanos exodonciados, se pudieron aislar y sembrar hPDLSCs. Dichas células madre fueron identificadas mediante técnicas de marcaje inmunocitoquímico. Los test biológicos se llevaron a cabo de manera *in vitro*. Se realizó un ensayo de viabilidad celular y de migración utilizando diluciones de cada cemento. Para estudiar la morfología y adhesión de las hPDLSCs en contacto con los diferentes cementos, se sembraron las células directamente en la superficie de discos de los distintos cementos y se observaron mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB). Los cementos utilizados se caracterizaron con el microscopio electrónico de barrido y la técnica de energía de dispersión de rayos X (MEB EDX). A su vez se estudiaron los eluatos de los cementos mediante espectrometría de masas con Plasma acoplado Inductivamente (ICP-MS) y se midió el pH y la osmolaridad.

SUMMARY

Among the root canal filling techniques known in endodontics, the most commonly used techniques include a semirigid core material, normally gutta-percha, and a sealant cement. These materials are confined inside the root canal, in intimate contact with the periapical tissues and even occasionally, extrusion occurs to said tissues. Due to this situation, we need to use materials that respect these tissues and favor the healing and regeneration of the damaged tissues. Since the appearance of the mineral trioxide aggregate in the 1990s, many attempts have been made to combine this tricalcium mineral with materials already used to seal the root canals. That is why it is of interest for the scientific community to study materials recently commercialized and that have not yet proven their biological properties have not been evaluated.

The aim of the present study is to evaluate *in vitro* the cytotoxicity of bioceramic sealant cements used in endodontics GuttaFlow Bioseal®, GuttaFlow 2® and MTA Fillapex® in contact with human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs), taking AH Plus® as reference sealer already studied.

From cells obtained from the periodontal ligament of human teeth, hPDLSCs could be isolated and seeded. Said stem cells were identified by immunocytochemical labeling techniques. The biological tests were carried out *in vitro*. A cell viability and migration assays were performed using eluates of each cement. To study the morphology and adhesion of the hPDLSCs in contact with the different cements, the cells were seeded directly on the disc surface of the different cements and were observed by scanning electron microscopy (SEM). The cements used were characterized with the scanning electron microscope and the X-ray scattering energy technique (MEB EDX). In turn, the eluates of the cements were studied by mass spectrometry with Inductively Coupled Plasma (ICP-MS) and the pH and osmolarity were measured.

PALABRAS CLAVE: Adhesión, cementos endodónticos, biocerámico, citotoxicidad, agregado de trióxido mineral, células madre de ligamento periodontal.

ABREVIATURAS

BMSCs	Célula madre de médula ósea.
CD	Cluster of differentiation.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DFSCs	Células madre de folículo dental.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DPSCs	Células madre de pulpa dental.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
EDX	Técnica de energía de dispersión de rayos X.
HBSS	Solución salina balanceada de Hank.
hES	Célula madre embrionaria humana.
hPDL	Células del ligamento periodontal humano.
hPDLSCs	Células madre del ligamento periodontal humano.
HR	Humedad relativa.
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.
iPS	Célula madre pluripotente inducida.
MEB	Microscopio electrónico de barrido.
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle.
MSCs	Células madre mesenquimales adultas
MTA	Agregado de trióxido mineral.
MTT	Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico.
PBS	Tampón fosfato salino.
PDLSCs	Células madre de ligamento periodontal.
RF	Rojo fenol.
SBF	Suero bovino fetal.
SC	Stem cell / Célula madre.
SCAP	Células madre de papila apical.
SGSCs	Células madre derivadas de glándula salival.
SHED	Células madre de diente deciduo exfoliado.
TGPCs	Células madre de germen dental.

I –INTRODUCCIÓN

1. OBJETIVOS DE LA OBTURACIÓN DEL SISTEMA DE CONDUCTOS

La periodontitis apical es esencialmente una infección del sistema de conductos radiculares, causada por bacterias organizadas en un biofilm. Debido a ello, el tratamiento lógico consiste en eliminar la causa de la infección y la futura reinfección del mismo. Tras entender la etiopatogenia de la infección, el enfoque clínico debe consistir en el manejo de los problemas derivados de ésta y su eliminación (1, 2).

Mediante la instrumentación mecánica de los conductos conseguimos reducir considerablemente el número de bacterias. Además, es imprescindible una desinfección química con un irrigante que sea capaz de eliminar bacterias, desestabilizar el biofilm y llegar a los espacios a los que no podemos acceder con la instrumentación y conformación del conducto (3-5). La limpieza química adecuada del conducto aumenta en un 26% el éxito del tratamiento en el momento de la obturación (6). En algunos casos, después de la instrumentación, es necesario dejar medicación intraconducto para poder reducir al máximo el número de bacterias(7, 8), que resulta ineficaz sin la adecuada limpieza químico-mecánica (9).

Debido a la gran complejidad anatómica de la configuración del sistema de conductos radiculares y a la organización de la flora bacteriana en biofilms, es muy improbable que se pueda conseguir un canal radicular libre completamente de bacterias con las técnicas actuales de preparación y limpieza. A pesar de ello, es de relevante importancia, la aplicación de medidas químico-mecánicas no antibióticas para intentar romper el biofilm y reducir la microbiota intracanal hasta los niveles más bajos posibles para asegurar el pronóstico más favorable del tratamiento de conductos(10, 11).

Para lograr estos objetivos, los materiales utilizados para la obturación del conducto deben ser biocompatibles, dimensionalmente estables, tener capacidad de sellado, no verse alterados por fluidos tisulares, ser insolubles, no favorecer el crecimiento bacteriano, ser radiopacos y fácilmente removidos en caso de retratamiento(12). La principal función de los materiales de obturación es prevenir la invasión de bacterias y la infección del sistema de conductos radiculares tras la limpieza y desinfección del

mismo. Esto se consigue con un sellado permanente hermético que no deje espacios para la colonización de bacterias(13, 14).

Un conducto radicular conformado y limpio es un espacio en el que las bacterias no pueden crecer ni reproducirse. Los materiales de obturación deben ser bactericidas o bacteriostáticos y además con el correcto sellado, crear un ambiente desfavorable para el crecimiento y multiplicación bacteriana(15). La calidad de la obturación del sistema de conductos está directamente relacionada con el éxito del tratamiento endodóntico (16, 17) ya que contribuye a la curación de los tejidos periapicales al no permitir el crecimiento bacteriano (2, 18). La correcta obturación del sistema de conductos se relaciona con la eliminación de hasta un 87% de la periodontitis apical desde un punto de vista radiográfico(19).

El momento ideal para realizar la obturación del conducto radicular es tras el proceso de saneamiento, limpieza y preparación del sistema de conductos. A estos aspectos hay que agregarle la obligatoriedad de que el conducto esté seco y asintomático(20).

El objetivo final de las técnicas endodónticas debe ser la obturación en tres dimensiones además de la desinfección del sistema de conductos(21).

La Sociedad Europea de Endodoncia determina que los objetivos de la obturación de los conductos son: prevenir el flujo de microorganismos y fluidos a lo largo de los conductos radiculares, y sella el sistema de conductos en su totalidad, no solo el foramen apical sino también los túbulos dentinarios y los conductos accesorios(12).

Además de la importancia de la obturación de los conductos, una restauración coronal adecuada influye en el éxito de la obturación de conductos (17, 22).

Por tanto, los objetivos de la obturación del sistema de conductos radiculares son:

1. Prevenir el paso de microorganismos y fluidos a través del conducto radicular.
2. Impedir que las bacterias remanentes puedan alimentarse y crecer.
3. Sellar de manera hermética todo el sistema de conductos, tanto a nivel apical como de los túbulos dentinarios y los conductos accesorios.
4. Permitir la curación de los tejidos periapicales.

2. TÉCNICAS DE OBTURACIÓN ORTÓGRADA DEL SISTEMA DE CONDUCTOS

A lo largo de las últimas cuatro décadas, se han analizado las distintas técnicas y a su vez han surgido otras nuevas con el objetivo de suplir las deficiencias de técnicas anteriores. En los años 70, ya se empezaban a cuestionar la evidencia científica de las técnicas utilizadas en ese momento(23).

Para obturar el sistema de conductos, se han ido desarrollando diversas técnicas con distintos materiales como pastas, cementos y materiales de relleno sólidos como la gutapercha. Estos se han utilizado como material único o combinándose entre ellos (24).

En la actualidad, las técnicas más aceptadas para conseguir un sellado tridimensional adecuado del sistema de conductos se componen de gutapercha, como material principal central semisólido, en combinación con un cemento sellador(25, 26).

Las distintas técnicas de obturación podemos clasificarlas según los siguientes criterios:

1. Técnicas de obturación con materiales distintos a la gutapercha.
 - 1.1. Obturación con Resorcinol-Formaldehido o “Russian Red”.
 - 1.2. Obturación con Conos de Plata.
 - 1.3. Obturación con Resilón.
2. Técnicas de obturación que utilizan gutapercha como material principal.
 - 2.1. Técnicas de obturación en frío.
 - 2.1.1. Técnicas con gutapercha reblandecida.
 - 2.1.2. Técnica de la condensación lateral.
 - 2.1.3. Técnica de cono único.
 - 2.2. Técnicas de obturación en caliente.
 - 2.2.1. Técnica de la condensación vertical.
 - 2.2.2. Técnica de termo-compactación.
 - 2.2.3. Técnicas termoplásticas.
 - 2.2.3.1. Técnicas con transportadores.

2.2.3.2. Técnica de la ola continua.

1. Técnicas de obturación con materiales distintos a la gutapercha.

1.1. Obturación con Resorcinol-Formaldehído o “Russian Red”.

El material resinoso conocido como “Russian Red” es una combinación de un polvo blanco-cristalino llamado resorcinol, y una pasta a base de formaldehído. Esta resina es citotóxica, no radiopaca y causa modificaciones de color en las estructuras dentales, quedando el diente teñido de un color marrón-rojizo oscuro. Esta resina puede quedar reblandecida o endurecerse completamente, dependiendo de la eficacia del proceso de catalización(27).

Esta resina se introduce en el conducto radicular con limas o puntas de papel para rellenar todo el conducto. Es inestable y pueden quedar partes sin catalizar. Es una técnica originada en China a principios de los años setenta, muy utilizada en Países del Este y popular en la República Checa (28).

Una de las dificultades de esta técnica es su retratamiento, ya que la resina se introduce en los túbulos dentinarios y no se consigue retirar por completo la pasta, quedando el diente teñido de ese color rojizo pardocaracterístico. Su estructura no se consigue reblandecer ni con cloroformo ni con Endosolv-R®. El hipoclorito es la única sustancia que consigue reblandecer parcialmente este material, siendo necesaria la acción mecánica de las limas rotatorias para su retirada (29).

1.2. Obturación con Conos de Plata.

Los conos de plata fueron introducidos por Jasper en 1941 como material de obturación en endodoncia. Esta técnica se utilizó ampliamente por la facilidad de introducir los conos de plata ligeramente flexibles (30).

Los conos de plata son inertes, dimensionalmente estables y no pueden ser reabsorbidos. Idealmente los conos de plata debían pasar sin obstáculos por el tercio coronal y medio, y adaptarse a nivel apical, pero esto no ocurría siempre

debido a su falta de plasticidad. Con el tiempo se ha visto que el material se corroe y es tóxico para los tejidos periapicales (31).

En 2013 la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) publicó un comunicado sobre el uso de puntas de plata en el que textualmente reza “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”(32).

1.3. Obturación con Resilón.

El sistema consta de 3 partes: Un material principal de obturación termoplástico sintético con una estructura polimérica (Resilón®), un cemento a base de resina que forma una unión con la pared dentinaria y el material central de Resilón® mediante unión química al polimerizar (cemento Epiphany®), y un tercer agente que prepara el conducto para recibir al material central y el cemento (“Primer”). La textura y manejo del Resilón son similares a los de la gutapercha, llegándose a llamar como “resin-percha”. Su aplicación conjunta en el conducto forma un sellado tridimensional en forma de “mono-block”(33).

Este sistema se presenta como una alternativa eficaz a la gutapercha ya que es biocompatible, tiene buen sellado, buena adhesión, tiene propiedades antibacterianas (34) y es capaz de sellar conductos laterales (35, 36).

A pesar de las prometedoras propiedades del sistema, en términos de adhesión parece que la gutapercha es superior al Resilón®, en contraposición al sellado donde parece que Resilón® da mejores resultados que la gutapercha. Sin embargo, debido a que no presenta excesivas ventajas sobre la gutapercha, este sistema en la actualidad, no ha sustituido a los sistemas tradicionales basados en la gutapercha (37).

2. Técnicas de obturación que utilizan gutapercha como material principal.

2.1. Técnicas de obturación en frío.

2.1.1. Técnicas con gutapercha reblandecida.

Existen diversos materiales capaces de disolver la gutapercha tales como cloroformo, aceite de eucalipto y xylol. A partir de este principio se crearon técnicas que utilizaban dichos solventes (21):

- Cloroformo y gutapercha: en ella se utiliza el cloroformo para reblandecer el cono principal de gutapercha y adaptar principalmente los mm apicales de la gutapercha al tercio apical del conducto. Posteriormente se introducen más conos de gutapercha condensándolos lateralmente.
- Técnica de difusión de Callahan-Johnson: las paredes del conducto radicular se impregnan con alcohol etílico al 95% y se secan con puntas de papel. Se introduce la solución de cloro-colofonio junto con el cono principal y conos accesorios.
- Técnica de Nygaard-Ostby: es una variación de la técnica anterior en la que se utiliza kloropercha N-O (mezcla de polvo de gutapercha blanca, bálsamo de Canadá, colofonio y óxido de zinc con cloroformo) que se mezcla con una espátula para preparar la pasta que se utiliza conjuntamente con el cono principal.

Los solventes al ser sustancias volátiles, se evaporan rápidamente provocando una contracción progresiva de la gutapercha a medida que el solvente se va evaporando (20).

2.1.2. Técnica de la condensación lateral

En la técnica de condensación lateral, se selecciona el cono principal de gutapercha a conicidad y calibre lo más adecuado posible a la forma y longitud del

conducto, y confirmado radiográficamente. El cono se embadurna de cemento y se introduce en el conducto radicular previamente seco. Este cono se condensa lateralmente con espaciadores y se sigue rellenando el conducto con conos de gutapercha de menor calibre (Figura 1) hasta conseguir una densidad lo más homogénea posible en todo el conducto (21, 38).

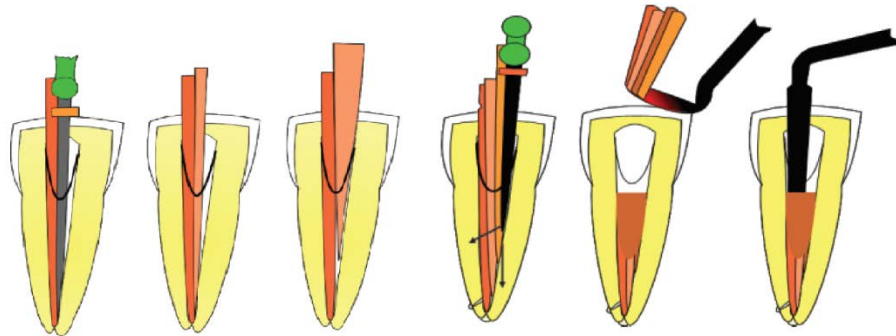


Figura 1. Técnica de la condensación lateral en frío (15)

Dentro de las ventajas de esta técnica encontramos una estabilidad dimensional dentro del conducto y menor riesgo de llevar material hacia los tejidos periapicales. Como desventajas encontramos que la masa que rellena el conducto no es totalmente homogénea, ya que existen muchos espacios solo ocupados por cemento (21, 38).

La compactación lateral ofrece la ventaja del control de la colocación de la gutapercha en el conducto, pero a su vez presenta ciertas desventajas: el tiempo requerido para obturar es alto, no se consigue una condensación totalmente homogénea al dejar espacios entre los conos, ofrece una pobre adaptación de los conos a las paredes del conducto y se pueden inducir fracturas verticales (39)(40).

La obturación resulta en una masa fría no uniforme de conos de gutapercha tanto en tercio coronal, medio y apical sin reproducir totalmente la anatomía del canal radicular (41).

A pesar de ello, ésta técnica ha sido y sigue siendo utilizada por muchos dentistas obteniendo altas tasas de éxito en el tratamiento de conductos, ya que se ha visto que la calidad, el éxito a largo plazo y la prevalencia de dolor post-operatorio son

similares entre la técnica de condensación lateral y las técnicas termoplásticas (42).

2.1.3. Técnica de cono único.

Desde la introducción de cementos como GutaFlow®(43), la técnica del cono único y la formación de un monoblock al obturar el sistema de conductos ha sido planteada y cuestionada (44).

Ésta es una técnica en frío que se basa en un solo cono de gutapercha y un cemento capaz de obturar el conducto principal y el entramado de conductos accesorios, dando lugar a un sellado tridimensional del sistema de conductos sin necesidad de utilizar un espaciador para añadir puntas accesorias de gutapercha. El cono maestro coincide en diámetro apical y en conicidad con el último instrumento rotatorio utilizado en la conformación del conducto. Primero se introduce cemento inyectado y posteriormente se introduce el cono de gutapercha que comprime el cemento hacia las paredes del conducto y conductos laterales (44, 45).

Con esta técnica se reduce el consumo de tiempo y asegura unos resultados similares a técnicas como la condensación lateral o la condensación vertical (45).

2.2. Técnicas de obturación en caliente.

2.2.1. Técnica de la condensación vertical.

La técnica de la condensación vertical o técnica de Schilder se hizo muy popular desde su publicación en 1967. Después de introducir el cemento endodóntico, se coloca el cono principal a la longitud de trabajo. Se corta la parte coronal del cono con un instrumento calentado. Con un condensador vertical se condensa el cono en dirección apical. Con espaciadores calentados (*“heat carriers”*) se sigue cortando el cono y compactando con un condensador vertical en frío sucesivamente hasta quedar 4mm aproximadamente de gutapercha en el tercio

apical (maniobra conocida como “*down-packing*”). Esta técnica es muy sensible al operador y supone un consumo de tiempo muy prolongado(21).

La condensación vertical en caliente (Figura 2) puede aumentar la densidad de la masa de gutapercha y su homogeneidad respecto a las técnicas en frío. Esta técnica ha demostrado ser capaz de rellenar las irregularidades del canal radicular (42).

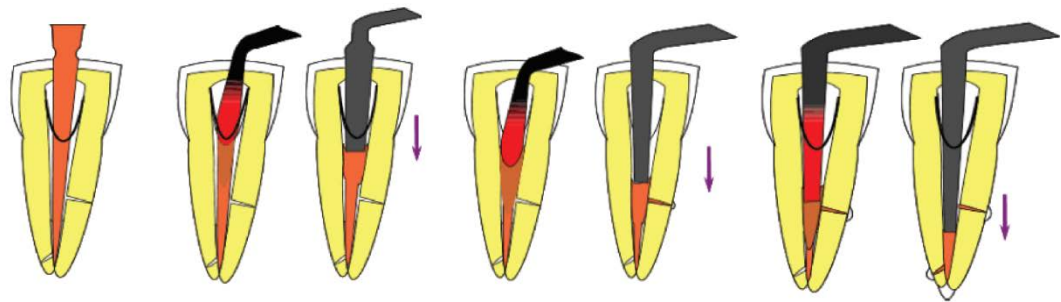


Figura 2. Técnica de la condensación vertical en caliente (15).

La técnica de compactación vertical hace posible una obturación homogénea del conducto, aunque aumenta la incidencia de extrusión de gutapercha a los tejidos periapicales y puede consumir mucho tiempo. Es una técnica muy laboriosa y que requiere de una enorme cantidad de tiempo, además de varias oleadas de calor, para conseguir sellar el tercio apical, medio, coronal y los canales accesorios(39).

Se ha descrito un aumento del 10% del éxito en la curación de dientes utilizando la técnica caliente versus la técnica en frío. Al aumentar la densidad de la gutapercha con las técnicas termoplásticas, conseguimos menos espacios sin rellenar y un mejor sellado apical y coronal. Un conducto con mayor espacio ocupado por la gutapercha dejará menos espacios para el cemento. La gutapercha al ser un polímero de poliisopreno es más resistente a la degradación hidrolítica que algunos cementos con óxido de zinc-eugenol o los a base de calcio (41).

La fuerza de compactación en la técnica de compactación vertical con gutapercha caliente resulta en una técnica dificultosa y compleja a la hora de precisar tanto la fuerza que se aplica como el tiempo real de calentamiento. Existe un posible error

en la adaptación del cono al conducto, sugiriendo que la resistencia o “tug- back” probablemente sea la sensación obtenida por el tercio medio y coronal del cono al chocar contra las paredes, y no en el último milímetro apical (46).

Al comparar la técnica tradicional de condensación lateral con la condensación vertical, radiográficamente se aprecian casi el doble de conductos laterales obturados más con ésta última que con la primera. La condensación de la gutapercha es más densa con la técnica vertical, pero si analizamos por tercios ambas técnicas, la técnica vertical sella mejor el tercio coronal; el tercio medio y apical se sella prácticamente igual con ambas técnicas (47).

2.2.2. Técnica de termocompactación.

Técnica de McSpadden: A partir de un instrumento rotatorio que simula una lima hedström invertida, la gutapercha se plastifica y se compacta hacia el ápice. De esta manera el instrumento empuja el cemento y la gutapercha hacia el ápice y sus ramificaciones. El compactador rotatorio simula el calibre del instrumento rotatorio utilizado en la instrumentación y se acciona en sentido contrario a las agujas del reloj(48).

Técnica híbrida de Tagger: Introducida por Tagger en 1984, es una modificación de la técnica de McSpadden. En primer lugar, se realiza una condensación lateral hasta que el tercio apical quede repleto de conos accesorios. Con un compactador de McSpadden, dos calibres por encima del calibre del cono principal, se termocompacta la gutapercha hasta 3-4mm de la longitud de trabajo, quedando el tercio apical y las paredes selladas. El resto de conducto se rellena con condensación vertical en frío(20).

2.2.3. Técnicas termoplásticas

Estas técnicas se basan en reblandecer la gutapercha mediante calor para aumentar el sellado y la densidad de la obturación del sistema de conductos, siendo más eficaces en la reproducción de la anatomía y sellado de conductos (15, 49, 50). En contraposición, aumenta la incidencia de extrusión de material de obturación a los tejidos periapicales y la posible afectación de la fisiología de los mismos (40, 51, 52) con respecto a las técnicas en frío.

2.2.3.1. Técnica con transportadores.

En 1978, Johnson introdujo una técnica de obturación basada en una lima recubierta con gutapercha alfa, que calentándola sellaba el conducto radicular, y que posteriormente la lima se retiraba o rompía(53). La técnica evolucionó y se empezaron a utilizar vástagos de plástico recubiertos con gutapercha denominándose Thermafil Plus®, dando una mejor densidad y adaptación de la gutapercha que con la técnica de condensación lateral en frío (54, 55).

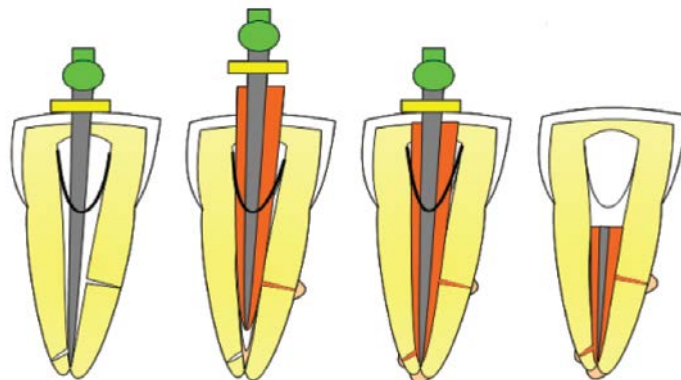


Figura 3. Técnica de obturación con transportadores(15).

Esta técnica ofrece un sellado y una adaptación superior que la técnica híbrida de Tagger y que la condensación lateral, en este orden (56). Está indicada para

conductos largos, curvos y estrechos es muy sensible a la mano del operador (15), con el inconveniente de tener poco control sobre la obturación a nivel apical y dando lugar a mayor incidencia de extrusión apical (57).

Una de las dificultades que presenta esta técnica es su retratamiento (58), ante lo que recientemente ha evolucionado a sistemas con un vástago central de entramado de gutapercha no plastificable recubierto de gutapercha alfa. EL vástago central no se ve alterado por la temperatura del proceso de termoplastificación. Tanto GuttaCore® (Dentsply Tulsa Dental Specialities, Tulsa) como GuttaFusion® (VDW, Munich, Alemania) son dos sistemas que utiliza esta estructura en el material de obturación (59). Ambos sistemas obtienen una adaptación apical similar a la técnica de condensación vertical con calor (60, 61) y son más fáciles de retirar del conducto (62).

2.2.3.2. Técnica de la onda continua.

Técnica descrita por el Dr. L. Stephen Buchanan en 1989 en la que intenta simplificar la obturación en tres dimensiones combinando los pluggers de Schilder y el transportador de calor eléctrico de Masreilez. El objetivo de esta técnica es reducir el tiempo de trabajo de la técnica de Schilder manteniendo el mismo fundamento (Figura 4) de la obturación en tres dimensiones (63).

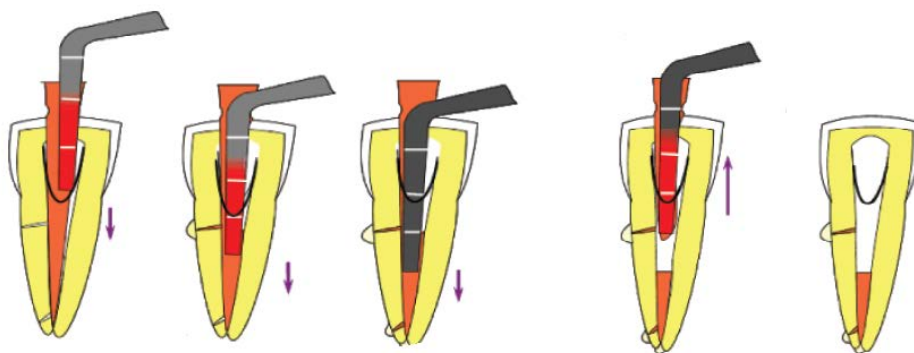


Figura 4. Técnica de la onda continua “ down-packing”(15).

Esta técnica utiliza una cantidad pequeña de cemento junto con un cono de gutapercha del calibre hasta el que se ha conformado el conducto. Se utiliza un transportador de calor eléctrico con diversas conicidades para realizar la primera fase de “downpack”. Esta primera fase la podemos llevar a cabo con el sistema System B®(SybronEndo, Orange, CA, USA) o con el Touch’N Heat®(SybronEndo, Orange, CA, USA), resultando el último más dañino para el periodonto (64). El transportador proporcionará una temperatura de unos 200°C a la gutapercha a la vez que se compacta de forma manual unos 4 segundos hasta sellar los últimos 3-4mm. A continuación, tras enfriarse la punta, se calienta una vez más para retirar el transportador a la vez que la gutapercha por encima de los 3-4mm obturados. Posteriormente se compacta la gutapercha apical en frío con un atacador(65).

La segunda fase llamada “backfill” consiste en obturar el tercio medio y coronal con un sistema de gutapercha inyectada. Entre los sistemas de inyección encontramos el Sistema Obtura II®, Obtura III® – Calamus Dual (Dentsply Tulsa Dental Specialities, Tulsa) o el Extruder® (Kerr Corporation, Orange, CA, USA)(65).

Esta técnica resulta en un mejor control de la extrusión de material apical que sistemas de obturación con transportadores (66)y ofrece un mejor sellado que la condensación lateral (67) y una mejor reproducción de irregularidades en el conducto (68).

3. CEMENTOS SELLADORES EN ENDODONCIA.

Las técnicas más extendidas en cuanto a obturación combinan un cemento sellador con un núcleo central de material, que hasta el momento es la gutapercha. El material central empuja el cemento que llega a los huecos de la pared dentinaria que no han sido instrumentados. Es el cemento el que entra en contacto con los tejidos perirradiculares y ocasionalmente la gutapercha. El cemento debe poseer muchas de las propiedades críticas de un material de relleno como por ejemplo biocompatibilidad y capacidad selladora(69).

Los cementos selladores son un componente esencial dentro de los materiales de obturación ya que son los encargados de rellenar cualquier espacio entre el material principal de relleno y la dentina radicular. La gutapercha no se adhiere a la dentina por lo que debe ser utilizada junto a un cemento sellador que proporcione una unión entre el material central y el conducto radicular(69).

El cemento sellador es en parte responsable de las funciones principales de la obturación: sellar el sistema de conductos, contener los restos de bacterias remanentes y rellenar las irregularidades del canal, previamente preparado(70).

Grossman estableció las propiedades ideales de un cemento sellador endodóntico(71):

- 1- El cemento debe ser pegajoso cuando se mezcle y tener buena adhesión cuando fragüe, entre el mismo y la pared del conducto.
- 2- Debe crear un sellado hermético.
- 3- Debe ser radiopaco para poder ser visto en el roentgenograma.
- 4- Las partículas del polvo deben ser muy finas para que puedan mezclarse fácilmente con el líquido del cemento.
- 5- No debe contraerse durante la polimerización.
- 6- No debe manchar la estructura dentaria.
- 7- Debe ser bacteriostático o al menos no promover el crecimiento bacteriano.
- 8- Debe fraguar despacio.
- 9- Debe ser insoluble en los fluidos de los tejidos.

10- Debe ser biocompatible, no irritante de los tejidos.

11- Debe ser soluble a los solventes comunes en caso de ser necesaria su remoción del conducto.

Para asegurar la viabilidad de su uso a nivel clínico, los cementos son puestos a prueba en sus diferentes propiedades. Las pruebas más comunes a las que se someten los cementos son las siguientes(69):

- Fluidez
- Tiempo de trabajo
- Tiempo de fraguado
- Radiopacidad
- Solubilidad y desintegración
- Cambios dimensionales debido al fraguado
- Pruebas de biocompatibilidad y citotoxicidad
- Pruebas con animales
- Pruebas antibacterianas
- Neurotoxicidad
- Filtración
- Rigidez

Atendiendo a su composición básica, los cementos selladores utilizados en endodoncia podemos clasificarlos de la siguiente manera (Tabla 1): 1. Cementos a base de óxido de zinc-eugenol (OZE), 2. Cementos a base de fosfato cálcico, 3. Cementos a base de resina epoxy, 4. Cementos a base de resina metacrilato, 5. Cementos a base de silicona, 6. Cementos a base de Agregado de Trióxido Mineral (MTA) y 7. Cementos a base de fosfato y silicato tricálcico.

TIPOS DE CEMENTOS	NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE
1. Cementos a base de OZE	Proco-Sol® Kerr Pulp Canal Sealer® Tubliseal®	Proco-Sol Chemical Co. Kerr SybronEndo
2. Cementos a base de hidróxido de calcio	CRCS® Apexit® Sealapex® Acroseal®	The Hygenic Corp. Vivadent/Ivoclar Kerr/Sybron Septodont
3. Cementos a base de resina epoxy	Diaket® Top Seal® AH 26® AH Plus®	3M ESPE/Premier Dentsply/Maillefer DeTrey/Dentsply DeTrey/Dentsply
4. Cementos a base de resina metacrilato	1ª Generación: Hydron® 2ª Generación: Endorez®- Realseal® 3ª Generación: Epiphany® 4ª Generación: Realseal SE®- Metalseal SE®- Smartseal®	Hydron Technologies Ultradent Products SybronEndo Kerr/SybronEndo SybronEndo Kerr Dental
5. Cementos a base de silicona	Endo-fill® RoekoSeal® GuttaFlow®, GuttaFlow 2® GuttaFlow Bioseal®	Lee Pharmaceuticals Coltène/Wahaledent Coltène/Wahaledent Coltène/Wahaledent
6. Cementos a base de MTA	Endo-CPM® MTA Obtura® ProRoot Endo® MTA Fillapex®	EGEO S.R.L Angelus Odontológica Dentsply Tulsa Dental Angelus Odontológica
7. Cementos a base de fosfato y silicato tricálcico	Endosequence/iRoot SP® iRoot BP® Bioggregate® TotalFill®	Brasseler USA Brasseler USA Innovative BioCeramix KFG Dentaire

Tabla 1. Clasificación de cementos según su composición.

3.1. Cementos a base de óxido de zinc-eugenol.

Los cementos a base de OZE se presentan en formato polvo-líquido y su fraguado ocurre por la quelación entre el eugenol y los iones zinc, provenientes del óxido de zinc, que dan lugar al eugenolato de zinc(72).

Los primeros cementos selladores utilizados en endodoncia fueron los cementos de OZE con fórmulas modificadas, originales de Rickerty Grossman (72). En 1925, Rickert sugirió la necesidad de utilizar conos de gutapercha conjuntamente con un sellador. Este sellador es comercialmente conocido como Cemento de Kerr® o Kerr Pulp Canal Sealer® (Kerr Manufacturing Company, Romulus, Mich. EEUU) que parecía un cemento prometedor, pero teñía el tejido dentario debido a la plata que contenía como radiopacificador. (73).

Posteriormente y para suplir la deficiencia del Cemento de Rickert, Grossman propuso un cemento OZE que no producía manchas, conocido comercialmente como ProcoSol®(Proco-Sol Chemical Company, Inc., Philadelphia, Pa. EEUU)(74).

Tanto el cemento de Grossman como el de Rickert están formulados a base de polvo líquido, siendo eugenol el líquido en el primero y aceite de clavo con bálsamo de Canadá en el segundo. El componente fundamental del polvo es el óxido de zinc. Ambos cementos son citotóxicos tanto durante el fraguado como con el tiempo una vez endurecidos, siendo el de Grossman el más citotóxico de los dos (74).

Desde hace décadas, este tipo de cementos selladores se han utilizado junto a conos de gutapercha. Estos cementos ganaron popularidad por su plasticidad y su tiempo lento de fraguado, con potencial bactericida y pocos cambios volumétricos tras su fraguado(75). Sin embargo, el eugenolato de zinc se puede descomponer en presencia de agua, lo que conlleva una pérdida continua de eugenol y su consiguiente liberación hacia los tejidos, siendo así un material inestable y provocando una reacción inflamatoria de tejidos periapicales que retrasa la cicatrización de los mismos (76, 77).

Surgieron nuevas formulaciones para intentar reducir la toxicidad de los originales como Tubli-Seal®(SybronEndo, Glendora, CA 91740, USA), un cemento que no tiñe el tejido dentario y fragua muy rápidamente; pero se ha demostrado que, aunque en mayor o menor medida, siguen siendo tóxicos para los tejidos periapicales (78), además de interferir con la medicación intraconducto a base de hidróxido de calcio (79).

3.2. Cementos a base de hidróxido de calcio.

El hidróxido de calcio fue introducido en endodoncia en 1920 por Herman a razón de su capacidad para reparar la pulpa(80). Es un material utilizado principalmente en tratamiento de exposiciones pulpares directas, en algunas técnicas de apexificación, en perforaciones, en fracturas horizontales de raíz, en reabsorciones radicales, como medicación intraconducto en lesiones periapicales de gran tamaño y como componente principal en algunos cementos selladores endodónticos (81, 82).

Químicamente, el hidróxido de calcio se clasifica como una base fuerte con un pH elevado (aproximadamente de 12,5-12,8). Sus propiedades principales atribuidas derivan de la disociación iónica del ion Ca^{2+} y del ion OH^- (83), ejerciendo una acción antimicrobiana debido al elevado pH que confiere al medio en el que se deposita, pudiendo ser bacteriostático y bactericida; y un efecto reparador a nivel de tejidos vitales gracias a la activación de la fosfatasa alcalina y la adenosina trifosfato calcio-dependiente, enzimas con un papel fundamental en la formación y reparación de tejidos duros (81, 82).

Manhart en 1974 propuso el uso de un método estandarizado de obturación de conductos con gutapercha y un agente a base de hidróxido de calcio (Dycal®) como cemento sellador definitivo (84). Desde entonces se han comercializado varios cementos selladores basados en hidróxido de calcio, entre los que encontramos algunos como Calciobiotic Root Canal Sealer® o CRCS® (The Hygienic Corp., Akron, OH. EEUU), que combina OZE con hidróxido de calcio; Sealapex®

(Kerr/Sybron, Romulus, MI EEUU), Apexit® (Vivadent/Ivoclar, Schaan, Liechtenstein) o Acroseal® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France).

A pesar de sus propiedades biológicas como material, cuando el hidróxido de calcio es utilizado como cemento sellador definitivo, propiedades físicas como el sellado apical y la filtración se ven comprometidas debido a que sus beneficios se obtienen de la disociación iónica, disolviéndose parte del material sellador con el tiempo(85). En términos de liberación de iones, Sealapex®, debido a su mayor absorción de agua (86) libera más iones al medio, lo que permite una curación de tejidos más rápida que CRCS®, Apexit® o Acroseal®. Éste último es el que menos capacidad de liberación de iones presenta debido principalmente a que se compone también de éter diglicídico del bisfenol-A y metenamina, componentes epoxy que impiden su disolución (87).

3.3. Cementos a base de resina epoxy.

Los cementos selladores a base de resina epoxy se utilizan en la práctica odontológica actual debido a sus características favorables como la adhesión a la estructura dentaria, su largo tiempo de trabajo, la facilidad de manipulación y el buen sellado que otorgan(88).

A pesar de su buena adhesión a dentina, estos cementos no producen una adhesión química de sus componentes con la gutapercha. Se ha sugerido que una capa más gruesa de cemento favorece el resultado de la obturación de conductos ya que penetra más en los túbulos dentinarios y consigue una mayor fuerza de adhesión a dentina (70, 89, 90)

Algunos de los cementos selladores a base de resina disponibles en el mercado actualmente son: Diaket® (3M ESPE/Premier, Alemania/EEUU), Topseal® (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suiza), AH26® (DeTrey/Dentsply, Konstanz, Alemania) y AH-Plus® (DeTrey/Dentsply, Ballaigues, Suiza).

Diaket® es un cemento que fragua por quelación y contiene policloruro de vinilo como compuesto principal. No es muy utilizado a pesar de sus buenos resultados en los tests *in vitro* y su biocompatibilidad (91). AH26® contiene hexametilentetramina, sintetizada a partir de formaldehído y amonio. La liberación de formaldehído ocurre principalmente tras la reacción entre la hexametilentetramina y el bisfenol A (92). En un ambiente ácido, la hexametilentetramina se descompone dando lugar a la liberación de formaldehído, que es tóxico para los tejidos periapicales(93). Topseal® está formulado igual que AH Plus® pero de la casa Dentsply/Maillefer(92).

AH PLUS®

La línea de cementos a base de resina epoxy más popular, sin duda ha sido la línea AH. El prototipo de este cemento fue desarrollado por André Schroeder en Suiza hace más de 50 años. Fue la evolución del cemento AH26 en un intento de suprimir la liberación de formaldehído(93).

AH Plus®(Figura 5) es un material que se presenta en dos pastas A y B entre la que ocurre una lenta reacción de polimerización de las aminas de resina epoxy con alto peso molecular incluyendo bisfenol A y bisfenol F. Tras ello, la conversión de monómeros a polímeros ocurre de manera lenta, explicando así su tiempo de fraguado lento (94).



Figura 5. AH Plus® comercializado en formato de dos pastas

Composición: dibenzildiamina, aminoadamantina triclodecane-amina (poliaminas) contenidas en la Pasta B. Las poliaminas de la pasta B reaccionan con la resina epoxy de la pasta A rompiendo así la unión de los grupos epóxidos y formando los polímeros. La reducción de las poliaminas por la temperatura en el proceso de la compactación vertical afecta al proceso de la polimerización de AH Plus resultando en cambios físicos y mecánicos del material resultante (95).

Entre algunas de sus propiedades sabemos que AH Plus® cumple con las especificaciones de la ASA/ADA y las especificaciones ISO. Es poco soluble, tiene buena fluidez, tarda unas 10 horas aproximadamente en fraguar, tiene una radiopacidad alta (96) y consigue una mejor adhesión a dentina que otros cementos (97).

En cuanto a sus propiedades biológicas, sabemos que ante la extrusión del cemento y su contacto con tejidos periapicales, provoca una reacción inflamatoria que dura aproximadamente unas 48 horas, relacionada con la fase de fraguado, pero que disminuye con el tiempo una vez que el cemento adquiere su consistencia definitiva (98), siendo ligeramente citotóxico en su fase inicial y no resultando en dolor post tratamiento más allá de las 48 horas (99).

Este cemento sellador se ha intentado combinar con otros materiales como el hidróxido de calcio para mejorar sus propiedades biológicas, consiguiendo un aumento de pH en el medio no significativo a costa de aumentar su solubilidad (100). En el intento de combinar AH Plus® con clorhexidina y cetrimida para aumentar su eficacia bactericida, no se obtuvo una mejora real con respecto a la formulación original (101).

En los últimos años y debido a las nuevas técnicas de obturación con gutapercha caliente, algunos estudios sugieren que el calor modifica las propiedades de los cementos resinosos como el AH Plus®, reduciendo su tiempo de fraguado, aumentando su fluidez y su grosor (95). El tiempo de fraguado de éstos materiales se reduce considerablemente debido a que el calor, actúa como catalizador de la reacción de polimerización. La fuerza compresiva del AH Plus® se reduce tras la

aplicación de calor, relacionado con la degradación de los componentes amina del material (102).

3.4. Cementos a base de resina metacrilato.

El mecanismo de adhesión de los cementos a base de resina de metacrilato es por retención micromecánica de la resina que infiltra la matriz de colágeno parcialmente desmineralizada. Uno de los mayores problemas asociados a la adhesión de este tipo de cementos es la contracción de polimerización que se produce(103).

Hasta la fecha se han desarrollado cuatro generaciones de cementos a base de resina-metacrilato. Así encontramos los cementos de 1ª Generación: Hydron®, 2ª Generación: Endorez®-Realseal®, 3ª Generación: Epiphany® y finalmente los de 4ª Generación: Realseal SE®- Metalseal SE®- Smartseal®.

La primera generación apareció a mediados de los años 70 cuando se empezaba a investigar los primeros pasos de la adhesión a dentina. El uso de polihidroxietilmetacrilato (poli [HEMA]) como ingrediente principal resultó en un cemento muy hidrofílico La segunda generación y la primera generación de estos materiales se descartó muy rápido. De la segunda generación, el cemento más representativo es Endorez® un cemento de metacrilato hidrofílico de fraguado dual y radiopaco, con una alta efectividad de penetración en los túbulos dentinarios por su contenido acuoso(103).

La tercera y cuarta generación surgieron con el concepto de *monoblock* y una adhesión que no permite espacios entre material y dentina con una mejora de la resistencia a la fractura. La tercera generación se basa en un cemento auto grabado con un primer de auto grabado y una resina de composite fraguado dual. De esta tercera generación, Epiphany® es el cemento más representativo. La cuarta generación es una evolución de la tercera en la que se reducen los pasos de la técnica auto adhesiva (103).

Este tipo de cementos ha tenido muy buenos resultados en estudios *in vitro*(104, 105)pero no *in vivo* y en la actualidad, no mejora los resultados de las técnicas con gutapercha (96, 98, 106).

3.5. Cementos a base de silicona.

El uso de materiales con polidimetilsiloxano se ha visto aumentado en las últimas dos décadas en medicina y odontología, debido a la buena estabilidad dimensional, lo que le confiere buenas propiedades mecánicas y biológicas (107).

Dentro de este grupo de cementos, actualmente se conocen los cementos Lee Endofill® (Lee Pharmaceuticals, El Monte, CA. USA), RoekoSeal® (Roeko/Coltène/Whaledent, Langenau, Alemania), GuttaFlow® (Coltène/Whaledent Inc, Cuyahoga Falls, OH), GuttaFlow 2® (Roeko-Coltène/Whaledent, Langenau, Alemania) y el más reciente GuttaFlow Bioseal® (Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Suiza).

En 1984 se introdujo por primera vez una silicona como cemento endodóntico. Las siliconas tipo A muestran baja filtración, no son tóxicas virtualmente pero no tienen ningún efecto antibacteriano(108). Alrededor del año 2000, se introdujo un cemento a base de silicona llamado Roekoseal® formulado a partir de polidimetilsiloxano, aceite de silicona, aceite de parafina, ácido hexacloroplatinico como catalizador y dióxido de zirconio como material radiopacificante. Este cemento se caracterizaba por una buena biocompatibilidad (109), buen sellado a largo plazo, con buenos resultados en términos de reparación tisular (108),bajas tasas de solubilidad con respecto a otros cementos (110) y con capacidad para sellar conductos laterales (111).

Posteriormente, en 2004, se introdujo una combinación de gutapercha en polvo, en partículas de 30nm, con nanopartículas de plata a una matriz de silicona (polidimetilsiloxano o PDMS)(72, 112). En pruebas *in vitro* con GuttaFlow®, se

obtienen hasta un 100% de extrusión del cemento por el ápice radicular simulado denotando una elevada fluidez del material(112).

GUTTAFLOW 2®:

Introducido en 2012 como mejora de su antecesor GuttaFlow®, basado en una composición ligeramente diferente, añadiendo a su composición polvo de gutapercha con partículas de tamaño inferior a 30micras. Las modificaciones en el tamaño de las partículas de plata en GuttaFlow 2® (Figura 6) con respecto a su antecesor, no resultó en un cemento con actividad antibacteriana contra *E. Faecalis*(113).



Figura 6. GuttaFlow 2® comercializado en formato de doble jeringa.

GuttaFlow 2® muestra mayor porosidad que cementos a base de resina-metacrilato, y poca humectabilidad, debido a la presencia de silicona que, probablemente, produce una mayor tensión superficial dificultando la extensión en la superficie dentinaria. Tarda unos 35 minutos el fraguado inicial y unos 65 minutos el fraguado final. ReoekoSeal y GuttaFlow2 tienen poca o nula habilidad para liberar iones involucrados en la formación de apatita y sencillamente actúan como un substrato para la posible unión química con iones del entorno y precipitado de depósitos pobres en calcio no formadores de apatita (114).

La capacidad de adhesión a dentina de GuttaFlow 2® es similar a AH Plus®, reduciéndose con respecto a este último el número de gaps en la interfase entre la dentina y los materiales de obturación (115).

GUTTAFLOW BIOSEAL®

Una formulación nueva de polidimetil-siloxano-gutapercha mejorada con partículas de silicato de calcio fue introducida en el mercado a finales de 2015. Tarda unos 25 minutos el fraguado inicial y unos 45 minutos el fraguado final. En cuanto a la porosidad, GuttaFlow Bioseal® mostró mayor porosidad seguido por MTA Fillapex®. Los valores menores fueron para GuttaFlow2® y RoekoSeal®. GuttaFlow Bioseal® liberó una importante cantidad de iones calcio libres, mostró una alta actividad alcalina junto con una solubilidad no relevante y una ligera liberación de calcio. La notable nucleación de apatita y precursores de apatita se pueden relacionar con la cooperación de partículas de CaSi (grupos Si-OH) con polisiloxano (grupos Si-O-Si) y consecuentemente tener la capacidad de formar apatita de manera intrínseca y extrínseca (46).



Figura 7. GuttaFlow Bioseal® comercializado en formato de doble jeringa.

3.6. Cementos a base de agregado de trióxido mineral

El Agregado Trióxido Mineral (MTA) fue descrito por primera vez en la literatura científica dental por Lee en 1993, sin embargo, fue aplicado y patentado en 1995 por Torabinejad & White (116).

Encontramos los orígenes del MTA en el cemento Portland. Excepto por el óxido de bismuto, MTA Angelus® y Cemento Portland Yura S.A., tienen una composición muy similar de silicato dicálcico y tricálcico, el cual, durante la hidratación, produce gel hidratado de silicato cálcico e hidróxido de calcio. Las propiedades físicas, capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas son muy buenas, siendo capaz de inhibir bacterias como *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis* y *E. faecalis* de manera progresiva de 48 a 72 horas (117).

El MTA está compuesto en un 80% por cemento Portland y un 20% de óxido de bismuto. Comparado con el ProRoot MTA® gris, el MTA Angelus® gris contiene menor cantidad de óxido de bismuto y fosfato de magnesio, pero una mayor cantidad de carbonato cálcico, silicato cálcico fosfato de zinc bario. Además, MTA Angelus® contiene menos carbón, oxígeno y sílice que MTA ProRoot® gris, pero más calcio. MTA Angelus® muestra la presencia de aluminio y la ausencia de hierro, en contraste con MTA ProRoot® que contiene lo opuesto. La cantidad de óxido de bismuto en estructura cristalina es mayor en MTA ProRoot® que en MTA Angelus®. Debido a todo ello, podemos concluir que MTA ProRoot® y MTA Angelus® difieren en su composición. Se comercializan dos versiones del Angelus: MTA gris y MTA blanco(118).

Actualmente existen un número elevado de cementos a base de MTA como son los cementos Endo-CPM® (EGEO S.R.), MTA Obtura® (Dentsply Tulsa Dental), ProRoot Endo® (Angelus Odontológica) y MTA Fillapex® (Angelus Odontológica), entre otros.

MTA FILLAPEX®

MTA Fillapex® (Figura 8) se presenta en forma de dos pastas que al entrar en contacto promueven dos reacciones en cadena que posibilitan el fraguado del material: la hidratación progresiva de los iones ortosilicato (SiO_4^{4-}) y la reacción entre el MTA y la resina salicilato. La reacción del MTA y el salicilato resulta en un polímero iónico. Cuando las partículas de salicilato de calcio del MTA reaccionan con agua, se forma un gel nanoporoso amorfo de calcio silicato hidratado. Ese gel polimeriza y endurece(94, 119).



Figura 8. MTA Fillapex comercializado como jeringa de doble pasta

En cuanto a la liberación de calcio, MTA Fillapex®, a pesar del 40% de MTA en su composición, es muy baja o casi nula en comparación con los prototipos. Esto se atribuye posiblemente a que el componente resinoso no permite la hidratación del MTA requerida para la liberación de hidróxido de calcio (relacionado con la reparación y mineralización de los tejidos)(119).

Respecto a los tiempos de fraguado, MTA Fillapex® tarda unos 130 minutos en el fraguado inicial (2,16 horas) y 270 minutos el fraguado final (4,5horas)(114).

Al comparar algunas propiedades físicas, MTA Fillapex® poseen una fluidez y una estabilidad dimensional similar a Endosequence BC, pero un grosor de película y una solubilidad mayor que AH Plus®, GuttaFlow® y ThermaSeal®, entre otros(120).

En estudios donde se evalúa la reacción tisular ante cementos endodónticos y, a pesar de esperar una acción reparativa de un cemento que contiene MTA, no se encontró ninguna ventaja en cuanto a reparación tisular con MTA Fillapex® comparado con el cemento a base de resina epoxy AH Plus® o incluso con el cemento de óxido de zinc-eugenol EndoFill®. Así pues, MTA Fillapex® no parece tener las ventajas biológicas aclamadas(121).

Las altas temperaturas de las técnicas de gutapercha caliente no afectaron a las fases cristalinas del MTA Fillapex®. A pesar de que el MTA Fillapex® sea un derivado del MTA, no hay evidencias claras de que forme hidróxido de calcio(95).

3.7. Cementos a base de fosfato y silicato tricálcico.

Los materiales a base de fosfato y silicato tricálcico son materiales cerámicos específicamente diseñados para su uso en medicina y odontología. Incluyen alumina, zirconia, vidrio bioactivo, vitrocerámicos, revestimientos y composites, hidroxiapatita y fosfatos cálcicos reabsorbibles(122).

Los silicatos cálcicos del polvo se hidratan para producir hidróxido de calcio y silicato de calcio hidratado en gel. El hidróxido de calcio reacciona con los iones fosfato para formar hidroxiapatita y agua. El agua continúa reaccionando con los silicatos cálcicos para precipitar en un gel adicional de silicato de calcio hidratado. El sustrato acuoso es fundamental en este tipo de reacciones(123).

Desde la perspectiva de la endodoncia, ofrecen las siguientes ventajas como material: elevado pH (12.8) durante las primeras 24 horas del proceso de fraguado (fuertemente antibacteriano), son hidrofílicos, biocompatibles, no se contraen o reabsorben, fraguan rápidamente, son fáciles de utilizar (el tamaño de las partículas es tan pequeño que pueden utilizarse en jeringa) y permiten el retratamiento(124).

A día de hoy, encontramos como ejemplos de estos materiales cementos como Endosequence/iRoot SP® (Brasseler USA), IRoot BP® (Brasseler USA), Bioggregate® (Innovative BioCeramix) o TotalFill® (KFG Dentaire).

4. TEJIDO PULPAR Y TEJIDOS PERIAPICALES

La pulpa dentaria forma parte del complejo dentino-pulpar (Figura 9), que tiene su origen embriológico en la papila dental (tejido ectomesenquimático) y se encuentra alojada en la cámara pulpar y a lo largo de los conductos radiculares. Del piso de la cámara pulpar salen los conductos que penetran en las raíces, extendiéndose desde la región cervical hasta el foramen apical o ápice radicular. A nivel del foramen apical, la pulpa radicular se conecta directamente con el tejido periapical del ligamento periodontal a nivel del espacio indiferenciado de Black o periápice (125).

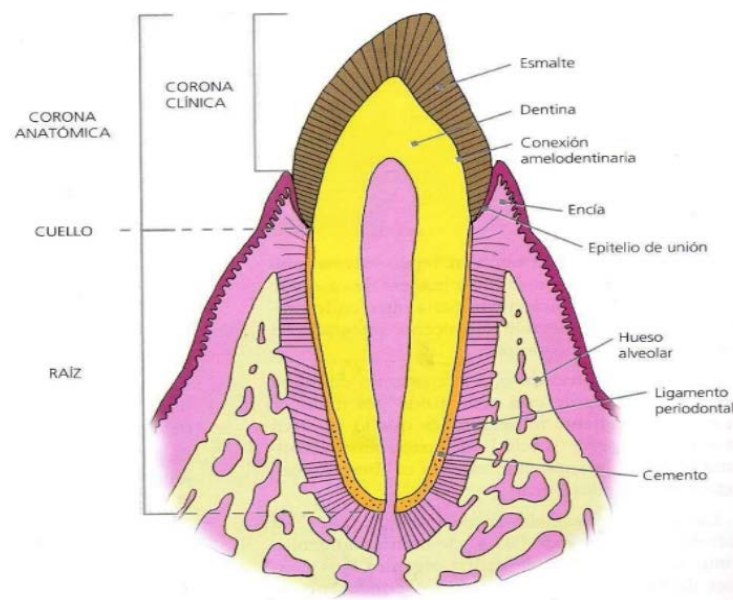


Figura 9. Esquema de las estructuras del diente y de los tejidos periapicales (125).

Desde un punto de vista estructural, la pulpa dental es un tejido conectivo laxo ricamente vascularizado e innervado. Está formada por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica, ésta última compuesta por células y matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental(126).

Las poblaciones de células que encontramos en una pulpa normal están constituidas por odontoblastos, fibroblastos, células ectomesenquimáticas (o células madre de la pulpa dental), macrófagos, células dendríticas y otras células del sistema inmune (125).

En cuanto a la vascularización de la pulpa y los tejidos periapicales encontramos vasos sanguíneos que penetran en la pulpa acompañados de fibras nerviosas sensitivas y autónomas y salen de ella a través del conducto o foramen apical (125, 127).

Dentro de los tejidos periapicales o periodonto de inserción encontramos cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar; tres estructuras que se originan en la capa celular interna del saco dentario, compartiendo así el mismo origen embriológico. El hueso que rodea el alveolo y el cemento, están unidos por las fibras de colágeno constituyentes del ligamento periodontal, conformando así el complejo alveolo-dentario, cuya función es la de soportar las fuerzas de la masticación y la retención del diente en su posición(125).

El cemento es una estructura de tejido conectivo altamente mineralizado que reviste la dentina en su porción radicular. Las células que dan lugar a esta estructura son los cementoblastos y los cementocitos. El cemento se encarga de proporcionar una superficie de anclaje a las fibras de colágeno del ligamento periodontal, resolver variaciones de estructura en el espacio periodontal en el tiempo, transferir las fuerzas oclusales al ligamento periodontal o participar en la reparación de fisuras o resorciones radiculares(128).

La estructura ósea que rodea al diente es la parte alveolar que se continúa con la parte de soporte o basal. El hueso alveolar junto con el ligamento periodontal y el cemento constituyen el periodoncio de inserción. El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo mineralizado entre un 60% y un 40%, hidratado a partes iguales y complementado con material orgánico. En el hueso encontramos células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células bordeantes óseas(129).

El ligamento periodontal es una fina capa de tejido conjuntivo fibroso que une el diente al hueso alveolar a través de sus fibras colágenas. En sus dos extremos, el ligamento periodontal tiene fibras conectivas de unión tanto a nivel del ápice dentario con el conectivo pulpar y a nivel coronal con el corion gingival. Esta interrelación

topográfica tiene relevancia a nivel clínico, ya que cualquier agresión o infección que se genere en estas zonas de unión pueden propagarse de unas zonas a otras constituyendo las denominadas lesiones endoperiodontales(130, 131). El ligamento periodontal, a pesar de su alta densidad fibrilar, presenta una alta carga celular. El 20% del conjunto celular son fibroblastos y además encontramos, también con función formadora a osteoblastos; con función resortiva a osteoclastos y cementoclastos; con función inmunológica a macrófagos, mastocitos y eosinófilos, y también células epiteliales de Malassez y células madre ectomesenquimáticas(125, 131).

4.1 Fundamentos de los procesos de reparación tisular.

La inflamación puede definirse como una respuesta compleja del sistema inmune con el objetivo de crear una defensa ante la acción de diferentes agentes nocivos de procedencia mecánica, física, química o bacteriana. Todos los tipos de lesiones implican en mayor o menor medida, agentes involucrados en el proceso de respuesta inflamatoria. El objetivo final de la respuesta inflamatoria es la eliminación de los agentes nocivos y sus derivados; y permitir que se establezcan las condiciones óptimas para los sucesivos procedimientos reparativos(132).

En la fase inicial de la inflamación predominan los granulocitos neutrófilos, los cuales se encargan de liberar diversas sustancias estimulantes de la inflamación, las llamadas citosinas (TNF- α , e IL) para fagocitar bacterias; pero también liberan enzimas proteolíticas que se encargan de limpiar las regiones dañadas y sin vitalidad de los tejidos afectados. Así, los neutrófilos son las primeras células que llegan al área lesionada y son las células encargadas de combatir y eliminar la contaminación bacteriana inicial. Además de estas acciones, también son una fuente de citoquinas proinflamatorias involucradas en una de las fases más tempranas de activación local de queratinocitos y fibroblastos. El número de neutrófilos alcanza un pico a las 24 horas y entonces cae gradualmente, cesando el infiltrado inflamatorio de neutrófilos en unos pocos días. Los neutrófilos efectivos útiles en las fases previas de limpieza y descontaminación de la herida, son marcados y fagocitados por los macrófagos

tisulares a nivel local. Cuando la infección está erradicada, los neutrófilos ya no son necesarios para la reparación tisular normal, viéndose su población reducida por la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos(132, 133).

Pasadas las primeras 24 horas desde la lesión, se produce la migración de los monocitos a la región lesionada. Estos monocitos son reclutados desde la circulación sanguínea a partir de factores quimiotácticos como TGF- β , sobre todo, y también PDGF y FGF de manera constante hasta alcanzar su pico máximo a las 48 horas. Los monocitos se transforman en macrófagos a nivel local de manera que alrededor de las 72 horas, los neutrófilos han sido sustituidos por macrófagos en su mayor parte. A partir de este momento, la cicatrización se lleva a cabo por los macrófagos ocupando un papel central en la misma. Las toxinas bacterianas remanentes actúan como factores quimiotácticos para este tipo de células, provocando su continua migración en densas filas desde el torrente sanguíneo hasta la herida(134).

A partir del cuarto día aproximadamente se inicia la fase de proliferación celular o fase proliferativa, en la que aumenta el número de células con el fin de reconstituir el sistema vascular dañado y reparar la zona defectuosa mediante tejido neoformado. En esta fase intervienen de manera activa los factores de crecimiento liberados por los macrófagos en las primeras 72 horas, y estimulan la migración de fibroblastos, células epiteliales y células del endotelio vascular de los márgenes de la lesión. Estas células son las encargadas de iniciar el proceso de proliferación aumentando su celularidad y puede llegar a durar varias semanas (133).

En la fase de diferenciación y remodelación comienza la maduración de las fibras de colágeno, depositado principalmente por los fibroblastos. La extensión de la lesión se reduce, disminuye cada vez más la presencia vascular y el contenido de agua en el tejido neoformado, que gana en consistencia, y se transforma finalmente en un tejido reparado (133, 135).

4.2 Reacción de los tejidos periapicales ante la extrusión de cemento endodóntico.

Tras la conformación, limpieza y obturación de los conductos radiculares, empieza el proceso de reparación de los tejidos periapicales, que se caracteriza principalmente por la proliferación celular y la formación de una matriz orgánica (136).

Durante esta fase de reparación inicial, el potencial irritante del material de obturación puede retrasar o incluso evitar la reparación tisular debido a que la irritación inherente al proceso patológico en sí mismo, y la agresión por el tratamiento endodóntico, puede conllevar la pérdida variable de tejido conectivo. Por ello, se deben utilizar materiales que no sean dañinos para los tejidos apicales y periapicales (136).

Con la obturación del sistema de conductos se consigue reducir significativamente la inflamación periapical causada por las bacterias y sus productos de degradación, involucrados en la lesión periapical. Esto puede ser explicado sugiriendo que la obturación produce un sellado y un aislamiento de las bacterias, reduciendo así su número y su capacidad de multiplicación, así como la comunicación entre las mismas y por tanto la magnitud de la respuesta inflamatoria (137).

La curación satisfactoria de los tejidos periapicales tras el tratamiento endodóntico, depende en parte, de la composición química y las propiedades físico-químicas de los materiales de obturación y de la extensión de cualquier degradación y liberación de los componentes de estos materiales hacia los tejidos periapicales (138).

Entre los factores que afectan al pronóstico del tratamiento endodóntico revisados por Friedman en 2002, uno de ellos es la extrusión de material más allá del final de la raíz (139), pudiendo reducir hasta en un 62% el éxito del tratamiento por sobreextensión de los materiales de obturación (140).

A finales de los años 80, Orstavik y Mjor implantaron en ratas subcutáneamente distintos materiales utilizados en endodoncia como la kloropercha, endometasona, procosol o AH26, confirmando que la reacción de los tejidos es distinta en el tiempo y dependiente de la biocompatibilidad del material (141).

Cuando el cemento sellador endodóntico queda confinado dentro del conducto y llega solo hasta el “stop apical”, se produce una deposición de tejido conectivo y tejido mineralizado hacia el interior del conducto y un ligero infiltrado inflamatorio al contacto con el cemento, mientras que, cuando el cemento sale al tejido periapical, siempre se encuentra una reacción tisular inflamatoria con macrófagos que han fagocitado partículas del cemento (142-144).

En un estudio realizado en monos con 4 cementos endodónticos de composición diferente (a base de resina, a base de OZE y a base de hidróxido de calcio), en todos los casos en los que el material quedó dentro del sistema de conductos al obturarlos con gutapercha y cemento, no hubo reacción inflamatoria exacerbada en los tejidos periapicales. En los casos en los que se extruyó cemento, no intencionadamente, se produjo una reacción tisular de base inflamatoria común y diferente dependiendo de la composición del cemento (145).

La obturación más allá del ápice con materiales que no son biocompatibles, se acompaña de un peor pronóstico. Cuando dichos materiales se insertan o se inyectan en el tejido conectivo, se produce una destrucción del tejido, inflamación y una reacción a cuerpo extraño (146). Idealmente, los cementos selladores deben ser biocompatibles y tener propiedades físico-químicas satisfactorias (147).

Así, para la selección de los cementos selladores endodónticos se debe tener en cuenta sus propiedades físico-químicas y su biocompatibilidad ya que el cemento permanece en contacto directo con los tejidos apicales y periapicales. En los casos en los que el cemento permanece confinado dentro del conducto, con cementos biocompatibles como Sealapex®, se puede producir una deposición de tejido mineralizado formando un sellado parcial o total. En la misma situación, con cementos menos biocompatibles como AH Plus®, no obtenemos este resultado. En casos en los que el cemento sale a los tejidos periapicales, producirá una reacción inflamatoria distinta dependiendo de su biocompatibilidad. Mientras que con cementos biocompatibles se produce una reparación del cemento y fibras de colágeno, con cementos no biocompatibles se produce una activación celular inflamatoria permanente (148).

Un estudio histológico evaluó la respuesta tisular ocasionada por el cemento de óxido de zinc-eugenol, resultando altamente tóxico en las 4 primeras semanas, reduciéndose este efecto a las 12 semanas y creando hueso. El MTA no produjo reacción inflamatoria y se formó hueso tanto a las 4 como a las 12 semanas. Se llegó a la conclusión de que aquellos materiales con alta toxicidad provocan una respuesta inflamatoria que impide la regeneración de los tejidos circundantes mientras que aquellos que no lo son, permiten la curación de los tejidos en los que están en contacto (149).

En casos en los que se extruye material no intencionadamente, e independientemente del tipo de material, se obstaculiza el sellado apical de los tejidos. En cambio, en los casos en los que el material queda confinado en el conducto radicular, la reparación tisular ocurre en un 100% de los casos cuando se utiliza Sealapex. En los casos de extrusión de material, se forma tejido mineralizado, sugiriendo que una posible solubilización del material permitiendo la deposición de tejido mineralizado (150).

En los casos en los que el cemento sellador se extruye más allá del límite del ápice radicular, dependiendo de sus propiedades físico-químicas, será capaz de ser reabsorbido o no. Ricucci y colaboradores realizaron un estudio de seguimiento en el que evaluaron radiográficamente la evolución de extrusión no intencionada de cemento, describiendo casos en los que el cemento, o parte de sus componentes, permanecen inalterados radiográficamente hasta 10 años con ejemplos como con AH Plus o incluso 16 años con Apexit. En este estudio no se relaciona la extrusión de cemento sellador con un peor pronóstico en dientes sin periodontitis apical. El pronóstico dependerá de la presencia de infección residual concomitante intraconducto (151).

La biocompatibilidad a largo plazo del material podría justificarse cuando existe una ausencia de células inflamatorias, un incremento de tejido fibroso como respuesta y la presencia de tejido óseo trabecular sano (152).

5. CÉLULAS MADRE O “STEM CELLS”

El término “stem cell” (SC) aparece en la literatura científica en 1868 en los trabajos del biólogo alemán Ernst Haeckel (153). Las células madre se caracterizan por dos propiedades únicas con respecto a células especializadas: in vivo, son capaces de dividirse manteniendo su diferenciación; este proceso se denomina “auto-renovación”. La segunda, que todas las células madre mantienen su capacidad para diferenciarse progresivamente en tipos celulares maduros(154).

Existen dos fuentes primarias de células madre: células madre adultas y células madre embrionarias (hES). Además de éstas dos fuentes, existe una tercera fuente de células madre llamadas células madre pluripotentes inducidas (iPS), recientemente desarrolladas artificialmente mediante manipulación somática(154).

Sabemos que las células madre de origen embriológico y las células madre inducidas artificialmente son pluripotenciales, lo que indica que pueden diferenciarse en cualquiera de las tres líneas germinales, mientras que las células madre adultas son multipotenciales, ya que sólo pueden diferenciarse en un número limitado de células(155).

Las iPS tienen propiedades similares a las hES y se han generado mediante reprogramación a partir de fibroblastos humanos dérmicos, neonatales y más recientemente de fibroblastos gingivales y periodontales(156).

Hasta la fecha, las células madre se consideran útiles para(157):

- 1 – Entendimiento del mecanismo básico de cómo una célula madre regula el genoma y su comportamiento (proliferación celular de manera simétrica o asimétrica, diferenciación, apoptosis, inmortalidad, senescencia, etc.).
- 2 – Medicina regenerativa o terapia con células madre.
- 3 – Tests de citotoxicidad de fármacos o en terapia celular.

4 – Terapia genética

5 – El papel de las células madre en enfermedades derivadas de las células madre y en el proceso de envejecimiento.

En los últimos años, las células madre han contribuido en gran medida al establecimiento de la medicina regenerativa o “ingeniería de tejidos”, que se define como “el proceso de regenerar o reemplazar células humanas, tejidos u órganos para aplicaciones terapéuticas”(158).

5.1 Células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales (MSCs) fueron descritas por primera vez en 1966 por Friedenstein como células clonogénicas, derivadas de la médula ósea y adherentes a plástico, denominadas entonces fibroblastos formadores de colonias(159, 160).

En 2005, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso que las células adherentes al plástico descritas hasta el momento como células madre mesenquimales se denominen “células estromales mesenquimales multipotentes”, mientras que el término “células madre mesenquimales” se reserve para un subgrupo de éstas (u otras) células que demuestren actividad de célula madre con un criterio claro. Para ambas se puede utilizar el acrónimo MSC ampliamente utilizado, siendo imperativo que los investigadores definan inequívocamente el acrónimo al presentar su trabajo(161).

En 2006, ISCT determinó los criterios mínimos de identificación de células madre mesenquimales adultas, siendo los siguientes(162):

- 1 – Deben adherirse al plástico de los recipientes de cultivo mientras se mantienen en condiciones estándar.
- 2 – Al menos el 95% de la población celular debe expresar los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, medidos mediante citometría de flujo y en

contraposición, no expresar CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y moléculas HLA-DR de superficie.

3 – Deben diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*.

Recientemente, se han descrito otros marcadores de superficie únicos para MSCs tales como CD271(163) y el antígeno-1 de MSC(164).

Las MSCs permanecen en estado quiescente pero son capaces de auto-renovarse ya que su división asimétrica produce una célula madre hija idéntica y una segunda célula progenitora que se diferencia en una línea específica(165). Esa célula progenitora es capaz de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, condrocitos y otros tejidos de origen mesenquimal(166).

Estudios *in vitro* con MSCs de médula ósea del esternón demuestran que, en estas condiciones, son capaces de diferenciarse en poblaciones heterogéneas de células mesodérmicas (adipocitos y osteoblastos) y células ectodérmicas (células similares a las células neuroectodérmicas) (167).

Además de la médula ósea, las MSCs residen en numerosos tejidos del organismo adulto como pueden ser el tejido adiposo, el periostio, la membrana sinovial, el músculo, la dermis, los pericitos o la sangre entre otros. Su plasticidad y sus propiedades inmunomoduladoras las hacen una herramienta muy útil para las investigaciones en ingeniería de tejidos(168).

Las MSCs de médula ósea se han sugerido como tratamiento coadyuvante o alternativo a los tratamientos clásicos para la osteonecrosis cuando éstos son efectivos. La infusión de células solamente o asociadas a una plataforma osteoinductiva proporciona una posible herramienta para la regeneración de hueso en éstos paciente(169).

En estudios recientes, se ha visto que las células madre mesenquimales de médula ósea y líquido synovial tienen mayor potencial de diferenciación adipogénico,

osteogénico y condrogénico que las células madre mesenquimales de pulpa dental y de diente exfoliado, mientras que éstas dos últimas tienen mayor potencial neurogénico que las dos primeras(170).

La capacidad de aislar, cultivar y manipular células madre multipotentes de origen no embriológico, proporciona a los investigadores una fuente ilimitada de células para su estudio, investigaciones fármaco-tóxicas y tests de regulación(171).

5.2 Células madre mesenquimales de origen dental

Estudios recientes revelan que los tejidos orales, zonas de fácil acceso para los odontólogos (Figura 10), son una fuente rica en células madre(172).

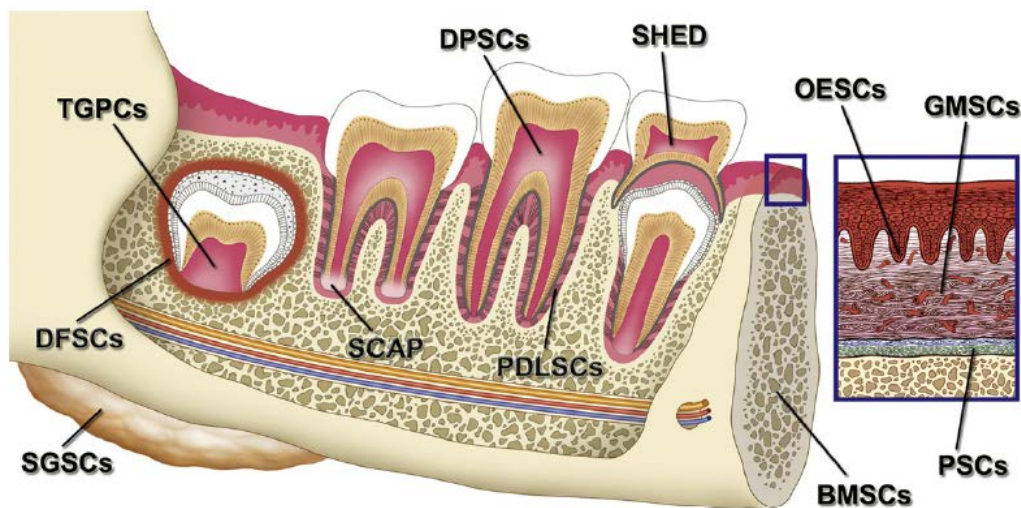


Figura 10. Fuentes de células madre en la región oral y maxilofacial. SGSCs: células madre derivadas de glándula salival; DFSCs: células madre de folículo dental; TGPCs: células madre de germen dental; SCAP: células madre de papila apical; DPSCs: células madre de pulpa dental; PDLSCs: células madre de ligamento periodontal; SHED: células madre de diente deciduo exfoliado; BMSCs: célula madre de médula ósea; OESCs: células madre de tejido oralepitelial; GMSCs: células madre adultas derivadas de tejido gingival; PSCs: células madre derivadas de periostio(172).

Tipos de células madre de origen dental

1. Células madre de la pulpa (DPSCs)
2. Células madre de dientes deciduous exfoliados (SHED)
3. Células madre de la papilla apical (SCAP)
4. Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)

1. CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL (DPSCs)

En el año 2000, Gronthos y cols. identificaron y aislaron la población progenitora odontológica en pulpa dental adulta o “dental pulp stem cells” (DPSCs). Mediante el trasplante de DPSCs humanas en ratones inmunocomprometidos, se ha demostrado que estas células son clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejido, propiedades que las clasifican como células madre mesenquimales(173).

Sabemos que incluso en el tejido de pulpa dental de diente adulto contiene una población de DPSCs capaces de diferenciarse a odontoblastos y adipocitos a la vez que expresar nestina y GFAP y formar un tejido similar al complejo dentino-pulpar en trasplante in vivo en ratones(174).

Son células mesenquimales dentro de la pulpa dental. Tienen potencial osteogénico y condrogénico y pueden diferenciarse en dentina in vitro e in vivo, y pueden diferenciarse a algo similar al complejo dentino-pulpar.

Estas células son interesantes para la ingeniería regenerativa debido a que:

- i) Tienen un fácil acceso quirúrgico y una baja morbilidad tras su extracción.
- ii) Pueden regenerar en tejidos dentinarios más parecidos a los reales que otros tipos de células.
- iii) Pueden conservarse por criopreservación con la posibilidad de recombinarse con diferentes matrices.

iv) Poseen habilidades inmunológicas y antiinflamatorias privilegiadas favorables para los experimentos en alotransplantes.

A partir de células de pulpa dental obtenidas de molares en distintos estadios, también se puede obtener, mediante reprogramación de factores, otra fuente rica de células para generar iPS(175).

2. CÉLULAS MADRE DE DIENTES DECIDUOS EXFOLIADOS (SHED)

Este tipo de células fueron descubiertas por el Dr. Songtao en 2003. Dentro de los dientes deciduos exfoliados encontramos varios tipos de células madre tales como adipocitos, condroblastos, osteoblastos y células madre mesenquimales, siendo éstas últimas las que mejor potencial curativo tienen con respecto a otras MSCs(176).

Estas células madre son diferentes a la población de DPSCs ya que tiene una mayor tasa de proliferación, elevada capacidad de duplicación, formación de grupos celulares esféricos, capacidad osteoinductiva in vivo, pero sin capacidad para reconstruir el complejo dentino-pulpar. SHED representa una población más inmadura que otros grupos de células estromales, con alta capacidad de proliferación y diferenciación multipotente. Esta población celular es una buena fuente de células madre destinadas a la reparación de estructura dentaria dañada, inducir regeneración ósea y con posibilidad de tratar tejidos neurales dañados o en enfermedades degenerativas(176).

3. CÉLULAS MADRE DE LA PAPILA APICAL (SCAP)

Son células madre mesenquimales residentes en la papila apical de dientes permanentes con raíces inmaduras.

En el año 2006 se describieron unas células madre mesenquimales de origen humano, residentes en la papila apical y distintas a las DPSCs. Estas células tienen mayor capacidad que DPSCs para regenerar dentina, son capaces de diferenciarse in vitro en células similares a los odontoblastos y en adipocitos(177). Posteriormente se vio que son capaces de producir dentina in vivo y son las células a partir de las cuales se diferencian los odontoblastos primarios que forman la dentina radicular(178).

4. CÉLULAS MADRE DEL LIGAMENTO PERIODONTAL (PDLSCs)

El ligamento periodontal (LP) consiste en un estroma fibroso compuesto de sustancia fundamental que contiene células, nervios y vasos sanguíneos. El estroma fibroso consiste principalmente de colágeno (con cantidades pequeñas de oxitalán) y la mayoría de las células son fibroblastos(180).

El ligamento periodontal a su vez es un tejido funcionalmente importante ya que actúa como soporte del diente, tiene función propioceptiva y regula el volumen del hueso alveolar. Un ligamento periodontal sano contiene distintos tipos de poblaciones celulares como fibroblastos, células endoteliales, restos epiteliales de Malassez, células sensoriales, células madre mesenquimales, células osteogénicas, células osteoclasticas y cementoblastos(181).

En 2004, Seo y cols. describieron la presencia de células clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de generar tejidos muy similares al ligamento periodontal y al cemento de forma in vitro. A su vez, expresaban marcadores de membrana tales como STRO-1 y CD146; marcadores expresados en otras células madre como las derivadas de médula ósea humana y pulpa dental, y por todo ello siendo descritas como células madre multipotentes postnatales presentes en el ligamento periodontal humano (hPDLSCs) (182).

Cuando se comparan células madre de pulpa dental, células madre de médula ósea y células madre de ligamento periodontal, éstas últimas muestran una capacidad de formar colonias clonogénicas adherentes, en la que la

incidencia de unidades formadoras de colonias fibroblásticas es mayor que en células madre de médula ósea o de pulpa dental. Debido a ello, se describen como células madre mesenquimales de ligamento periodontal(182).

Las células madre estromales de médula ósea, PDLSCs y DPSCs tienen la capacidad de formar depósitos mineralizados in vitro similares a la HA fisiológica en presencia de medio de cultivo con el agente osteoinductivo L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona y fosfato inorgánico(173, 182, 183).

Se ha demostrado que el ligamento periodontal de oveja contiene una subpoblación de células con las características fenotípicas de células madre mesenquimales que parecen ser equivalentes a poblaciones similares aisladas del ligamento periodontal humano, abriendo más posibilidades a los estudios sobre regeneración tisular(184).

Las PDLSCs pueden aislarse del ligamento periodontal criopreservado y mantener sus características de diferenciación multipotente incluida la generación de una única colonia, la regeneración de tejido similar al cemento/LP in vivo, la expresión de marcadores de MSCs superficiales y por tanto proveer un surtido listo de MSCs(185).

Li y cols. trasplantaron éstas células en roedores inmunocomprometidos, y observaron que existe una formación de tejido similar al cemento y al LP descrito como cemento típico, estructura típica de ligamento periodontal, y mineralización atípica osteoide cuando se utilizan las PDLSCs en bioingeniería(186).

En un estudio reciente se sugiere que la localización de los PDLSCs cercanos a hueso alveolar tienen mayor capacidad para la regeneración ósea que aquellos PDLSCs de la superficie de la raíz dentaria(187)

Las células madre de ligamento periodontal tienen el potencial para formar hueso, cemento y estructuras similares al ligamento periodontal, y la propiedad de mejorar la regeneración periodontal. Aparentemente, las PDLSCs tienen mayor capacidad de generar estructuras asociadas al diente en comparación con otras células similares a las células madre, haciendo que esta población celular sea importante en los estudios de regeneración periodontal(188).

Las PDLSCs comparten características fenotípicas similares con las células madre estromales de médula ósea (BMSCs), siendo la capacidad inmunomoduladora una de las características principales de estas últimas. Las PDLSCs han demostrado a su vez tener propiedades inmunosupresoras con capacidad para inhibir células mononucleares de sangre periférica(189).

Recientemente se han identificado MSCs a partir de tejido gingival, las “gingival mesenchymal stem cells (GMSCs) o células madre mesenquimales de tejido gingival(158).

Dentro de las aplicaciones en odontología de las MSCs, la mayoría de las investigaciones están enfocadas hacia la regeneración de la dentina afectada, regeneración pulpar, raíces reabsorbidas, regeneración periodontal y reparación de perforaciones(158).

En estudios recientes sobre la presencia de MSCs en procesos infecciosos como la periodontitis apical, se está estudiando su implicación en el equilibrio de procesos tanto a nivel regenerativo como destructivos de hueso. Se ha encontrado una elevada expresión de CD90 en periodontitis apical persistente y en infiltrado inflamatorio crónico, que sugiere que las propiedades inmuno-modulatorias de las MSCs participan en los procesos inmuno-supresores del microambiente de la periodontitis apical persistente. Distintos tipos de MSCs pueden estar asociadas con la naturaleza crónica de la periodontitis apical persistente y con el desarrollo de la periodontitis apical primaria(190).

6. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD EN CEMENTOS ENDODONCTICOS

Existen tres niveles de estudios biológicos para los materiales dentales. 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(191).

1 - 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)
- Efecto sensibilizante (ensayo de maximización en cobaya)

2 - Pruebas de detección de toxicidad local:

- Aplicación de corta duración (15 minutos) al tejido intacto, tejido no epitelizado (cobaya)
- Implantación a largo plazo (>12 meses) en tejido subcutáneo (animal pequeño)

3 - Ensayos de uso

4 - Ensayos clínicos

Según la clasificación de Ostravik(69):

- 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, sino también que no interfieran en la cicatrización de los tejidos retrasando o evitando la curación.
- Pruebas de uso: son las que se realizan en situaciones clínicas, pero se realizan en animales.
- Pruebas microbiológicas: no son fundamentales en el concepto endodóntico 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 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 obstáculo para el avance clínico tanto en la evaluación de materiales de obturación de conductos como en otros aspectos de los tratamientos endodónticos.

En 2010, el Comité de Pruebas de Toxicidad y Evaluación de Agentes Medioambientales describió la visión y las estrategias en el siglo XXI sobre los ensayos de toxicidad. En esa visión se engloba la caracterización química del material de estudio, los ensayos de toxicidad y un modelo de extrapolación y de dosis-respuesta. El primer estudio que se debe realizar es esa caracterización química del material, a partir de la cual se decidirá el tipo de ensayo de toxicidad o si no se necesita en absoluto. En cuanto a las pruebas de toxicidad, habrá que enfocarlas respecto a dos componentes: la línea para estudiar la toxicidad y las pruebas diana. Respecto a la línea para estudiar la toxicidad, se basan en el principio de que variaciones en la respuesta celular y la perturbación de las señales metabólicas son el resultado de la exposición de las células a componentes químicos que puede derivar en enfermedad. Como punto importante, refuerzan la idea de utilizar células de origen humano y realizar pruebas de toxicidad que integren la respuesta celular, como por ejemplo citotoxicidad, proliferación celular y apoptosis. Las pruebas dianas se realizarán in vitro e in vivo dependiendo de las técnicas de toxicidad que existan descritas en el momento del estudio(192).

El término “citotoxicidad” se utiliza para describir aquellos eventos de la cascada molecular que por alguna razón se ven interrumpidos y que interfieren en la síntesis de macromoléculas, causando un daño celular, estructural y funcional inequívoco(193).

Biocompatibilidad se define como “la habilidad de un material de ser funcional en una aplicación específica en presencia de una respuesta adecuada del hospedador”. Esta definición implica una interacción entre un huésped, un material y una función esperada del material. Estos tres factores tienen que estar en armonía antes de considerar el material biocompatible. En la expresión “respuesta adecuada del hospedador” en muchos casos significa que no haya una reacción adversa por parte del sistema vivo en presencia del material en cuestión(194).

Los estudios de citotoxicidad in vitro e in vivo están descritos desde hace tiempo y han sido utilizados en toda su extensión para evaluar la biocompatibilidad de los cementos endodónticos, estableciéndose como criterio básico evaluar los cementos de nueva formulación con cementos ampliamente estudiados con anterioridad(195).

En general, la toxicidad de un cemento sellador se evalúa mediante tres pasos. El primer paso es testar ese material en distintas pruebas de citotoxicidad in vitro. Si se determina que el material no es citotóxico in vitro, puede implantarse en tejidos subcutáneos o musculares y evaluar la reacción a nivel local. Como último paso, las reacciones in vivo del tejido diana frente a la prueba del material debe ser evaluado en sujetos humanos o animales(196, 197).

El contacto adecuado entre células y el material es muy importante en la evaluación biológica del mismo. El contacto entre células y material se puede conseguir de tres maneras: por contacto directo, por contacto indirecto o por contacto a través de extractos. Una buena manera de poner en contacto células y material es mediante el crecimiento de las células directamente sobre el material. En este caso, las propiedades superficiales del material son importantes ya que, si el material tiene una tensión superficial baja, las células no se adherirán al material y por lo tanto no podrán crecer(194).

En los test de citotoxicidad, las reacciones celulares pueden ser descritas de manera morfológica o cuantitativa basadas en viabilidad celular, proliferación y funcionalidad celular tal como apoptosis, adhesión, migración y secreción de ciertas sustancias(194).

En situaciones clínicas, la parte de tejido dañado tiene un rango metabólico y un estado de proliferación más bajos que en un tejido sano debido al bajo número de células viables presentes en el tejido dañado(194).

Dentro de los distintos estudios del estado de proliferación de células expuestas a un material in vitro encontramos el ensayo MTT. El test colorimétrico de MTT [Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico], desarrollado por Mossman en 1983(198), indica los efectos en la viabilidad celular a través de las alteraciones en las actividades de la deshidrogenasa mitocondrial. Se basa en la conversión del metiltiazol tetrazolio, soluble, en formazán púrpura insoluble. Este formazán es solubilizado posteriormente y su concentración puede determinarse mediante espectrometría. Es un método rápido y barato para cultivos celulares monocapa(194, 199).

Los cementos selladores se insertan en la cavidad oral cuando todavía no han fraguado y debido a ello, durante un periodo corto de tiempo sus componentes provocan una respuesta local cuando han reaccionado parcialmente o aún no han reaccionado. Tras el tiempo de fraguado, la liberación de parte de sus componentes aún puede ser potencialmente tóxica ya sea por contacto con los fluidos tisulares, por corrosión o debido a sus propiedades(200).

Recientemente se ha propuesto una variante en el ensayo de MTT para citotoxicidad de cementos endodónticos, en el que se utiliza un modelo en 3D para intentar simular unas condiciones más cercanas al entorno apical y periapical(201).

II – JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las técnicas de obturación de los conductos radiculares se basan en un material central sólido (gutapercha) y un cemento sellador. Estos materiales quedan confinados dentro del sistema de conductos, en íntimo contacto con los tejidos periapicales, e incluso en algunos casos, se produce la extrusión del cemento sellador hacia el periápice, siendo la biocompatibilidad una de las características indispensables de los mismos.

En el mercado endodóntico actual podemos encontrar materiales selladores ampliamente utilizados y, debido al auge de materiales como el MTA, la aparición de nuevas formulaciones está al orden del día. Los materiales que surgen intentan combinar propiedades y características de otros ya establecidos, con nuevas y prometedoras propiedades. Así, coexisten materiales como AH Plus, un cemento a base de resina epoxy ampliamente estudiado y utilizado, con materiales novedosos como MTA Fillapex, que intenta combinar las propiedades de las resinas con los beneficios del agregado de trióxido mineral y se califica como biocerámico. Por otro lado, encontramos cementos a base de silicona como GuttaFlow Bioseal, evolución del GuttaFlow2 que promete propiedades bioactivas debido al contenido de vidrios bioactivos en combinación con su base de silicona.

La constante evolución de estos materiales requiere de una investigación adecuada para decretar tanto las indicaciones como las limitaciones que puedan representar estos materiales para la práctica clínica. Como se viene haciendo tiempo atrás y de manera ya establecida, el análisis de las propiedades físico-químicas, mecánicas y por supuesto, los estudios de biocompatibilidad, son necesarios para conseguir despejar cualquier duda que pueda cuestionar su utilización.

Con este estudio se pretende analizar las propiedades de biocompatibilidad de estos materiales utilizando células humanas próximas a la zona de actuación de los cementos selladores.

III - OBJETIVOS

Objetivo principal: Evaluar la biocompatibilidad de dos cementos selladores, uno a base de resina y otro a base de silicona; y de dos cementos selladores biocerámicos, uno a base de MTA modificado con resina y uno a base de silicona modificado con silicato tricálcico, frente a células madre de ligamento periodontal.

Objetivos secundarios:

- Caracterizar e identificar las células madre de ligamento periodontal humano.
- Comprobar la citotoxicidad de un cemento a base de resina y su posterior evolución a biocerámico.
- Comprobar la citotoxicidad de un cemento a base de silicona y su posterior evolución a biocerámico.
- Constatar de forma objetiva mediante registros fotográficos la presencia de células madre del ligamento periodontal en contacto directo con los cementos selladores mediante técnicas microscópicas.
- Registrar mediante imágenes la superficie de los cementos selladores.
- Comparar los distintos materiales utilizados, valorando su resultado a nivel de migración celular.
- Caracterizar los cementos selladores mediante técnicas de SEM EDX.

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

Los cultivos de células y tejidos obtenidos directamente de humanos son conocidos como cultivos primarios. Estos cultivos presentan características similares a las dadas en condiciones *in vivo* y se utilizan para numerosos experimentos *in vitro*. Los cultivos primarios pueden mantenerse en frascos de cultivo de plástico tratado en monocapas, dependiendo de la línea celular y de otros factores.

En este estudio utilizamos como población diana células madre del ligamento periodontal humano. Las células madre son células de tipo continuo que mantienen las características de las células madre originales y pueden a su vez diferenciarse en otros tipos celulares. Requieren unos cuidados y un mantenimiento muy estricto para su preservación y para garantizar que sus características se mantienen.

Las líneas celulares engloban a aquellas células capaces de multiplicarse durante extensos períodos de tiempo *in vitro*, por consiguiente, pueden mantenerse mediante subcultivos periódicos.

Para el mantenimiento *in vitro* de los cultivos celulares, son elementos clave el medio de cultivo, los suplementos y otros aditivos específicos de cada línea celular y las condiciones de incubación.

En este estudio, se han tenido en cuenta las directrices recomendadas por “The Guidance on Good Cell Culture Practice” publicado en 2005, y por la “Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models” publicado en 2016 por la European Centre for the Validation of Alternative Methods: parte de la European Commission's Joint Research Centre (EURL ECVAM) en las que se aclaran los procedimientos que implican el manejo de medio basal, suero, antibióticos, antifúngicos, pH, condiciones de preservación, entre otros, para un correcto manejo de los cultivos celulares (202)(203).

1. AISLAMIENTO CELULAR

Se recogieron cordales (n=9) de pacientes adultos mayores de dieciocho años sin condición médica relevante, enfermedad periodontal avanzada ni afectación por caries, y extracción programada por motivos ortodónticos o pericoronaritis (Figura 11).

Para asegurar el anonimato de los donantes, las piezas dentales no fueron identificadas.

Previamente a la obtención de la muestra, los pacientes del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia) fueron informados del estudio y firmaron el consentimiento informado redactado para el experimento y aprobado por el comité ético de dicho hospital.

Inmediatamente tras la extracción, los cordales recogidos se depositaron en un tubo tipo Falcon con medio de cultivo que constaba de: Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Sigma-Aldrich), mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina; Sigma-Aldrich) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina b; Sigma-Aldrich) (Figura 11).

Las muestras se conservaron entre 4-8°C y se procesaron antes de las 12 horas.

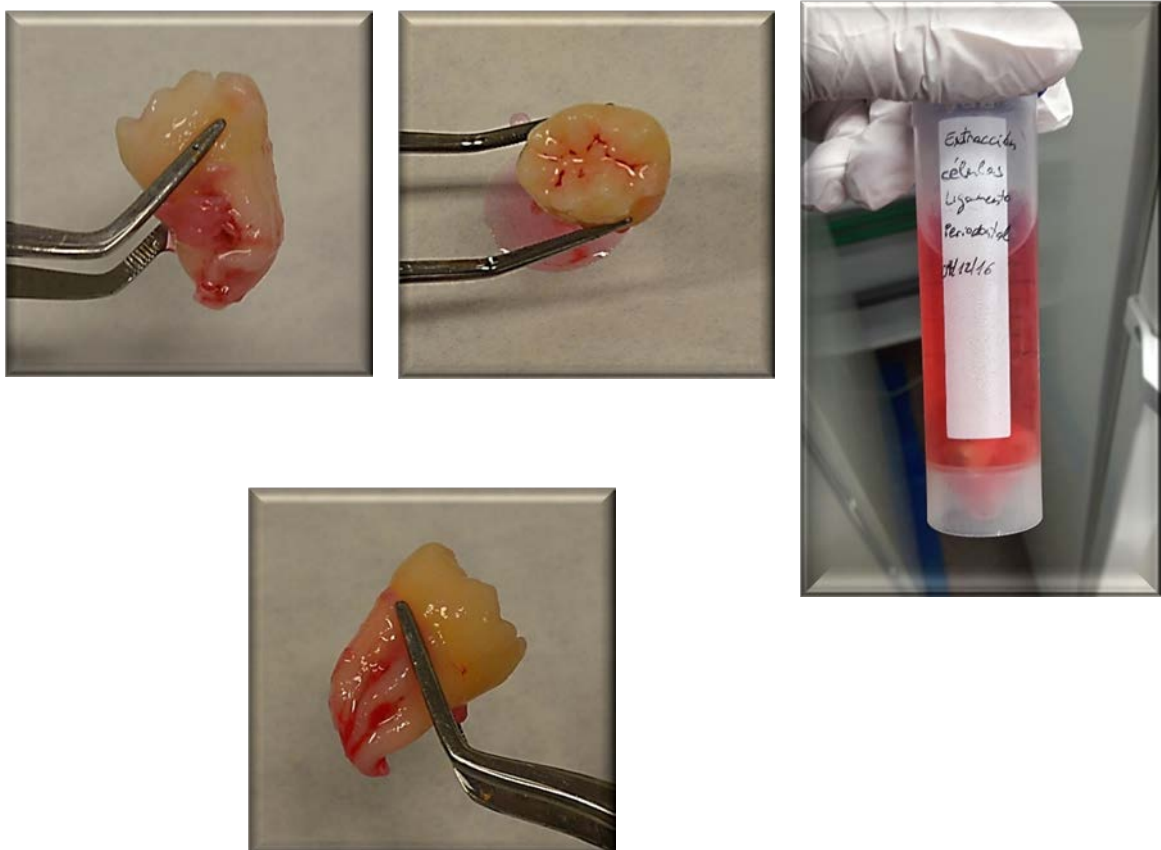


Figura 11. Ejemplo de cordal utilizado y modo de transporte de dientes extraídos en tubo Falcon con MEM.

1.1. Extracción del ligamento periodontal (hPDL)

Para la extracción del ligamento periodontal, se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de cabina de seguridad biológica Clase II A 2, de flujo laminar vertical Clase 10, con recirculación del 70% del aire, equipada con dos etapas de filtración HEPA: (Modelo BIO II A, Telstar).

Los dientes recogidos se depositaron en una placa Petri que contenía tampón fosfato salino (PBS, 0.1M, pH 7,4) y una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina; Sigma-Aldrich) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina b; Sigma-Aldrich).

Para obtener el ligamento periodontal, se rascó con un bisturí el tercio medio y apical de los dientes corono-apicalmente hasta depositar suficientes secciones de sustrato en la placa Petri (Figura 12). Acto seguido, el LP se cambió a un tubo tipo Falcon que se centrifugó durante 10 minutos a 3G (1200rpm). Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

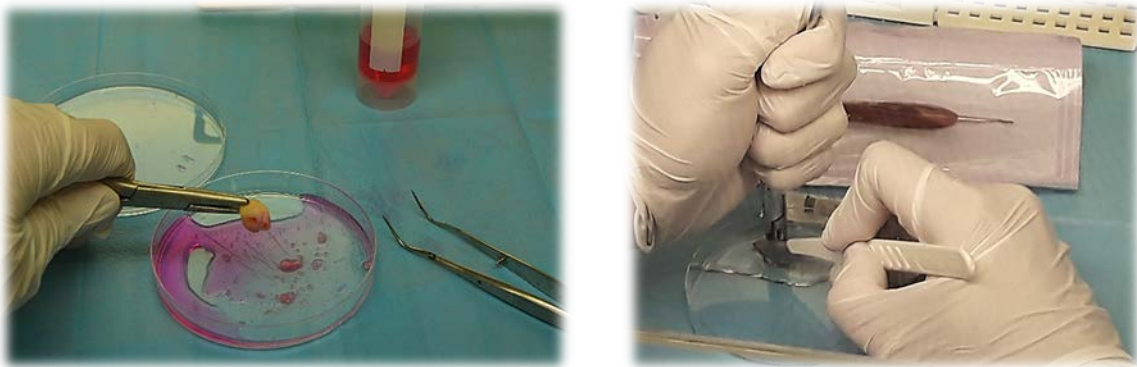


Figura 12. Obtención del LP a partir de los dientes exodonciados en cabina de seguridad biológica Clase II. Se rascó con un bisturí el tercio medio y apical hasta depositar suficiente sustrato en la placa Petri.

1.2. Disgregación enzimática y mecánica

Disgregación enzimática

1. El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: Colagenasa tipo I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora en una incubadora a 37°C.
2. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular MEM muy frío.
3. Se centrifugó durante 10 minutos a 3G (1200rpm)(Figura 13).
4. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina b (250unidades/ml).

Disgregación mecánica

1. Con el fin de eliminar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μm (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 3G.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM.

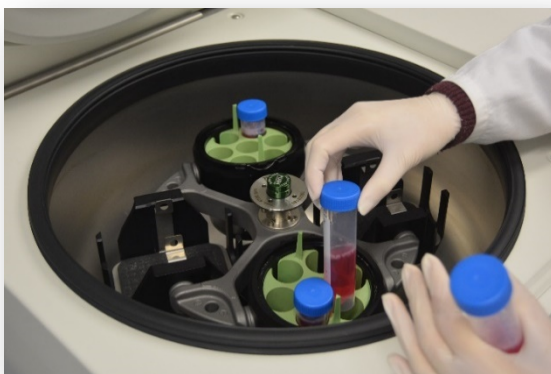


Figura 13. Disgregación mecánica y enzimática.

Las células se sembraron en un frasco de cultivo de 75 cm² con medio de cultivo MEM (Figura 14) y se incubaron en una estufa a 37°C, con una saturación de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. A los 10 días se cambió el medio de cultivo por DMEM completo y se conservaron en la incubadora en condiciones normales. A partir de este momento, se cambió el medio de cultivo cada tres días.

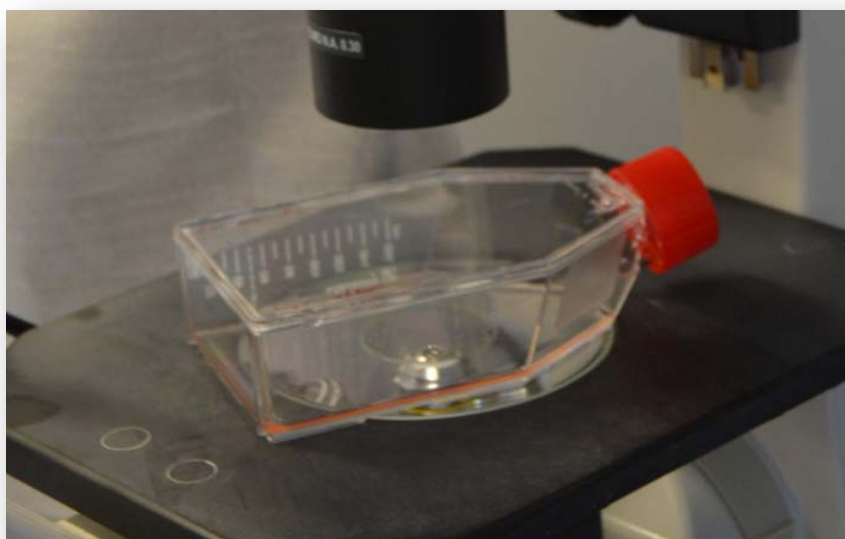


Figura 14. Frasco de cultivo celular ventilado de 75 cm².

1.3. Identificación celular mediante inmunocitofluorescencia

Para confirmar el fenotipo mesenquimático de las células madre del ligamento periodontal aisladas, se estudió la expresión de diferentes marcadores mesenquimáticos mediante inmunocitofluorescencia (Figura 15) siguiendo las pautas marcadas por La Sociedad Internacional de Terapia Celular en 2006 (162). Los anticuerpos utilizados fueron: CD73-ACP (clon AD2), CD90-FITC (clon DG3), CD105-PE (clon43A41E), CD14-PerCP (clon TÜK4), CD20-PerCP(clonLT20.B4), CD34-PerCP (clonAC136) y CD45-PerCP (clone 5B1)- human MSC phenotyping cocktail, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania-.

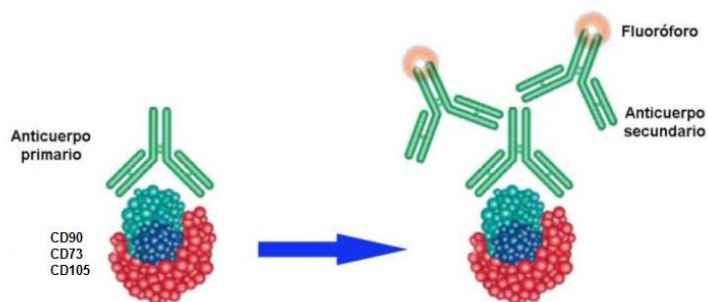


Figura 15. Modelo gráfico de la identificación celular mediante inmunocitofluorescencia.

1.4. Separación, recuento y sembrado de las células.

Para despegar las células del frasco, descartamos el medio de cultivo. Lavamos la superficie del frasco con PBS. Después añadimos 2 mL de tripsina 0,25% con EDTA al 0,25 mM y lo incubamos durante 5 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% HR. Una vez despegadas las células, añadimos 10mL de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) completo, gracias al cual neutralizamos la tripsina. A continuación, transportamos las células suspendidas a un tubo de recogida tipo Falcon para posteriormente centrifugarlo a 300g durante 6 minutos quedando así las células en el fondo del tubo en forma de precipitado. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos el precipitado en DMEM completo. Todos los procedimientos de manipulación de células se realizaron dentro de una cámara de flujo para asegurar las condiciones estériles del medio. Posteriormente procedimos al recuento de células por mililitro.

La suspensión celular se agitó y se depositaron 50µL de la misma en un tubo Eppendorf, al cual se le añadió 50µL de azul tripán, agitándose la mezcla con la misma micropipeta y se transportaron a una cámara de Neubauer o hemocitómetro (Figura 16), donde procedimos al recuento de células. Para esta línea celular necesitamos una muestra de entre 3.500 y 5.000 células, cantidades preestablecidas anteriormente mediante una curva de viabilidad. Procedimos a sembrar las células con DMEM en los pocillos y las dejamos incubando 24 horas dentro de la estufa a 37°C, 5% CO₂ y 95% HR.

En este caso utilizamos una placa de 12 pocillos para la adhesión al disco de cemento, una placa de 96 pocillos para el estudio de proliferación y por último utilizamos un frasco de 75 cm² ventilado para el mantenimiento de las células.

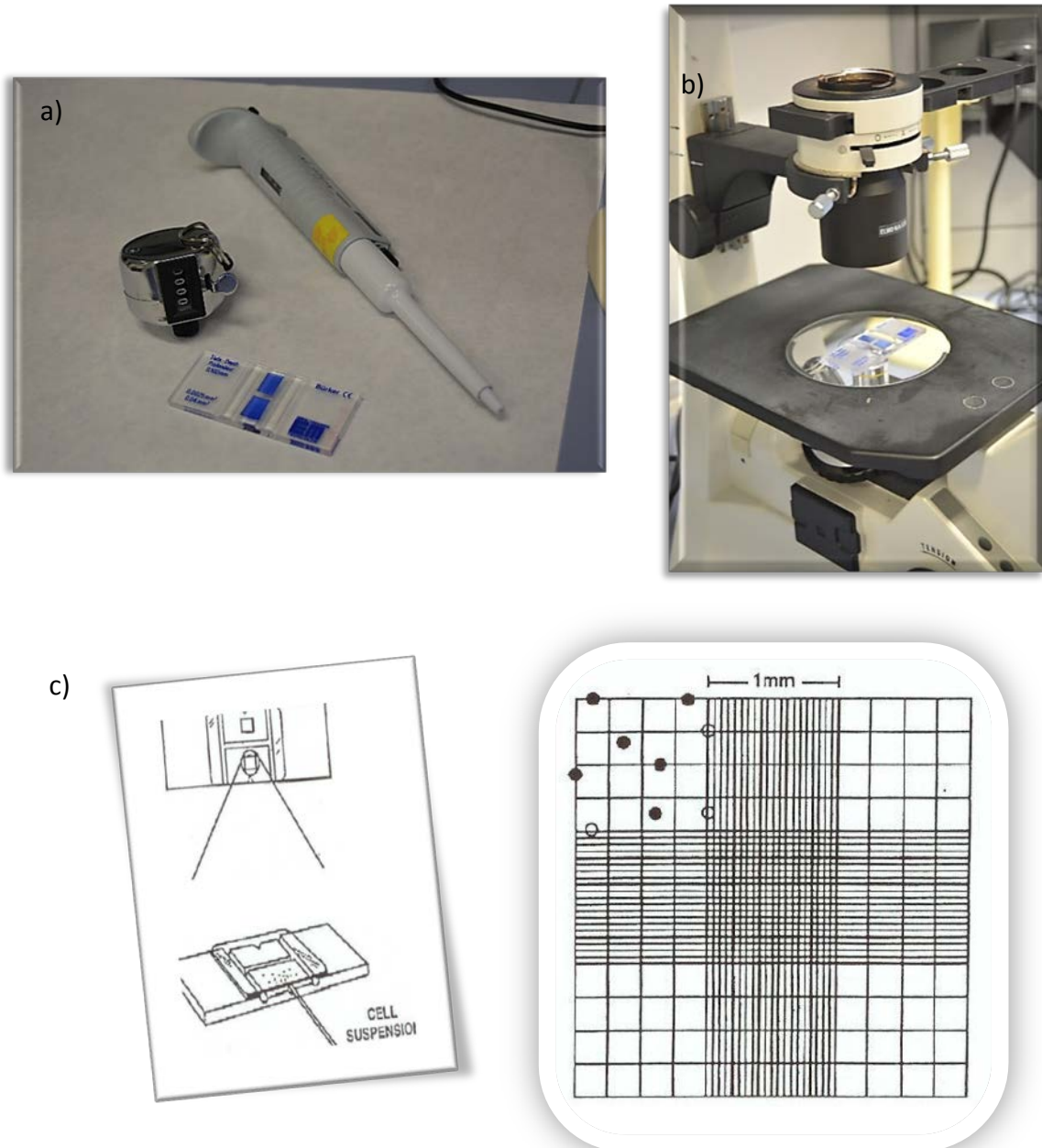


Figura 16. A) y B) Recuento celular manual con azul tripán. **C)** Cámara de Neubauer o hemocitómetro.

2. ENSAYOS EXPERIMENTALES

2.1. Preparación de extractos

La preparación de los extractos se realizó según el protocolo para ensayos de citotoxicidad *in vitro*, establecido dentro de las normas ISO 10993-5 (204)(205). Los cementos AH Plus®(Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemania), MTA Fillapex®(Angelus Industria de Produtos Odontologicos S/A, Londrina, PR, Brasil), GuttaFlow 2®(Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Suiza) y GuttaFlow Bioseal®(Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Suiza) (Figura 17) cuyos componentes están descritos en la tabla 2, se mezclaron según las indicaciones del fabricante y se moldearon discos de 2cm de alto por 3cm de diámetro (Figura 18). Se introdujeron en los pocillos y se colocaron dentro de la cabina de flujo bajo el efecto de la luz UV durante 30min para asegurar su esterilidad.



Figura 17. Cementos endodónticos utilizados

Cemento	Tipo	Casa comercial	Componentes
AH Plus®	Base de resina epoxi	Dentsplay, Alemania	Pasta A: Resina epoxy de Bisfenol-A, Resina epoxy de Bisfenol-F, Tungstenato de calcio, Óxido de zirconio, Sílice, Óxido de Hierro. Pasta B: Dibenzil-diamina, aminoadamantato, triciclo-decano-diamina, Tungstenato de calcio, Óxido de zirconio, Sílice, Aceite de silicona.
MTA Fillapex®	Base de MTA/ Biocerámico	Angelus, Brasil	Resina de salicilato, Resina diluyente, Resina natural, Óxido de Bismuto, Sílica nanoparticulada, Agregado de trióxido mineral.
GuttaFlow 2®	Base de silicona	Coltène/Whaledent, Suiza	Polvo de gutapercha, polidimetilsiloxano, catalizador platino, Dióxido de zirconio, microplata (conservante), colorante.
GuttaFlow Bioseal®	Base de silicona/ Biocerámico	Coltène/Whaledent, Suiza	Polvo de gutapercha, polidimetilsiloxano, catalizador platino, dióxido de zirconio, plata (conservante), colorante, biocerámica bioactiva.

Tabla 2. Tabla de componentes de los cementos utilizados.



Figura 18. Discos de los cementos endodónticos fraguados.

Para emular las condiciones en las que las células de LP interactúan con los cementos endodónticos, se eligió el método de elución, en el que se permite que los componentes de un material, al que llamamos eluente, al contactar con un disolvente, salgan por difusión de forma pasiva, al cual llamamos eluato o extracto. Dicho extracto se aplicó en distintas concentraciones sobre las células.

Tras el fraguado de los discos de cementos, añadimos a cada pocillo (con el disco de cemento en el pocillo) 4mL de medio de cultivo DMEM completo. Dejamos incubando las placas en condiciones normales a 37°C, 5% CO₂ y 95% HR durante 24 horas (Figura 19).

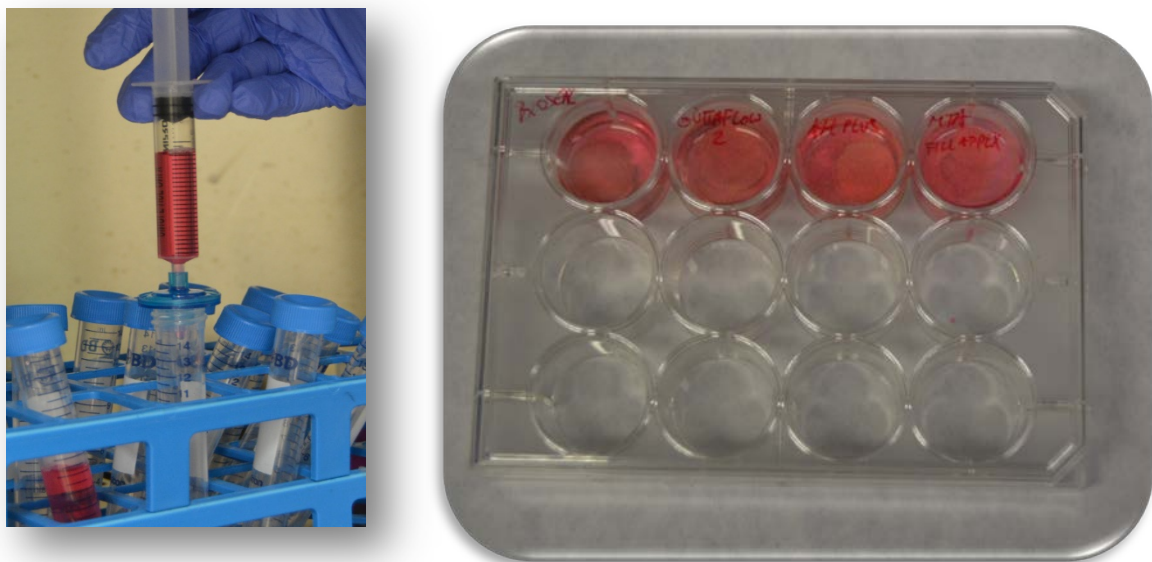


Figura 19. Método de elución para los cementos endodónticos.

Transcurrido el tiempo establecido, retiramos el sobrenadante con el medio de cultivo y lo pasamos por una membrana de microfiltración con tamaño de poro de 0,22 μ m de diámetro para eliminar residuos de los cementos.

Recogimos la solución y la diluimos $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de tal manera que añadimos los eluatos con cemento en tres condiciones: sin diluir, diluidos al 50% y diluidos al 25%. Para cada cemento teníamos 3 columnas y se realizó por triplicado para asegurar la fiabilidad de

los resultados. Repetimos el proceso para cada uno de los tiempos establecidos (24, 48, 72 y 168 horas).

2.2. Ensayo de viabilidad celular MTT

Dentro de los distintos estudios del estado de proliferación de células in vitro, encontramos el ensayo colorimétrico MTT [Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico], desarrollado por Mossman en 1983, en el que se determina si una sustancia tiene efectos sobre la viabilidad celular, a través de las alteraciones que pueda provocar en las actividades de la deshidrogenasa mitocondrial (198).

Este test colorimétrico se basa en la conversión del metiltiazol tetrazolio, soluble, en formazán púrpura insoluble. Este formazán es solubilizado posteriormente y su concentración puede determinarse mediante espectrometría. Es un método rápido y barato para cultivos celulares monocapa (199).

El protocolo que se realizó fue el siguiente:

- 1- Una vez incubadas las muestras, procedimos a retirar el medio de cultivo (medio de cultivo con el cemento), quedando nuestras células adheridas a los pocillos.
- 2- Añadimos 200µL de medio de cultivo DMEM RF⁻ SBF⁻ (incoloro) y 50 µL de MTT (amarillo) por pocillo (Figura 20).
- 3- Incubamos a 37°C, CO₂ del 5% y 95% HR durante 4horas.
- 4- Retiramos el sobrenadante con el MTT, quedando las células adheridas en el fondo de los pocillos.
- 5- Lavamos con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 o 2 lavados. Volvimos a dejar las células adheridas.
- 6- Añadimos 100 µL de dimetil-sulfóxido puro en disolución para romper todas las membranas celulares y así poder liberar los cristales de formazán (Figura 21).



Figura 20. A) Adición del MTT. B) Frasco de dimetil sulfóxido.

7- Se agitó la solución en el espectrofotómetro y se continuó con la lectura de la absorbancia ajustado a dos valores: 570nm (MTT) para el formazán y 690nm para el plástico obteniendo unos resultados numéricos (Figura 22).

Este procedimiento se repitió con cada una de las placas con los tiempos establecidos de 24h, 48h, 72h y 168h.

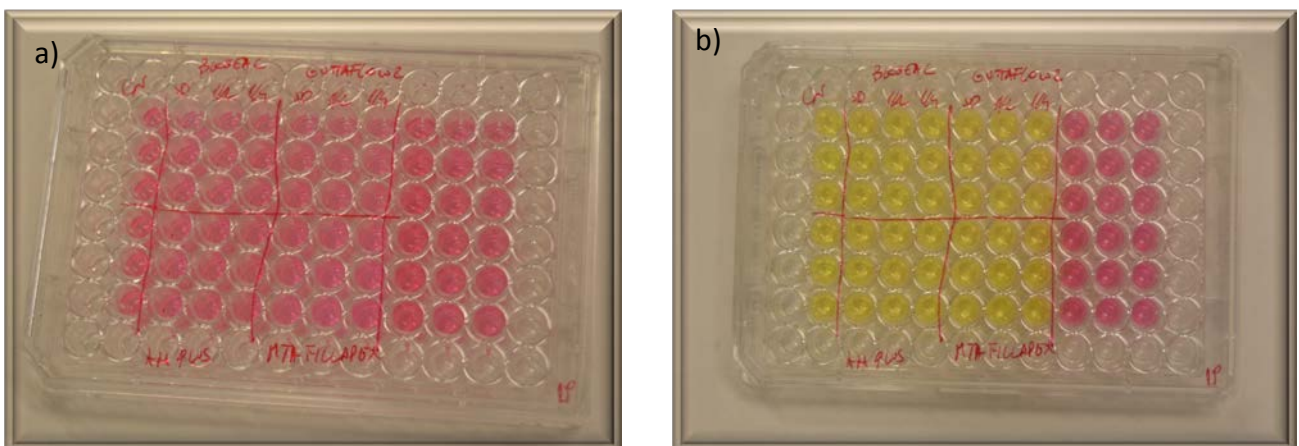


Figura 21. A) Ejemplo de placa de 96 pocillos con células en contacto con los eluatos a distintas diluciones. B) Ensayo MTT.

la protrusión, migran y cierran la herida (Figura 23). La progresión de estos eventos se puede seguir mediante un microscopio óptico(207).

Cuando se realiza una “herida”, la monocapa de células responde a la interrupción del contacto célula-célula e incrementa su concentración de factores de crecimiento en el borde marginal de la herida para producir una “curación” de la herida mediante la combinación de proliferación y migración. Este proceso refleja el comportamiento individual de la célula y del aglomerado celular ante la formación de tejido (207).

Dentro de los pasos básicos tenemos la creación de la herida, la captura de imagen en el momento de la herida y en periodos de tiempo consecutivos hasta el cierre de la herida (208).

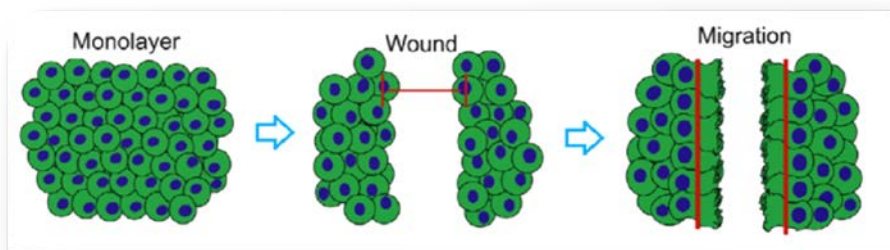


Figura 23. Esquema del ensayo de migración (206).

PROTOCOLO ENSAYO DE MIGRACIÓN

El protocolo utilizado fue el siguiente(209):

- Tras levantar las células, se hizo un recuento celular en la cámara de Neubauer y se determinó la cantidad de células a sembrar. Se sembraron las células en 4 placas de 12 pocillos (una para cada cemento + el control), con DMEM completo y se dejaron en la incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95% HR hasta que las células alcanzaron el 80% de confluencia en monocapa.
- Se realizó una herida o “scratch wound” siguiendo la técnica de “woundhealing” en el centro de cada pocillo y se desechó el medio de cultivo. Se añadió el eluente obtenido con cada uno de los cementos selladores y en diluciones 1/1, ½ y ¼ excepto para el control que simplemente se cambió el

medio con DEMEM completo. El procedimiento se realizó por triplicado. Las placas se incubaron en condiciones normales (Figura 24).

- Se observó el progreso del cierre de la herida bajo microscopio óptico y se tomaron imágenes del proceso a las 0, 24 y 48 horas. Dichas imágenes se analizaron con el programa Image J®, determinando el porcentaje de área sin cerrar.

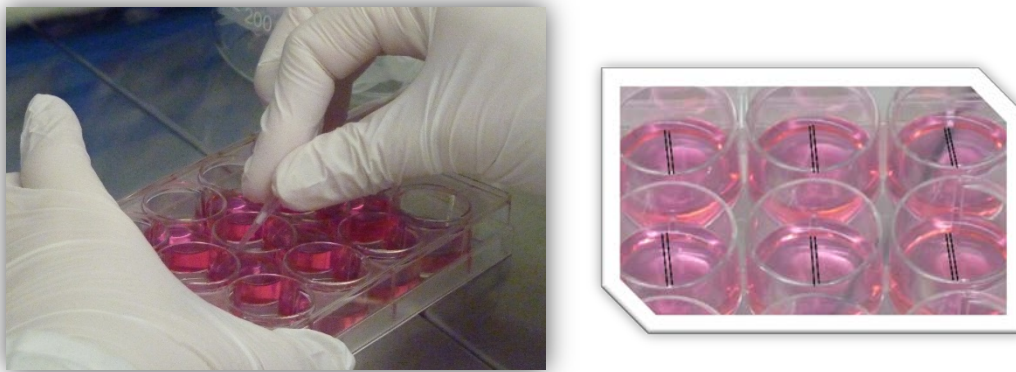


Figura 24. Técnica “wound healing” para realizar ensayo de migración.

2.4 Caracterización de los eluentes: Ensayos de pH, osmolaridad e ICP MS.

Se prepararon discos de cemento de 2cm de alto por 3cm de diámetro y se dejaron fraguar en la incubadora a 37°C en condiciones normales. Se sumergieron en solución salina balanceada de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio durante 24 horas.

El pH de HBSS y de HBSS tras el contacto con los cementos se realizó por triplicado en un medidor de pH (GLP21+, Crimson, Barcelona, Spain)(Figura 25)(210, 211).

La osmolaridad de HBSS y de HBSS tras el contacto con los cementos se determinó directamente en un osmómetro de 10 μ L of HBSS (Wescor Vapro 5520, Utah, USA). El análisis de la presencia de silicón, fosfato, calcio y estroncio se realizó utilizando un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Agilent 7900, Stockport, UK) (Figura 26)(212, 213).

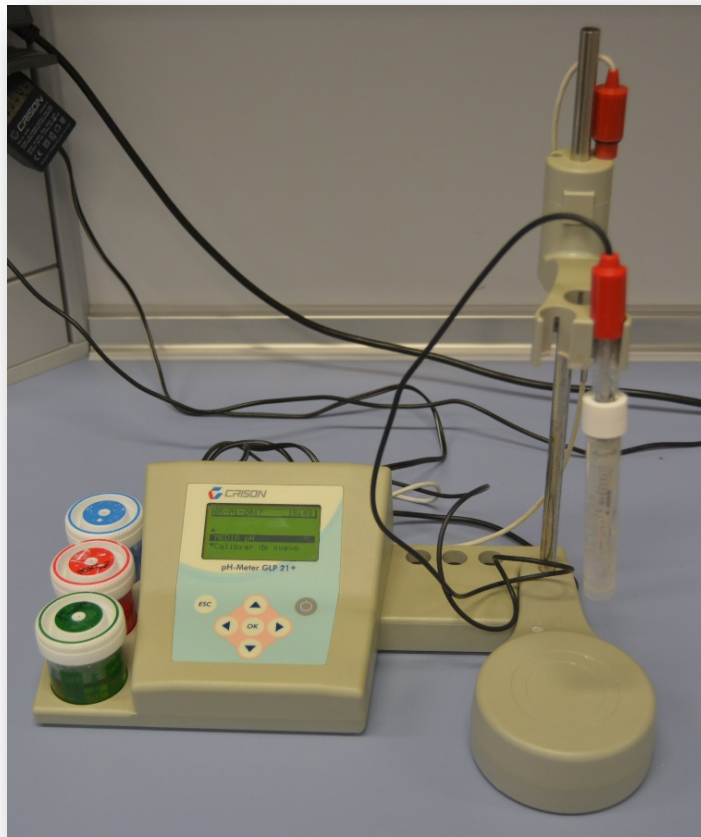


Figura 25. Medidor de pH modelo GLP21+.

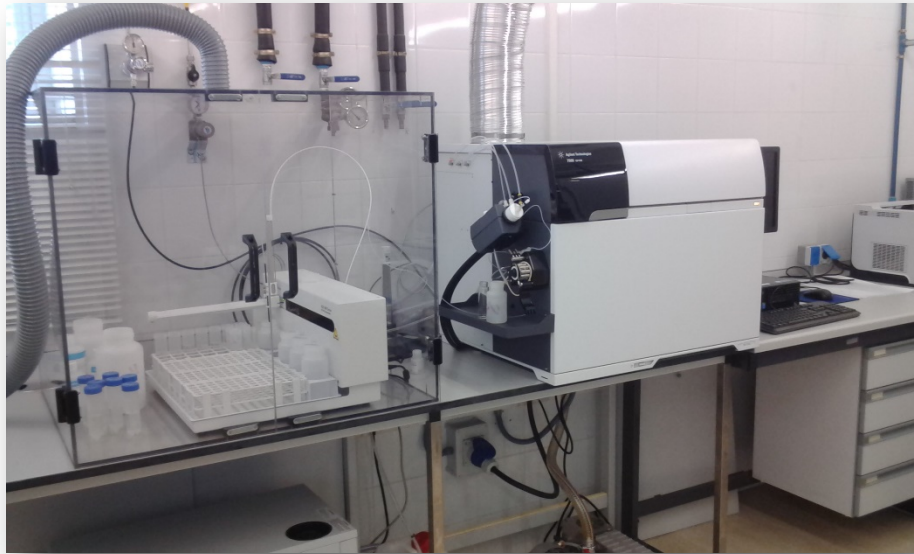


Figura 26. Espectrómetro para ICP-MS Agilent 7900, Stockport, UK

2.5 Microscopía electrónica de Barrido (MEB):

2.5.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB): morfología celular y adhesión a los cementos

Con la observación de las muestras al contacto con los cementos bajo microscopio electrónico de barrido, podemos determinar si se produce un fenómeno de adhesión celular al material que estamos estudiando, y a su vez analizar de manera microscópica la superficie de los cementos.

La adhesión celular es fundamental para la unión individual de las células en los tejidos de manera tridimensional. Se conocen diferentes sistemas de adhesión sujetos a regulación, pero el sistema más estudiado y comprendido es aquel formado por las integrinas y las cadherinas. Las fuerzas adhesivas derivadas de los receptores de adhesión o mediante los procesos que dependen del citoesqueleto, son cruciales para una adhesión fuerte, un crecimiento controlado y la motilidad celular (214).

La formación de contactos íntimos y extensivos entre células o entre célula y matriz, resulta de una cooperación entre los sistemas adhesivos y el citoesqueleto de actina y

la generación de fuerzas a lo largo de la célula. Así, las interacciones celulares estables son necesarias para mantener una integridad estructural, y los cambios de manera dinámica en la adhesión celular participan en la morfogénesis del desarrollo tisular. Los mecanismos de adhesión se regulan durante la morfogénesis tisular y están íntimamente relacionados con los procesos de motilidad y migración. En particular, las cadherinas y las integrinas están implicadas en el control del movimiento celular (215).

Las muestras se prepararon en el edificio LAIB de la Universidad de Murcia, donde fueron sometidas a los siguientes procesos:

1. Se eliminó el sobrenadante de las muestras y se lavaron con PBS.
2. Se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio con sacarosa 0,1M de 3-5 horas.
3. Se retiró el fijador en frío y se añadió el lavador (tampón cacodilato de sodio con sacarosa) durante una noche.

Posteriormente, las muestras se trasladaron al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) en el Campus de Espinardo para ser procesadas y preparadas para su observación con el microscopio electrónico de superficie (SEM). El procesado fue el siguiente:

1. Contrastado de la muestra con tetróxido de osmio al 1% durante 1-2h.
2. Lavado con tampón cacodilato con sacarosa y su asentamiento durante 12h (Una noche).
3. Deshidratación en acetona al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 20' con cada concentración de forma sucesiva.
4. Se llevaron al punto crítico con acetona al 100% y CO₂ líquido en una cámara de secado de punto crítico Leica EM CPD030 (Figura 27).
5. Se aplicó un recubrimiento de oro mediante la técnica de "sputtering" en el metalizador 134 Bio RAD Polaron SEM COATEM SYSTEM E5100 (Hercules, California) (Figura 28).
6. Tras ello, las muestras se observaron bajo microscopio electrónico de barrido (Jeol 6100 EDAX, USA) (Figura 29) con un voltaje operativo de 30 kV y se tomaron imágenes con el sistema de captación autobeam del sistema de

microanálisis INCA X-Stream and mics de OXFORD Instruments Analytical en magnificaciones de X200, X800 y X2000.



Figura 27. Cámara de secado de punto crítico Leica EM CPD030.



Figura 28. A) Metalizador 134 Bio RAD Polaron SEM COATEM SYSTEM E5100 **B)** Muestras recubiertas de oro mediante la técnica de “sputtering”.

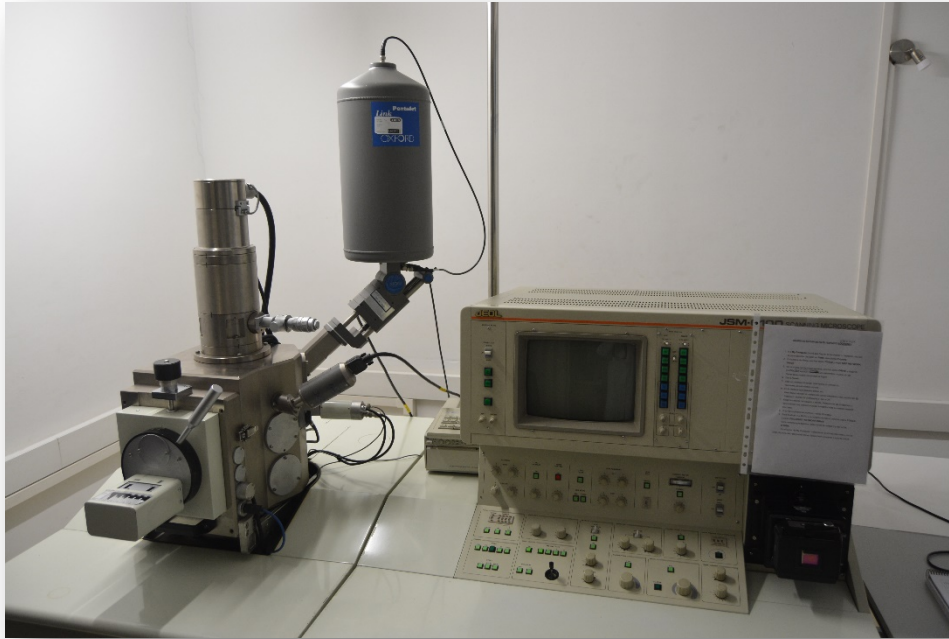


Figura 29. Microscopio electrónico de barrido (Jeol 6100 EDAX, USA).

2.5.2 Microscopía electrónica de barrido con espectrometría dispersiva de rayos X (MEB EDS): Caracterización de los cementos endodónticos.

El espectro de rayos X emitido por un espécimen permite llevar a cabo una medida cualitativa (medida del rango de cada rayo X emitido que es característico de cada elemento) y una medida cuantitativa (la medida de la cantidad de rayo X que se emite por segundo nos dice qué cantidad de elemento está presente). Así, podemos caracterizar un material sólido mediante espectrometría de rayos X (216)(217).

El protocolo para la caracterización de los cementos endodónticos fue el siguiente (218)(219):

Las muestras se prepararon en el laboratorio de investigación biosanitaria (LAIB) de la Universidad de Murcia, donde fueron sometidas a los siguientes procesos:

1. Se eliminó el sobrenadante de las muestras y se lavaron con PBS.
2. Se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio con sacarosa 0,1M de 3-5 horas.

3. Se retiró el fijador en frío y se añadió el lavador (tampón cacodilato de sodio con sacarosa) durante una noche.

Posteriormente, las muestras se trasladaron al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) en el Campus de Espinardo para ser procesadas y preparadas para su observación con el microscopio electrónico de superficie (SEM). El procesado fue el siguiente:

7. Contrastado de la muestra con tetróxido de osmio al 1% durante 1-2h.
8. Lavado con tampón cacodilato con sacarosa y su asentamiento durante 12h (Una noche).
9. Deshidratación en acetona al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 20' con cada concentración de forma sucesiva.
10. Se llevaron al punto crítico con acetona al 100% y CO₂ líquido en una cámara de secado de punto crítico Leica EM CPD030.
11. Se aplicó un recubrimiento de carbón en la unidad CC7650 SEM Carbon Coater (Figura 30).
12. Las muestras fueron analizadas por el sistema de captación de rayos X incorporado en el microscopio electrónico de barrido Jeol 6100 EDAX (USA).



Figura 30. A) unidad CC7650 SEM Carbon Coater B) Muestras recubiertas con carbón.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 22.0) para Windows y Microsoft Office Excel 2007® en los que se realizaron los siguientes procedimientos estadísticos.

Estadística descriptiva:

Se agruparon un conjunto de datos de tipo numérico estructurados en tres columnas correspondiendo, cada una de ellas, con los valores de absorbancia para las distintas diluciones realizadas para cada cemento. Con ello obtuvimos los valores estadísticos descriptivos habituales (valores medios, errores típicos, medianas, varianzas, etc.) para la realización de la estadística inferencial. Se realizaron pruebas de normalidad mediante el test Shapiro-Wilk para determinar si los datos encajaban en el modelo de distribución de probabilidad normal (gaussiana).

Estadística inferencial:

Para el análisis comparativo de las variables se consideró 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 valor llamado “valor-p” no sea superior al nivel crítico estándar de 0,05. Para la comparación de grupos se utilizó un test ANOVA de un factor y el test de Bonferroni. Mediante el test de t-Student se corroboraron las diferencias significativas entre los cementos.

V – RESULTADOS

1. AISLAMIENTO CELULAR.

Tras la separación y sembrado del pellet celular de ligamento periodontal en el frasco de cultivo ventilado de 75 cm³, provisto de medio de cultivo, se esperaron 10 días para ver células del ligamento adheridas a la base del frasco. A los 15 días se observaron colonias de células originadas a partir de la división de las mismas. Alrededor de los 20 días se evidenció entre un 80 y un 90% de confluencia en el frasco de cultivo (Figura 31).

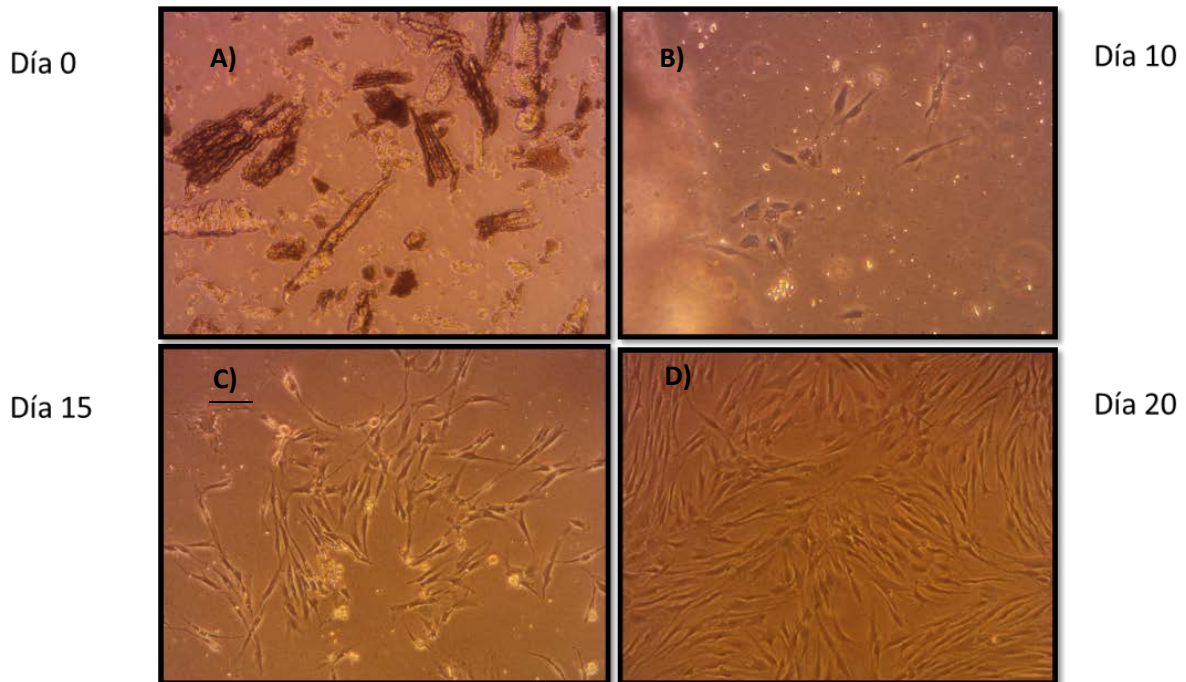


Figura 31. Evolución en tiempo del sembrado y confluencia celular. A) Pellet celular del ligamento periodontal día 0. B) Primeras células se adhieren al frasco día 10. C) Ya vemos colonias de células adheridas y dividiéndose día 15. D) Observamos confluencia de un 80-90% día 20.

1.1. Identificación celular mediante inmunocitofluorescencia.

Antes de evaluar el comportamiento de las células cultivadas en contacto con discos de los cementos endodónticos o extractos, las células madre de ligamento periodontal (hPDLSCs) se caracterizaron fenotípicamente mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para CD73, CD90 y CD105 para los cuales se expresaron de manera positiva un porcentaje mayor al 95% (a), (b) y (c). Los resultados fueron negativos para los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (d) (Figura 32)(162).

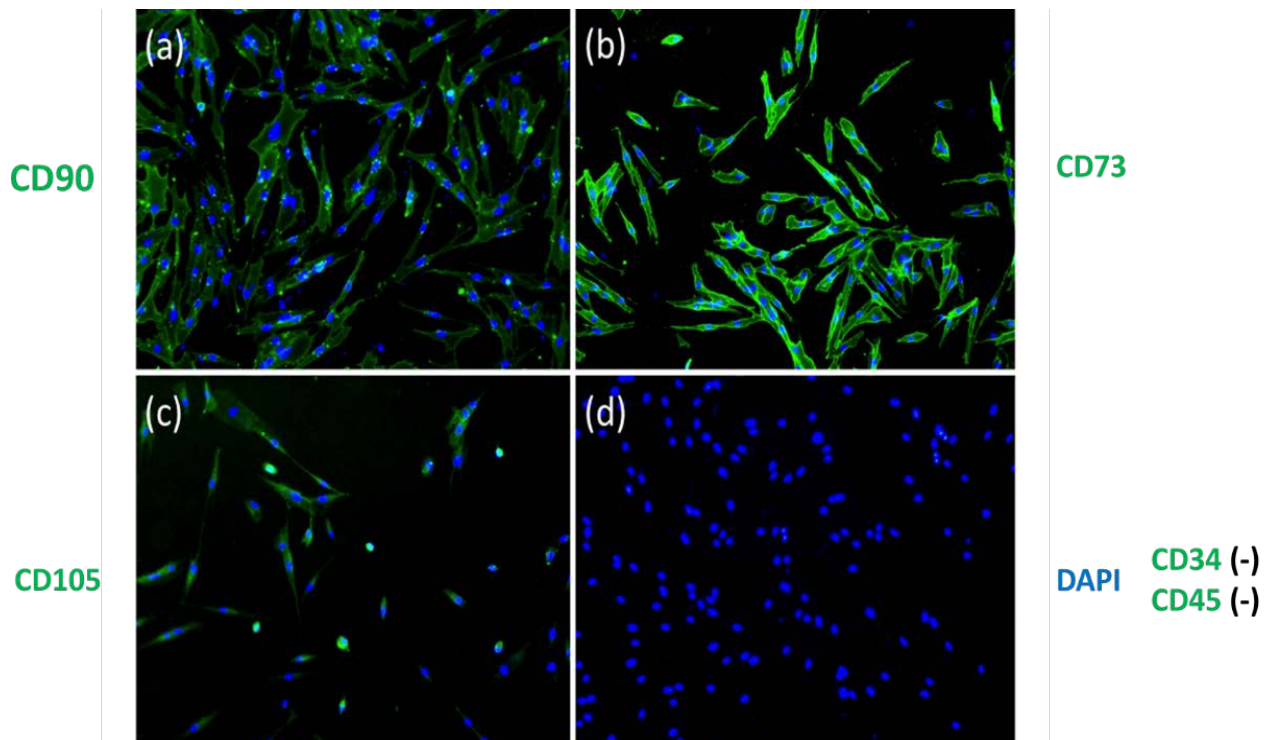


Figura 32. Inmunocitofluorescencia para la identificación de las hPDLSCs. A) Positivo para el marcador CD 90. B) Positivo para el marcador CD 73. C) Positivo para el marcador CD 105. D) Negativo para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45.

2. ENSAYOS EXPERIMENTALES

2.1. Ensayo de viabilidad celular MTT.

La lectura de los datos de absorbancia se realizó mediante el espectrofotómetro y mediante programa informático se obtuvieron los resultados numéricos, mostrados en las tablas de 3 a 6.

24 horas	Bioseal			GuttaFlow 2		
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
0,45539999	0,475499988	0,453700006	0,461400002	0,463200003	0,403600007	0,476300001
0,464599997	0,468600005	0,422500014	0,444499999	0,448799998	0,42750001	0,480500013
0,499300003	0,46419999	0,457899988	0,478399992	0,448399991	0,441000015	0,462300003
0,473500013	0,0605	0,436199993	0,449900001	0,0601	0,045600001	0,390700012
0,461100012	0,059999999	0,442499995	0,463699996	0,052499998	0,046399999	0,378699988
0,467000008	0,057999998	0,470699996	0,466600001	0,0572	0,048799999	0,363499999
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
	AH Plus			MTA Fillapex		

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos a las 24 horas.

48 horas	Bioseal			GuttaFlow 2		
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
0,480399996	0,451700002	0,453900009	0,448599994	0,458600014	0,38319999	0,434199989
0,451099992	0,417299986	0,427700013	0,448000014	0,461499989	0,386400014	0,443599999
0,474700004	0,430299997	0,440299988	0,459399998	0,437400013	0,388200015	0,436300009
0,547299981	0,0374	0,4111	0,449699998	0,057500001	0,044399999	0,305599988
0,470400006	0,041999999	0,459300011	0,432500005	0,0502	0,044300001	0,296799988
0,515999973	0,038699999	0,43810001	0,519999981	0,054000001	0,059	0,320499986
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
	AH Plus			MTA Fillapex		

Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos a las 48 horas.

72 horas	Bioseal			GuttaFlow 2		
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
0,621299982	0,548200011	0,530799985	0,523100019	0,533299983	0,456200004	0,494599998
0,634199977	0,546999991	0,476500005	0,468300015	0,513599992	0,444999993	0,518700004
0,682900012	0,519299984	0,507799983	0,497399986	0,498899996	0,44600001	0,529999971
0,587499976	0,0418	0,381399989	0,548900008	0,0561	0,044399999	0,290399998
0,582700014	0,041000001	0,391099989	0,539799988	0,0561	0,046999998	0,286199987
0,671599984	0,0394	0,440699995	0,585300028	0,059	0,051199999	0,250200003
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
AH Plus			MTA Fillapex			

Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos a las 72 horas.

168 horas	Bioseal			GuttaFlow 2		
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
1,052700043	1,373600006	1,576300025	1,315500021	0,950600028	0,7852	0,707499981
0,996900022	1,48269999	1,695199966	1,45480001	0,993200004	0,848500013	0,797900021
0,972100019	1,455199957	1,636299968	1,627400041	1,017799973	0,854700029	0,753000021
0,947300017	0,081799999	0,080200002	1,00880003	0,079800002	0,353399992	0,68690002
0,869499981	0,083999999	0,083999999	0,954999983	0,085699998	0,382699996	0,784399986
0,991299987	0,088100001	0,084100001	0,93629998	0,072800003	0,390199989	0,749100029
Control	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Sin diluir	Dilución 1/2	Dilución 1/4
AH Plus			MTA Fillapex			

Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidos a las 168 horas.

A partir de los valores estadísticos descriptivos, se realizaron las pruebas de normalidad mediante el test Shapiro-Wilk. Con éste test, comprobamos que las variables de absorbancia en todos los grupos se comportan de manera normal ($\alpha=0,05$). Con el test ANOVA de un factor vimos que existían diferencias estadísticamente significativas entre el control y los cementos. A partir de la t-Student se realizó la comparativa entre todos los cementos y su significancia ($P<0,05$, $P<0,01$), $p<0,001$) recogida en la tabla 7.

Cementos	24 horas			48 horas			72 horas			168 horas		
	Sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4
Bioseal vs Guttaflow 2	0,05310393	0,25658618	0,35986154	0,19792695	0,00207945	0,0403791	0,17057897	0,02562864	0,39228721	2,07E-06	1,43E-06	0,00576889
					**	*		*		***	***	**
Bioseal vs AH plus	2,76E-08	0,75715468	0,9076119	2,61E-06	0,79228773	0,61894522	7,85E-07	0,01413273	0,0427967	0,00029695	3,89E-05	0,00161339
	***			***			***	*	*	***	***	**
Bioseal vs MTA fillapex	5,10E-08	3,76E-06	0,00262116	3,18E-06	1,67E-06	5,13E-05	9,06E-07	8,60E-06	0,0004089	2,08E-06	4,02E-06	0,00155217
	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	**
Guttaflow 2 vs AH plus	1,47E-07	0,16602408	0,16049115	7,29E-07	0,02312785	0,3365635	1,18E-06	0,07538834	0,06633064	1,36E-06	4,70E-06	0,00324712
	***			***	*		***			***	***	**
Guttaflow 2 vs MTA fillapex	1,98E-07	4,28E-06	0,0005764	9,16E-07	3,15E-07	6,36E-05	1,36E-06	6,46E-08	0,00013195	0,27947872	1,32E-05	0,00320382
	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	**
AH plus vs MTA fillapex	0,28339116	2,92E-06	0,00093461	0,00444452	1,26E-05	0,00445183	0,00016691	4,23E-05	0,00011607	1,40E-06	5,31E-05	0,75951432
		***	***	**	***	**	***	***	***	***	***	

*= p<0,05 **= p<0,01 ***= p<0,001

Tabla 7. Comparativa mediante t-Student entre todos los cementos y su significancia (P<0.05, P<0.01), p<0.001).

Los resultados de la proliferación de las células madre del ligamento periodontal tras el contacto con los eluatos de los cementos endodónticos estudiados (sin diluir, dilución ½, dilución ¼) medidos a las 24, 48, 72 y 168 horas de incubación, se muestran en las figuras 32,33 y 34. Se consideró como grupo control las hPDLSCs cultivadas sin contacto con los eluatos de los cementos. La absorbancia en el espectrofotómetro se ajustó a 570 nm, representada en el eje de ordenadas o eje Y. En el eje de abscisas, queda representada la viable del tiempo en horas (eje X).

Cuando se utilizaron los cementos sin diluir, tanto AH Plus® como MTA Fillapex® indujeron una reducción significativa del porcentaje de viabilidad celular en todos los tiempos respecto al grupo control (***=p<0.001), mientras que los eluatos de GuttaFlow 2® y GuttaFlow Bioseal® obtuvieron resultados similares al control en casi todos los tiempos excepto GuttaFlow Bioseal® que mostró un incremento significativo de la viabilidad celular a las 168 horas con respecto al grupo control (***=p<0.001) (Figura 33) (Tabla 8).

SIN DILUIR				
	24h	48h	72h	168
Control	0,47015	0,48998333	0,63003332	0,97163334
Bioseal	0,46943333	0,4331	0,53816666	1,43716665
GuttaFlow2	0,45346666	0,45250001	0,51526666	0,9872
AH Plus	0,0595	0,03936667	0,04073333	0,08463333
MTA Fillapex	0,0566	0,0539	0,05706667	0,07943333

Tabla 8. ANOVA de un factor para los valores de absorbancia sin diluir.

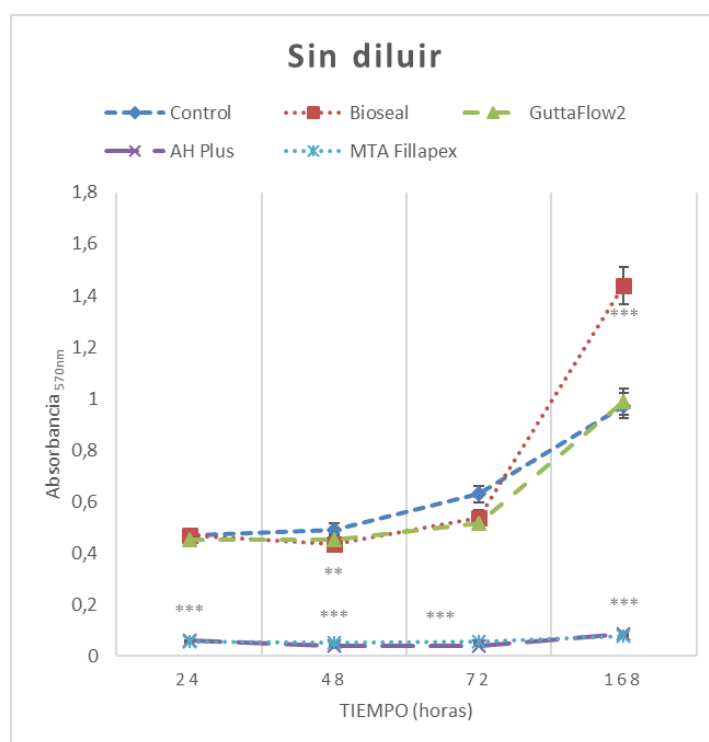


Figura 33. Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT sin diluir. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.

En presencia de la dilución 1/2, MTA Fillapex obtuvo los resultados de viabilidad celular más bajos con respecto al control en todos los tiempos (***)= $p < 0.001$). Tanto AH Plus como GuttaFlow Bioseal obtuvieron resultados similares al control a las 48

horas. GuttaFlow 2 a las 48 horas obtuvo un ligero, pero significativo descenso de la viabilidad celular (**=P<0.01) y AH Plus a las 72 horas (***=p<0.001). A las 168 horas, tanto AH Plus como MTA Fillapex mostraron un descenso significativo de la viabilidad celular (***=p<0.001), GuttaFlow 2 mostró niveles similares al control y por último, GuttaFlow Bioseal mostró un elevado incremento de la viabilidad celular de manera significativa y notoria con respecto al control (***=p<0.001) (Figura 34) (Tabla 9).

DILUCIÓN 1/2				
	24h	48h	72h	168h
Control	0,47015	0,48998333	0,63003332	0,97163334
Bioseal	0,4447	0,44063334	0,50503332	1,63593332
GuttaFlow2	0,42403334	0,38593334	0,44906667	0,82946668
AH Plus	0,44979999	0,43616667	0,40439999	0,08276667
MTA Fillapex	0,04693333	0,04923333	0,04753333	0,37543333

Tabla 9. ANOVA de un factor para los valores de absorbancia para la dilución ½.

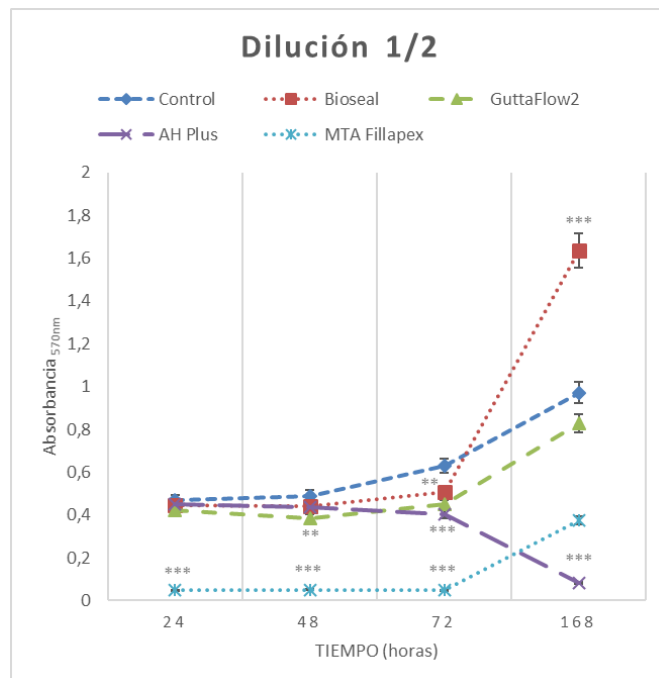


Figura 34. Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT con dilución 1/2. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.

DILUCIÓN 1/4				
	24h	48h	72h	168h
Control	0,47015	0,48998333	0,63003332	0,97163334
Bioseal	0,46143333	0,452	0,49626667	1,46590002
GuttaFlow2	0,47303334	0,43803333	0,51443332	0,9667
AH Plus	0,46006667	0,46739999	0,55800001	0,75280001
MTA Fillapex	0,37763333	0,30763332	0,2756	0,74013335

Tabla 10. ANOVA de un factor para los valores de absorbancia para la dilución 1/4.

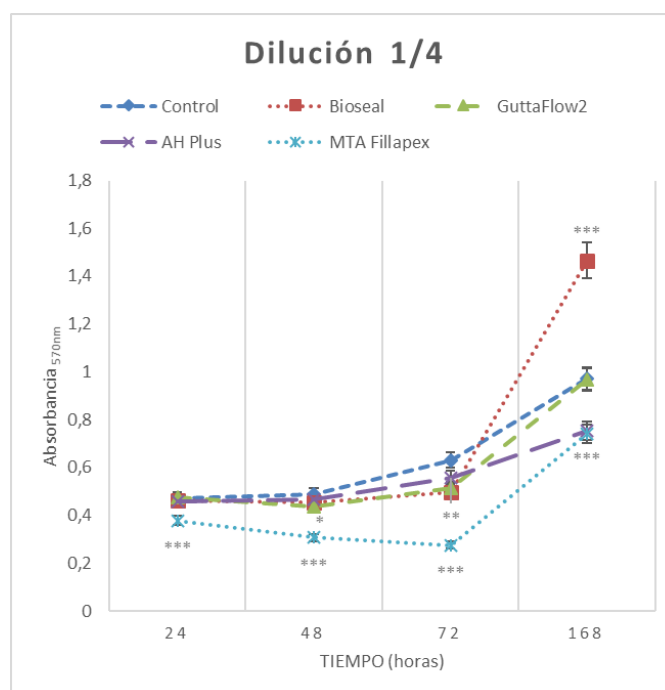


Figura 35. Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT con dilución 1/4. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.

Para la dilución 1/4, MTA Fillapex continuó mostrando los niveles más bajos de viabilidad celular con respecto al control (***=p<0.001) mientras que el resto de cementos mostraron niveles similares por debajo de los niveles del control, aunque significativos (*=p<0.05; **=p<0.01), excepto GuttaFlow 2 a las 168 horas con niveles

similares al control y fundamentalmente GuttaFlow Bioseal a las 168 horas con un incremento significativo de la viabilidad celular con respecto al control (***)= $p < 0.001$) (Figura 35) (Tabla 10).

Tras analizar individualmente cada una de las anteriores gráficas, podemos concluir en este apartado que el cemento GuttaFlow Bioseal mostró unos niveles superiores de viabilidad celular en todas las diluciones, con respecto al control, destacando a las 168 horas siendo la diferencia muy significativa. En contraposición, el cemento MTA Fillapex mostró unos niveles de viabilidad celular muy inferiores con respecto al control, en todos los tiempos y en todas las diluciones. GuttaFlow Bioseal y AH Plus mantuvieron unos niveles casi similares al control, siendo GuttaFlow 2 el más similar al control en todos los tiempos y diluciones y destacándose que con AH Plus, a mayor dilución del mismo, mejores niveles de viabilidad celular se mostraban

2.2. Ensayo de migración celular.

El ensayo de migración celular se realizó siguiendo la técnica de “wound healing”, en el que podemos comparar la capacidad de las células de cerrar una solución de continuidad sin estar expuestas a las sustancias que queremos estudiar (control) con respecto a las células que si lo están.

En las siguientes figuras, el control se representa en la parte superior a las 0, 24 y 48 horas. Debajo de estas tres imágenes se comparan los mismos tiempos con las diluciones sin diluir, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$.

En la figura 36 podemos ver la comparativa entre el control y GuttaFlow Bioseal. Se observa que, a las 24 horas, en todas las diluciones, con GuttaFlow Bioseal se evidencia casi un cierre completo de la herida. A las 48 horas, la herida en el control está cerrada y con GuttaFlow Bioseal también.

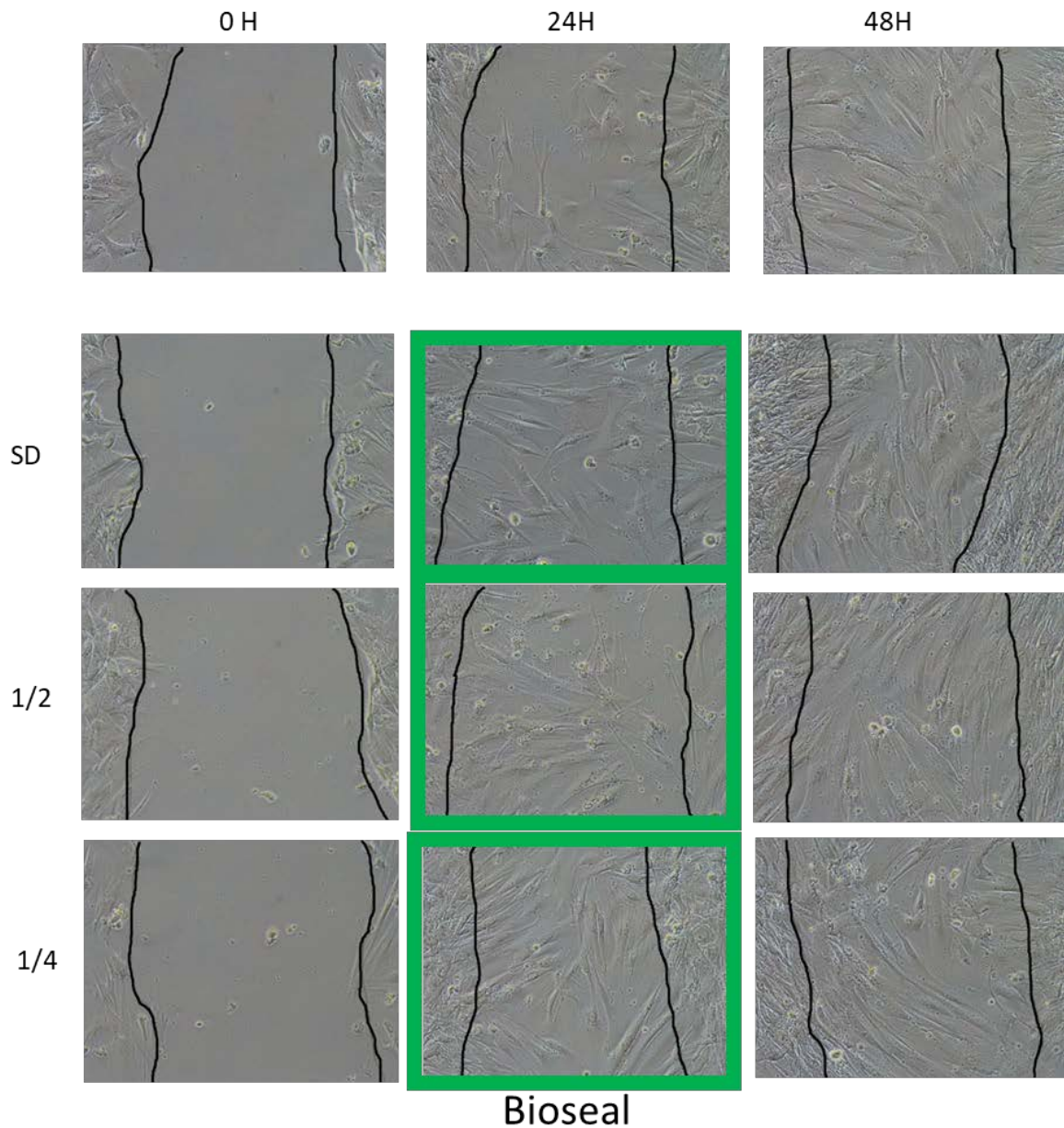


Figura 36. Comparativa de migración GuttaFlow Bioseal vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.

En la figura 37 se comparó el control con GuttaFlow 2. Observamos que a medida que diluimos el cemento, se produce un incremento del cierre de la herida, que se puede observar a partir de las 24 horas. Por tanto, GuttaFlow 2 a dosis reducidas promueve la migración celular, cuando lo comparamos con el control. En dilución $\frac{1}{2}$ y dilución $\frac{1}{4}$, a las 24 horas se puede ver casi el cierre de la herida, aumentando la velocidad de curación.

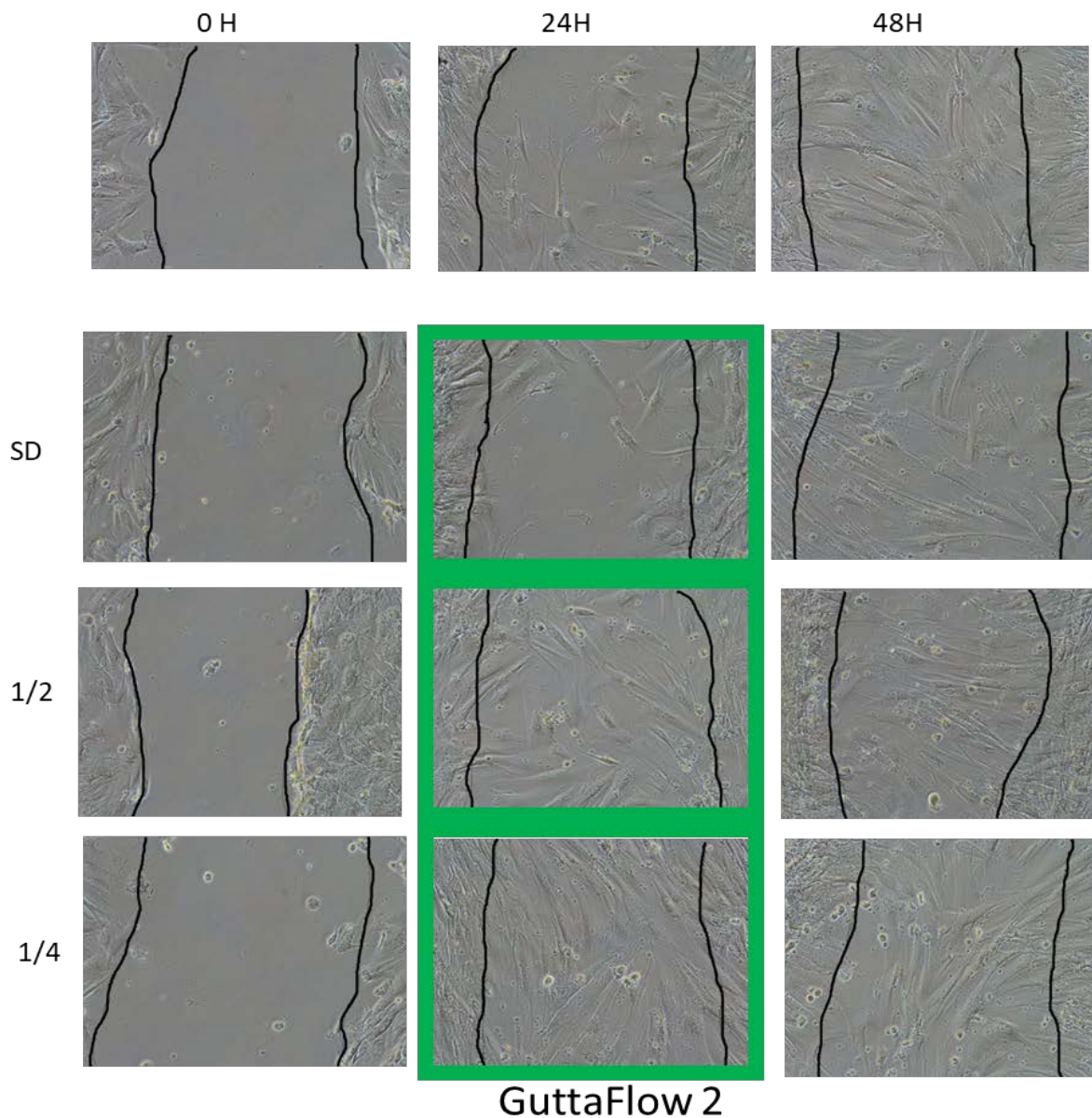


Figura 37. Comparativa de migración GuttaFlow 2 vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.

En la figura 38 se comparó la muestra de MTA Fillapex con el control. Se observa un cierre normal de la herida en el control con una morfología acorde. En las imágenes con MTA Fillapex se aprecia que tanto en la situación sin diluir como dilución $\frac{1}{2}$, las células a 24 y 48 horas se dividen, pero con una morfología más redondeada, lo que hace pensar que se adhieren peor y no se dividen adecuadamente, no cerrando así la

herida. En la dilución $\frac{1}{4}$ vemos algunas células adheridas, pero no vemos cierre de la herida a las 48 horas.

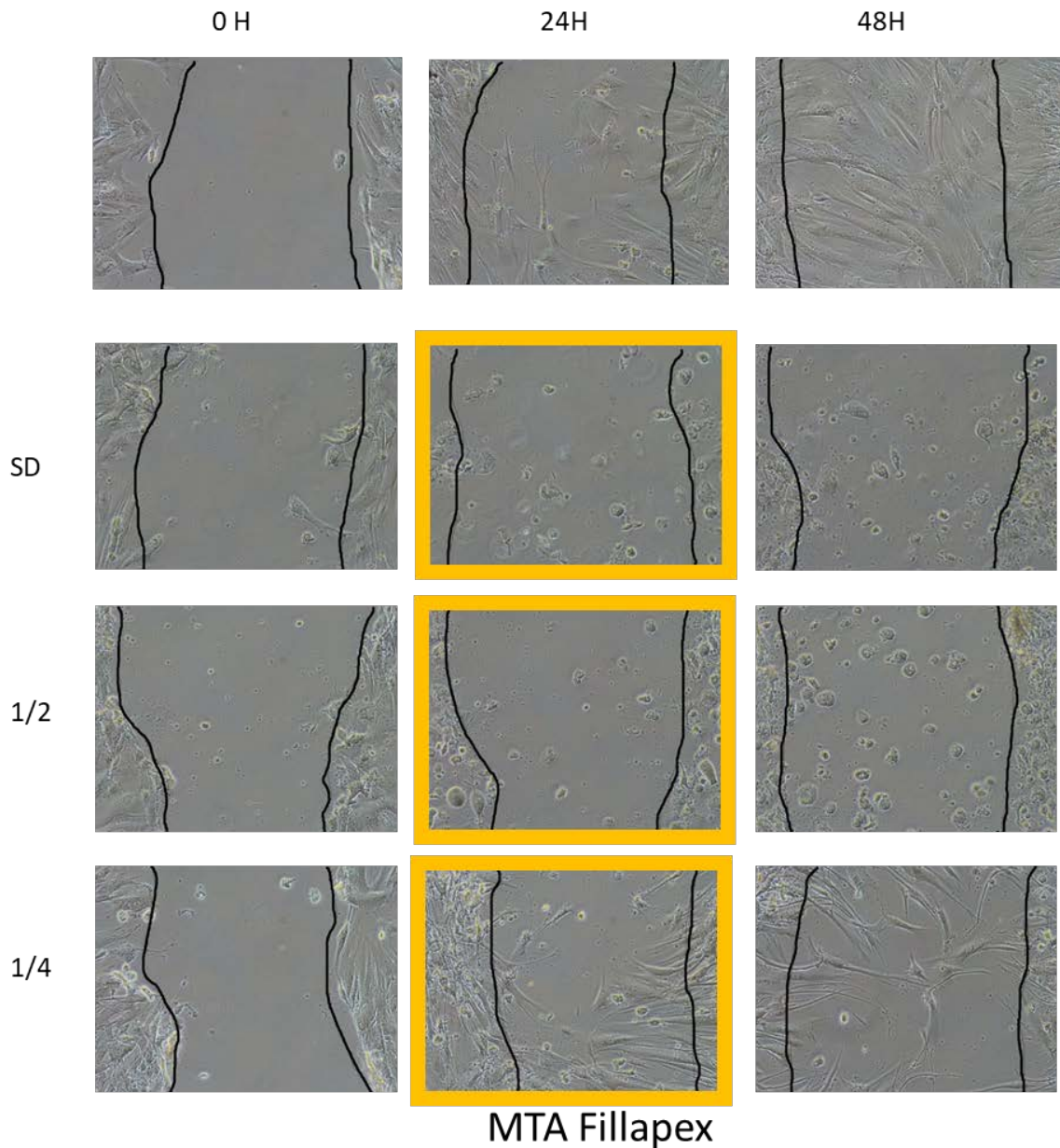


Figura 38. Comparativa de migración MTA Fillapex vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.

Por último, se muestra en la figura 39 la comparativa entre AH Plus y el control. Tanto en la imagen sin diluir como la dilución $\frac{1}{2}$, a las 24 horas se observa una morfología redondeada de las células y no se aprecia intención de cierre de la herida. A su vez, a

las 24 horas en la dilución $\frac{1}{4}$ si se observan células adheridas cerrando la herida. A las 48 horas en todas las diluciones, las células adheridas muestran intención de cerrar la herida y casi ninguna célula redondeada.

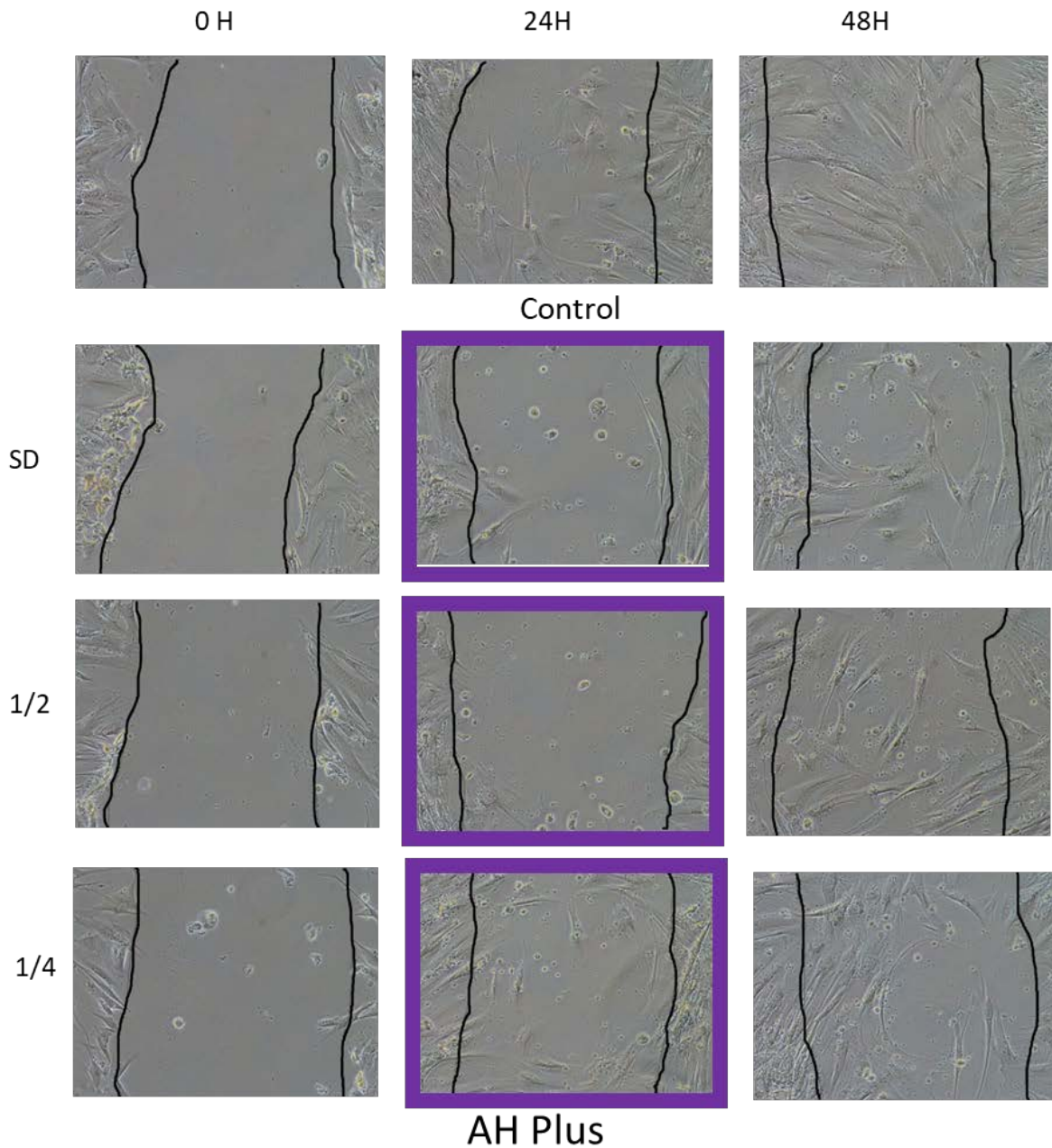


Figura 39. Comparativa de migración AH Plus vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.

A continuación, podemos ver una representación gráfica de los cuatro cementos a las 24 y 48 horas en sus 3 diluciones con respecto al control. Observamos que para GuttaFlow Bioseal, a las 24 horas existe una diferencia significativa de cierre de la

herida con respecto al control (**=p<0.01) y a las 48 horas (*p<0.05). Para GuttaFlow 2 también se observan diferencias significativas con respecto al cierre de la herida a las 24 horas (**=p<0.01) y a las 48 horas (***=p<0.001). Tanto para AH Plus y MTA Fillapex, se observan diferencias significativas a las 24 y 48 horas (***=p<0,001) con respecto al control, ya que representan unos niveles altos de espacios por cerrar para AH Plus y muchos más espacios por cerrar para MTA Fillapex con respecto al control (Figura 40) (Tabla11).

GuttaFlow 2 y GuttaFlow Bioseal muestran tiempos de cierre de herida y promueven la migración celular de manera similar, siendo GuttaFlow Bioseal con el cemento con el que se cierra la herida más rápido a las 48 horas. MTA Fillapex prácticamente no cierra la herida en ninguna de sus diluciones ni a las 24 horas ni a las 48 horas. Ambas resinas muestran peores resultados de migración con respecto a las siliconas siendo GuttaFlow Bioseal el cemento que obtiene mejores resultados y MTA Fillapex el que peores con respecto a superficie y tiempo de cierre de la herida.

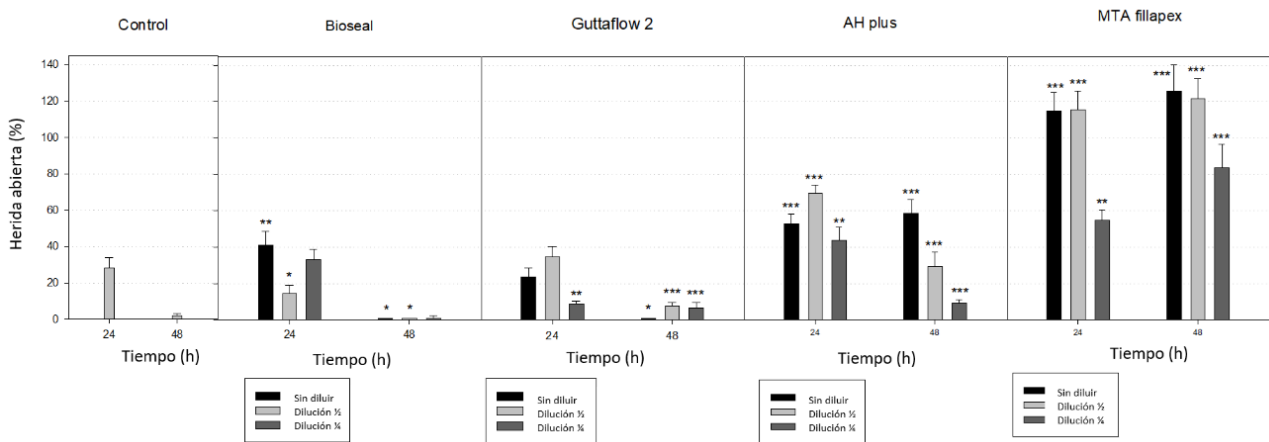


Figura 40. Representación del porcentaje de área sin cubrir tras el tiempo indicado (24 o 48 horas). El nivel de significancia respecto al control se indica en la gráfica. El nivel de significancia entre los diferentes tratamientos se indica en la tabla inferior. En todos los casos dicho nivel de significancia se ha evaluado mediante el test de t de Student. *<0.05; **<0.01; ***<0.0001.

Cementos	Tiempo	Sin diluir		Dilución ½		Dilución ¼	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
Bioseal vs Guttaflow2		**	nd	nd	***	nd	nd
Bioseal vs AH plus		nd	***	**	**	nd	nd
Bioseal vs MTA fillapex		***	***	***	**	nd	*
Guttaflow 2 vs AH plus		*	***	*	nd	nd	nd
Guttaflow 2 vs MTA fillapex		***	***	**	***	**	**
AH plus vs MTA fillapex		**	**	*	**	nd	**

Tabla 11. Tabla de test de t de Student con respecto a la representación del porcentaje de área sin cubrir tras el tiempo indicado (24 o 48 horas). *<0.05; **<0.01; ***<0.0001.

2.3. Caracterización de los cementos: Ensayos de pH, osmolaridad e ICP – MS.

Dado que la liberación de moléculas por parte de los materiales al microambiente extracelular puede producir cambios de pH en dicho entorno, se analizó el pH, la osmolaridad y la presencia de elementos liberados al medio. Mediante la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se pudo realizar un análisis inorgánico elemental e isotópico de los elementos liberados al medio.

Se analizó si había diferencias en cuanto a pH y osmolaridad de solución balanceada de Hank (HBSS) libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ con respecto a la muestra tomada del medio tras el contacto con los cementos. Estos resultados se muestran en la tabla 8 en la que los extractos de GuttaFlow Bioseal mostraron un pH ligeramente superior a GuttaFlow2. En ambos casos el pH fue superior a los otros cementos. En cuanto a la osmolaridad, el valor más alto correspondió a GuttaFlow Bioseal con una ligera diferencia con respecto a AH Plus.

Material	Concentración del elemento (mg/L)					
	pH	Presión Osmótica	Silicio	Fósforo	Calcio	Estroncio
HBSS	7.98±0.15	287±2	62.38	27,314.22	36.44	5.73
GuttaFlow Bioseal	8.40±0.04	311±1	35,240.93	29,397.02	405.97	9.18
GuttaFlow 2	8.35±0.04	288±1	20,140.89	27,110.24	225.60	16.15
MTA Fillapex	7.95±0.18	288±1	16,232.27	3,192.37	7,818.45	500.52
AH Plus	8.04±0.03	305±1	940.09	27,033.42	19.09	8.81

Tabla 12. Resultados de los ensayos de pH, presión osmótica e ICP-MS

Los resultados del ICP-MS (tabla 12) se presentan en concentraciones del elemento en mg/L. Se tomó como control la HBSS nuevamente. Se observan diferencias de silicio entre todos los materiales, siendo GuttaFlow Bioseal el que mayor concentración muestra. Las diferencias entre materiales en cuanto a fósforo son pequeñas, pero nuevamente GuttaFlow Bioseal muestra la carga más alta y MTA Fillapex la más baja, incluso con respecto a la HBSS. Curiosamente, la concentración más alta de calcio la presenta MTA Fillapex al igual que de estroncio, siendo niveles que sobrepasan los niveles medios del resto de materiales y de la HBSS.

2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB):

2.4.1. Morfología celular y adhesión a los cementos.

Observamos la morfología y adhesión de las hPDLSCs a los distintos cementos a 100x, 500x y 1000x aumentos mediante el microscopio electrónico de barrido tras sembrar las células en la superficie de los discos de cemento y fijarlos.

La morfología y adhesión de hPDLSCs sobre la superficie de GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex y AH Plus tras 168 horas, se muestran en las figuras 41 y 42.

La morfología de las células sembradas sobre AH Plus y MTA Fillapex fue similar y en ambos casos hubo un bajo nivel de adhesión celular. En los discos de GuttaFlow 2, la adhesión celular fue moderada, con células redondeadas. En caso de GuttaFlow Bioseal, se vieron células adheridas y extendidas con un alto nivel de células y de producción de matriz extracelular. Los resultados de SEM son coherentes con los resultados de viabilidad.

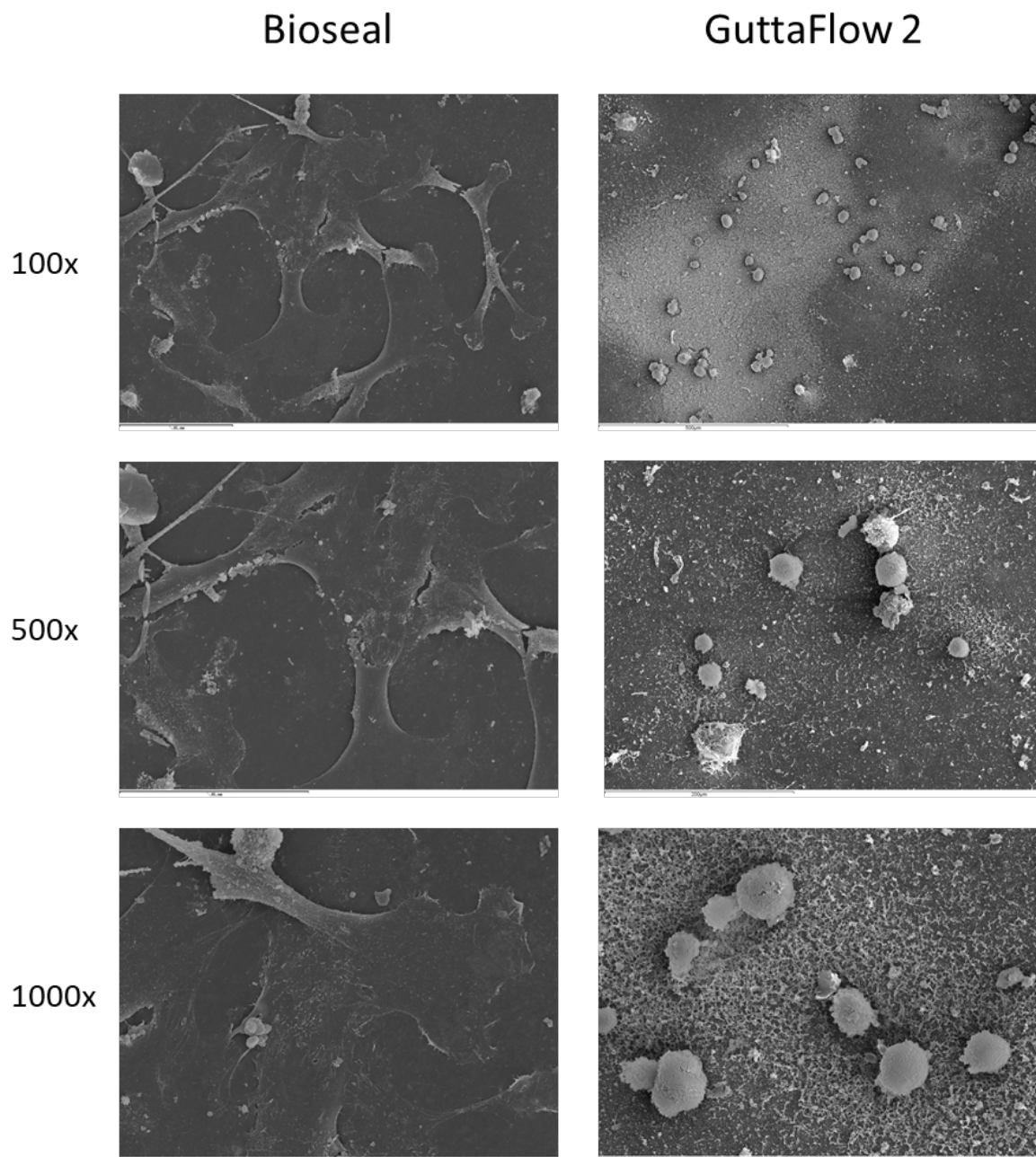
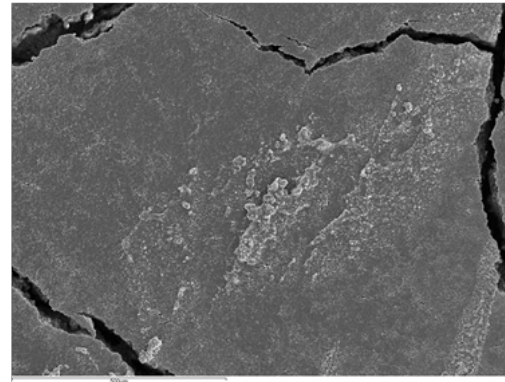
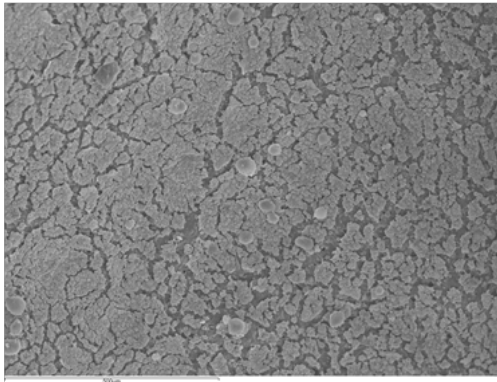


Figura 41. MEB de la adhesión y morfología celular a 100x, 500x y 1000x de GuttaFlow 2 y GuttaFlow Bioseal a las 168 horas.

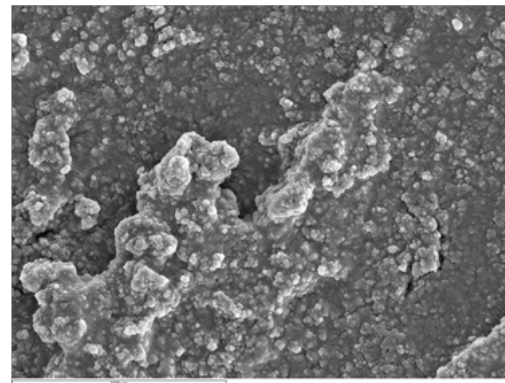
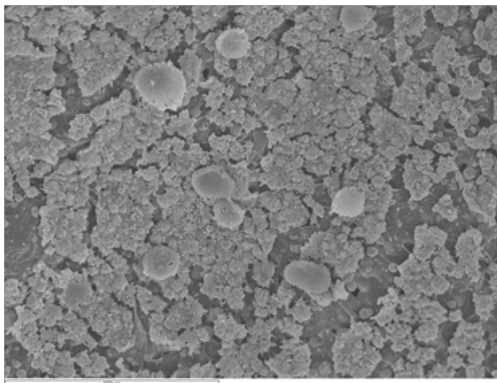
AH Plus

MTA Fillapex

100x



500x



1000x

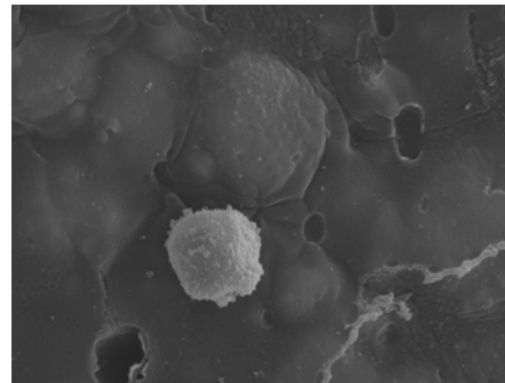
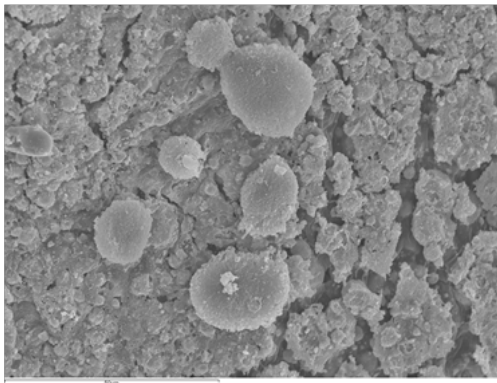


Figura 42. MEB de la adhesión y morfología celular a 100x, 500x y 1000x de AH Plus y MTA Fillapex.

2.4.2. Espectrometría dispersiva de rayos X (EDX).

El análisis con SEM EDX mostró la composición cualitativa y semi-cuantitativa de los elementos que componen los cementos representada en las figuras 43 y 44. GuttaFlow Bioseal mostró una superficie lisa cubierta con partículas. EDX reveló elementos como el C, O el Zn y Zr con trazas de Ca y Si.

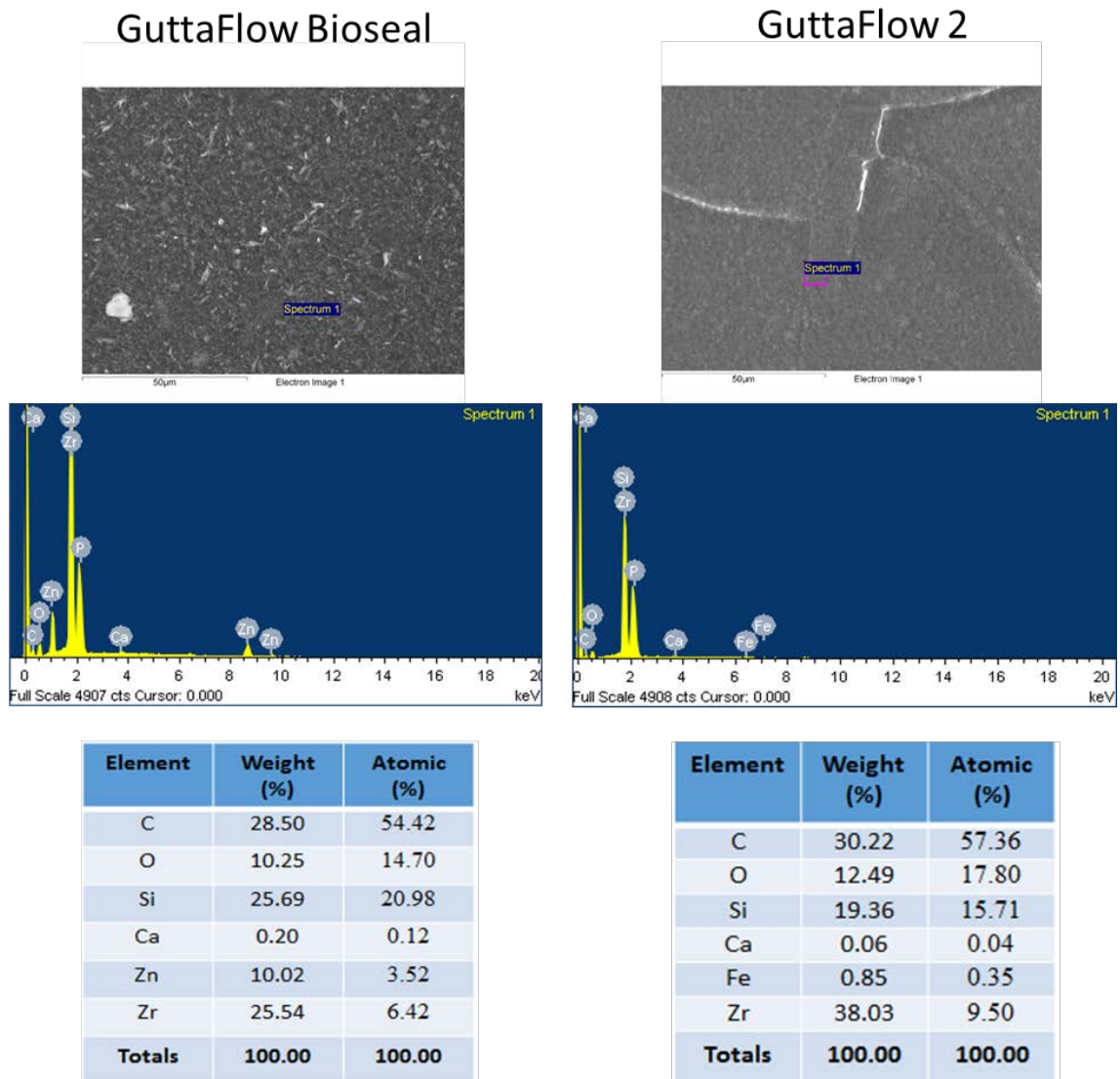


Figura 43. MEB EDX de GuttaFlow Bioseal y GuttaFlow 2. Observamos la imagen capturada de la superficie del cemento, el espectro de los elementos de esa superficie y la cuantificación de dichos elementos.

GuttaFlow 2 mostró una superficie granular fina y uniforme con trazas de C, O, Si y Fe, ZN y Zr. Ni GuttaFlow Bioseal ni GuttaFlow 2 mostraron presencia alguna de Pt (del catalizador de platino) o Ag (de las nanopartículas de plata). AH Plus mostró una superficie externa que aparentemente, en su mayoría, es homogénea con orificios de distintos tamaños y zonas rugosas. EDX reveló en orden decreciente trazas de C, O, W, Zr, Si y Ca. MTA Fillapex mostró una superficie homogénea irregular con diferentes tamaños de partículas en orden decreciente de W, C, Ca, O, S, Re, Si y Zr.

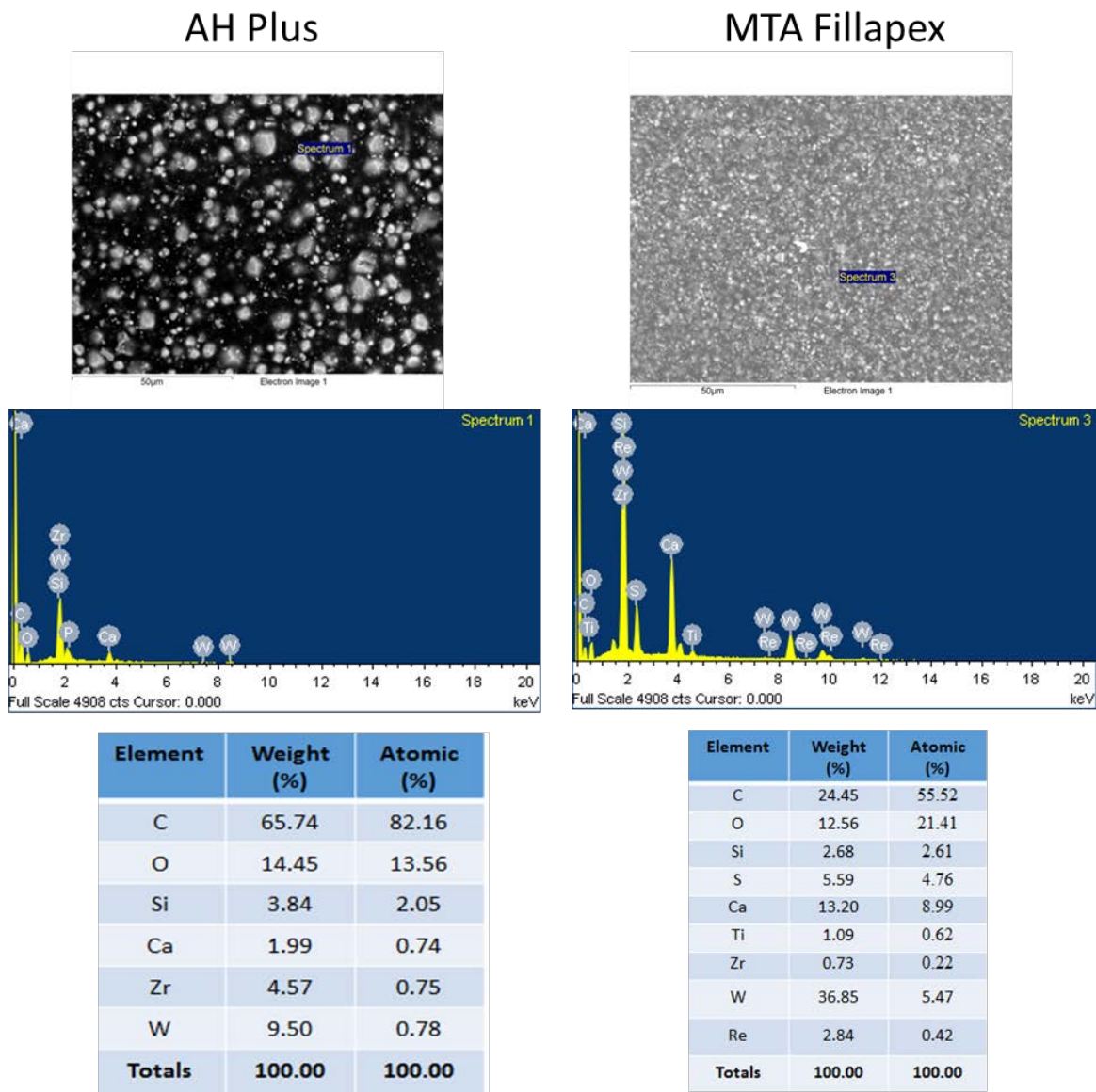


Figura 44. MEB EDX de AH Plus y MTA Fillapex. Observamos la imagen capturada de la superficie del cemento, el espectro de los elementos de esa superficie y la cuantificación de dichos elementos.

VI - DISCUSIÓN

1. Sobre la metodología.

Tradicionalmente, la biocompatibilidad se describe como la propiedad de un material o sustancia cuya presencia o acción provoca una respuesta apropiada del huésped cuando se aplica intencionadamente. Citotoxicidad se define como la capacidad de un material para causar modificaciones negativas en la viabilidad de la célula. Por tanto, los test de citotoxicidad son test de biocompatibilidad que determinan la lisis de la célula, la inhibición del crecimiento celular y otros efectos nocivos de los materiales testados sobre las células. Así pues, la biocompatibilidad es un aspecto que, por ley, debe ser evaluado antes de que un nuevo material salga al mercado (204).

Debemos entender que un biomaterial no es un material inerte. Cuando un biomaterial se pone en contacto con un tejido vivo, se van a producir interrelaciones con los sistemas biológicos circundantes y dichas interacciones, pueden dar lugar a algún tipo de respuesta biológica. Así pues, las interacciones dependen del material, de las funciones para las que se ha diseñado, y de las condiciones del tejido huésped (220, 221).

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* son muy útiles para discriminar, en primera instancia, aquellos materiales reactivos de los que no lo son, aportando evidencia predecible de su biocompatibilidad. Un test positivo de citotoxicidad es de gran utilidad como signo de precaución ante su uso clínico, ya que nos indica que puede contener uno o más componentes nocivos (222). Tienen como objetivo principal simular las reacciones biológicas de un material cuando se pone en contacto con tejidos vivos. Este método nos ofrece una manera menos costosa de estudiar materiales novedosos, reduciendo la probabilidad de sorpresas al utilizarlo en animales (223).

En el conjunto de métodos para evaluar los efectos citotóxicos de los materiales encontramos cultivos celulares, experimentación animal y estudios clínicos. Los métodos de análisis de última generación proponen los modelos de estudios *in vitro* para determinar en primera instancia los posibles efectos adversos inespecíficos sobre las células (citotoxicidad y mutagenicidad). Los llamados estudios secundarios se

realizan con animales pequeños para detectar posibles efectos sistémicos mediante irritación de la piel o las mucosas. En un paso final, se aplican los materiales en animales del mismo modo que se aplicarían en pacientes (224).

En este tipo de estudios, es necesario seguir con rigurosidad la normativa internacional sobre criterios biológicos respecto a dispositivos médicos (ISO 10993:2009), prestando especial atención al sub-apartado de preparación de muestras y materiales de referencia (ISO 10993-12:2009) y sobre todo al sub-apartado de ensayos de citotoxicidad *in vitro* (ISO 10993-5:2009). En el sub-apartado 12 nos indican cómo debemos preparar los materiales, nos aconsejan testar el material en su forma final y tener un control positivo y negativo. En el sub-apartado 5 se especifican diversos test para evaluar efectos biológicos de los materiales utilizando cultivos de células de mamíferos; normalmente obtenidas de ratón o humanas, en frascos de cultivo y utilizando medios de cultivo adecuados. En los test estándar de citotoxicidad se siembran células en dichos frascos donde crecen en monocapa hasta conseguir casi la confluencia, siendo en este momento cuando se ponen en contacto con los materiales a testar. Con el método de elución, ampliamente utilizado, se hacen las diluciones pertinentes de los materiales para ponerlas en contacto con las células. Tras los períodos designados, se observa si las células muestran cambios producidos por la toxicidad de los materiales tales como cambios de tamaño o apariencia, desarrollo de componentes celulares o pérdida de su integridad (222).

En este estudio se realizaron test *in vitro* de biocompatibilidad y citotoxicidad de los materiales con cultivos de células de origen humano, con el objetivo de simular una situación clínica y confirmar su uso seguro en la práctica diaria endodóntica, atendiendo a las ventajas y la utilidad que este tipo de estudios nos ofrecen: sencillez, rapidez, fiabilidad de los resultados, por su relación coste/beneficio y como paso previo a la experimentación animal sin sorpresas (205).

2. Sobre la línea celular y su identificación.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, derivado del folículo dental y originado a partir de células de la cresta neural (225). Es un tejido altamente

fibroso y muy vascularizado. Está dotado de la presencia de gran variedad de células que incluye cementoblastos, osteoblastos, fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, nerviosas, epiteliales y células madre mesenquimales. Éstas últimas aparecen en poblaciones abundantes, adyacentes a vasos sanguíneos y exhiben características citológicas clásicas de las células madre, incluido su pequeño tamaño, reactivas a factores estimulantes y con un ciclo de duración lento (226).

Estudios recientes demuestran que las MSC obtenidas del ligamento periodontal (PDLSC) son células multipotentes con características similares a BMSCs y DPSCs, capaces de formar diferentes tipos de tejidos como por ejemplo tejidos asociados a diente y hueso (225).

En este estudio que presentamos, se han aislado células del ligamento periodontal humano y posteriormente se han identificado las MSC. Se ha seleccionado esta línea celular debido a que son una población en contacto directo con los cementos selladores endodónticos y sufrirán una reacción biológica a dicho contacto.

La obtención de células del ligamento periodontal se realizó en base a los protocolos establecidos en la "Guidance on Good Cell Culture Practice" (GCCP) (202) mediante disgregación mecánica y enzimática de manera combinada (182), con el objetivo de reducir el tiempo de obtención de las células (227). Autores como Lee y cols. obtuvieron PDLSCs con la misma técnica que nosotros (228). Otros autores como Yao y cols. también obtuvieron células del ligamento periodontal mediante la técnica de explante (229). Estas técnicas han sido utilizadas por autores como Daltoè y cols. o Zhu y cols. para obtener PDSCs (230)(231).

Para identificar las hPDLSCs seguimos los criterios mínimos de identificación de MSCs descritos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (162), reflejados en el material y métodos de este estudio.

3. Sobre los materiales y su caracterización.

Los cementos selladores endodónticos son los responsables de sellar, junto con la gutapercha, el sistema de conductos, aislar las bacterias remanentes y rellenar las

irregularidades anatómicas. En la práctica clínica diaria, existen diversos tipos de cementos selladores según su compuesto base (218).

En el presente estudio se ha seleccionado una resina epoxy (AH Plus®), una silicona (GuttaFlow 2®) y dos biocerámicos de reciente lanzamiento al mercado que combinan resina epoxy con silicato de calcio (MTA Fillapex®) y silicona con silicato de calcio (GuttaFlow Bioseal®) y se han estudiado en su forma fraguada.

Para analizar la microestructura de los materiales y la composición elemental, utilizamos la técnica de dispersión de energía de rayos X mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB EDX), ya utilizada por otros autores como Khalil y cols (219).

En el estudio de Borges y cols. de 2012, se determinó que la solubilidad de MTA Fillapex fue significativamente mayor que la de AH Plus que fue comparable con MTA Angelus. En el estudio EDX de estos cementos AH Plus mostró una superficie rugosa homogénea, y una proporción de trazas, de menor a mayor, de C, Zr, W, O, Bi y Ca. MTA Fillapex mostró una superficie compacta y homogénea, con trazas de mayor a menor de C, Zr, O, W Ca y Si, coincidiendo con nuestro análisis. Tras el test de solubilidad, se volvieron a analizar los materiales mediante EDX y la pérdida de material de AH Plus fue significativamente menor que la de MTA Fillapex, comprometiendo así sus propiedades (218).

Borges y cols. tras analizar mediante la misma técnica los cementos AH Plus y MTA Fillapex, encontraron los mismos elementos excepto el wolframio, ausente en su análisis para MTA Fillapex y presente en AH Plus (232). Otro estudio llevado a cabo por Sampaio y cols. en el mismo año tampoco encontraron wolframio en MTA Fillapex y si en AH Plus, determinando que se habían encontrado los elementos descritos por los fabricantes pero en proporciones distintas (216). Estos análisis difieren del nuestro ya que nosotros si encontramos wolframio presente tanto en Ah Plus como en MTA Fillapex, siendo nuestros resultados consistentes con el estudio llevado a cabo por Reszka y cols. que encontraron wolframio y picos mayores de zirconio en AH Plus que en MTA Fillapex (233).

En 2016 Gandolfi y cols. realizaron el primer análisis físico-químico de un nuevo cemento sellador a base de silicona llamado GuttaFlow Bioseal, comparándolo con dos de sus antecesores RoekoSeal Automix y GuttaFlow 2, y a su vez con MTA Fillapex. De su análisis exhaustivo podemos apreciar grandes diferencias en cuanto al tiempo de fraguado. GuttaFlow 2 y GuttaFlow Bioseal fraguan en un tiempo mucho más reducido notablemente que MTA Fillapex, con lo que coincidimos. En este estudio, MTA Fillapex tuvo una pérdida de su masa muy significativa en comparación a las siliconas tras el test de solubilidad. Ambos biocerámicos mostraron liberación de iones calcio y produjeron un pH alcalino. En este estudio, sólo GuttaFlow Bioseal mostró la capacidad para nuclear depósitos de hidroxiapatita y precursores pobres en Ca (114). En nuestro estudio, no se encontraron trazas de platino (Pt) o plata (Ag) ni en GuttaFlow Bioseal ni en GuttaFlow 2, siendo estos resultados acordes con los del estudio de Gandolfi (114).

En 2017, Camargo y cols. realizaron un estudio comparando las propiedades físico químicas de GuttaFlow 2, GuttaFlow Bioseal, AH Plus y MM Seal. En propiedades como el tiempo de fraguado, AH Plus tardó más tiempo en fraguar que el resto siendo GuttaFlow Bioseal el que menos tiempo necesitó, con lo que coincidimos. GuttaFlow Bioseal y GuttaFlow 2 experimentaron mayor cambio dimensional que AH Plus. Este último fue el cemento sellador que menor solubilidad mostró de los cuatro. Una de las razones que explica la solubilidad de GuttaFlow 2 y GuttaFlow Bioseal es la elevada tasa de liberación de calcio, mucho mayor que AH Plus o MM Seal. GuttaFlow Bioseal fue el único que mostró tasas altas de liberación de sodio. Todos los cementos liberaron bajas tasas de potasio excepto AH Plus (234).

Resultados muy similares han obtenido Tanomaru-Filho y cols. en un estudio sobre propiedades físico químicas en el que se incluyen tanto GuttaFlow Bioseal como AH Plus, y concluyen que tanto Ah Plus como GuttaFlow Bioseal muestran propiedades físicoquímicas apropiadas para su uso como cementos selladores (235).

4. Sobre el ensayo de viabilidad celular y la citotoxicidad.

Los modelos de estudios de citotoxicidad *in vitro* que utilizan líneas celulares establecidas para simular las condiciones *in vivo* están a día de hoy bien reconocidos.

Las líneas celulares establecidas tienen la ventaja de la reproductibilidad de los resultados y están recomendadas por los screenings de citotoxicidad preliminar de la ISO. Existen estudios previos realizados tanto con líneas celulares de ratón (fibroblastos L929) como líneas celulares de fibroblastos humano que estudian la citotoxicidad de materiales frente a este tipo de células(236).

Así pues, la viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de MTT, técnica introducida por Mosmann en 1983 y que desde entonces es un test bien establecido para la verificación de citotoxicidad (198)(199). Las ventajas que aporta el método MTT son simplicidad, exactitud y ahorro de tiempo. El cultivo en pequeños volúmenes y la elevada sensibilidad de la evaluación a través de este método, permite estudiar y testar diferentes sustancias y fracciones de la sustancia para poder determinar su citotoxicidad(204)(237)(238)(239).

En nuestro estudio se comparan los cementos AH Plus y GuttaFlow 2; cementos ampliamente estudiados y utilizados, con cementos que están en el mercado desde hace relativamente poco tiempo como MTA Fillapex (2010) y del cual se conoce su citotoxicidad en diversos tipos celulares; y de GuttaFlow Bioseal (2015) del que no existen apenas estudios sobre sus propiedades biológicas. AH plus ha sido utilizado en nuestro estudio no solo como base para comparar el resto de cementos novedosos sino también para poder evaluar su citotoxicidad con células madre mesenquimales del ligamento periodontal humano.

Los resultados obtenidos por Leyhausen en 1999 muestran una evolución más biocompatible de AH Plus frente a su antecesor AH26(93).A pesar de ello, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que AH Plus sigue siendo citotóxico, coincidiendo con otros estudios en los que se determinó que AH Plus es citotóxico inmediatamente después de realizar la mezcla (98). También hay trabajos que comparan su citotoxicidad con cementos a base de óxido de zinc-eugenol (Canals y N2). En éste último estudio la citotoxicidad se comparó mediante técnica de MTT, resultando los tres cementos citotóxicos de más a menos N2>Canals=AH Plus (240).

Miletic´ y cols. en 2005 compararon la citotoxicidad de un cemento a base de silicona (RoekoSeal) y uno a base de resina (AH Plus) *in vitro* frente a fibroblastos de

ratón L929, en tiempos 1h, 24h, 48h, 7 días y 1 mes, obteniendo que AH Plus presentó una citotoxicidad ligera-moderada después de 1h, 24h y a las 48h, resultados que coinciden con nuestro estudio a las 24 horas (241).

En un estudio realizado sobre fibroblastos L929 de ratón, se vio que GuttaFlow y AH Plus obtuvieron los resultados de menor citotoxicidad con respecto Pulp Canal Sealer, Epiphany y realseal con Teflón como control. A pesar de ello, los resultados indicaron que AH Plus fue citotóxico inicialmente, permaneciendo de esta manera durante la primera semana del estudio (242).

En un estudio en el que se comparó la citotoxicidad frente a fibroblastos 3T3 de ratón mediante MTT entre AH Plus, GuttaFlow, Resilon, Epiphany a las 24h y a las 72h, se observaron resultados similares a los nuestros en cuanto a que la citotoxicidad aumenta con el tiempo, sobre todo en AH Plus, sin diluir, hasta las 24 horas (243).

Nuestros resultados muestran un descenso de la citotoxicidad de Ah Plus al aumentar las diluciones, coincidiendo con los resultados obtenidos por Al-Hiyasat y cols. en su estudio donde se compararon AH Plus, EndoRez, Epiphany y Metaseal frente a fibroblastos 3T3 en un ensayo MTT (244).

Desde la aparición del MTA en los años 90, se han realizado gran cantidad de estudios que prueban su biocompatibilidad frente a células de los tejidos vivos, siendo tal que se han desarrollado múltiples materiales en base a sus principios.

En 2008, Koulaouzidou y cols. obtuvieron resultados de biocompatibilidad de MTA Angelus y ProRoot MTA mostraron ser biocompatibles con células de la pulpa dental y con fibroblastos de pulmón humano. Utilizando el método Alamar Blue se determinó que Endosequence Root Repair Material, Proroot MTA y MTA ángelus (blanco y gris) no inhiben de manera considerable la proliferación de fibroblastos y osteoblastos humanos del ligamento periodontal(118).

Existen estudios recientes como el realizado por Costa y cols. en el que se compararon los efectos sobre la proliferación y diferenciación a tiempo-dependiente de los cementos a base de silicato de calcio ProRoot MTA, MTA Plus, MTA Fillapex y Biodentine frente a células madre mesenquimales humanas y células endoteliales venosas umbilicales humanas mediante un estudio ex vivo (estudio osteogénico) e in

vivo (estudio de angiogénesis). Todos los materiales obtuvieron resultados de biocompatibilidad con signos de proliferación celular excepto MTA Fillapex que presentó resultados citotóxicos dosis y tiempo-dependientes tanto para células osteoblásticas como para células endoteliales. Esto coincide con nuestros resultados, ya que MTA Fillapex mostró citotoxicidad en todos los tiempos y diluciones de nuestro estudio, obteniendo los resultados más altos de citotoxicidad entre los tres cementos estudiados (245).

En 2012, un estudio comparó la citotoxicidad de MTA blanco, MTA Fillapex y AH Plus sobre fibroblastos de hamsters chinos (V79). MTA blanco mantuvo una viabilidad celular mayor al 70% mientras que AH Plus y MTA Fillapex mostraron citotoxicidad. Los peores resultados de éste estudio los obtuvo MTA Fillapex mostrando citotoxicidad en todas sus diluciones, coincidiendo con nuestros resultados (246).

Nuestros resultados de MTA Fillapex y AH Plus también coincidieron con el estudio llevado a cabo por Silva y cols. en 2013 en el que se evaluó la citotoxicidad de MTA Fillapex mediante MTT frente a células 3T3 de rata comparándola con AH Plus. En todo el experimento, MTA Fillapex mostró altos niveles de citotoxicidad mientras que AH Plus fue moderadamente citotóxico antes de fraguar, medianamente citotóxico a la semana y no citotóxico a las 2 semanas (247).

Yoshino y cols. compararon la citotoxicidad de MTA Angelus, Cemento Portland y MTA Fillapex, siendo este último el material que obtuvo los valores más elevados de citotoxicidad dosis-dependiente frente a fibroblastos humanos del ligamento periodontal comparado con su precursor el MTA, a las 24, 48 y 72 horas, coincidiendo con nuestros resultados a las 24 horas (248).

Hemos encontrado en la literatura otros estudios que corroboran la citotoxicidad de MTA Fillapex frente a células del ligamento periodontal. Zhou y col. en 2015 utilizaron citometría de flujo y adhesión para determinar la citotoxicidad de EndoSequence BC, MTA Fillapex y AH Plus como control. MTA Fillapex fraguado fue más citotóxico que EndoSequence BC y AH Plus (249).

Rodríguez-Lozano y cols. compararon recientemente la biocompatibilidad entre los biocerámicos TotalFill, MTA Fillapex y AH Plus como control frente a células madre

mesenquimales del ligamento periodontal. MTA Fillapex fue altamente citotóxico y disminuyó la proliferación, viabilidad, migración y adhesión de células madre del ligamento periodontal humano (239).

Estos estudios son contrarios al estudio realizado por Chang y cols. en 2014 en el que se determinó la viabilidad celular mediante ensayo MTT tras exponer los cementos Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex y iRoot SP frente a células del ligamento periodontal humano durante 3,7 y 14 días. De los cementos estudiados, MTA Fillapex mostró los mejores resultados en cuanto a crecimiento celular. Aseguran que MTA Fillapex inducen una menor expresión de mediadores inflamatorios que cementos como el Sealapex y además promueven una diferenciación osteoblástica (250).

En este estudio también ha sido incluido el cemento a base de silicona GuttaFlow 2. Diversos trabajos en los que se compara la biocompatibilidad de las siliconas mediante MTT, muestran que cementos como RoekoSeal (silicona) son biocompatibles y permiten hasta un 100% de viabilidad celular en diluciones $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ con respecto a cementos como Ah Plus (resina epoxy) o EndoRez (metacrilato), obteniendo éste último los valores más elevados de citotoxicidad (251).

Varios estudios se han realizado con el cemento precursor de GuttaFlow 2, mostrando buenos resultados en cuanto a biocompatibilidad. En un estudio llevado a cabo por Eldeniz y cols. en 2007, de los 8 cementos estudiados, RC Sealer (resina) y GuttaFlow (silicona) mostraron los niveles más bajos de citotoxicidad frente a fibroblastos humanos y L929 de ratón (252). Posteriormente, Brozovic y cols. estudiaron la genotoxicidad de varios cementos entre los que se encontraba GuttaFlow, mostrando buenos resultados al no tener la capacidad para producir daños en el DNA de linfocitos periféricos y siendo no genotóxico (253).

En un estudio donde se determinó la citotoxicidad de Endosequence BC, GuttaFlow, Tubliseal y AH Plus sobre fibroblastos de ratón, se llegó a la conclusión de que AH Plus y Tubliseal mostraron citotoxicidad, sobre todo antes de fraguar y que con el tiempo disminuyó la citotoxicidad. Para Endosequence BC y Guttaflow, la viabilidad celular fue mayor del 90% en todas sus diluciones, y no mostraron diferencias entre el cemento

fraguado o recién mezclado, demostrando biocompatibilidad en ambas condiciones (254).

Cortázar y cols. en 2013 realizaron un estudio de citotoxicidad mediante Alamar Blue en el que se determinó que tanto MTA como GuttaFlow no inhiben el potencial de proliferación de los fibroblastos gingivales humanos (255).

Al comparar la biocompatibilidad del cemento GuttaFlow 2 (silicona) con su antecesor GuttaFlow clásico (silicona) y AH Plus Jet (resina) mediante MTT en células del ligamento periodontal humano, se obtuvieron resultados en los que se sugiere una menor citotoxicidad de los cementos a base de silicona estudiados en comparación con el de resina (256).

Resultados similares obtuvieron en otro estudio llevado a cabo con fibroblastos del ligamento periodontal humano, donde se comparó mediante MTT la biocompatibilidad de GuttaFlow 2, su precursor GuttaFlow, una versión de fraguado más rápido de GuttaFlow y AH Plus Jet. Los resultados a las 24 horas, 1 semana, 2 semanas y a las 4 semanas mostraron que tanto GuttaFlow 2 como su predecesor mostraron niveles de biocompatibles similares mientras que AH Plus mostró citotoxicidad en todos los tiempos estudiados (257).

Los resultados de nuestros experimentos muestran biocompatibilidad de GuttaFlow 2 a las 24h, coincidiendo con los resultados obtenidos en los dos estudios anteriores para GuttaFlow 2 y la comparativa con AH Plus.

Silva y cols. en 2015 realizaron un estudio de citotoxicidad de AH Plus y GuttaFlow 2 mediante un ensayo MTT y un ensayo LDH (lactato deshidrogenasa) con fibroblastos 3T3 de ratones, en el que AH Plus fue más citotóxico que GuttaFlow2 y mostrando, éste último, ser más biocompatible. En nuestro trabajo, obtuvimos resultados similares para las células madre de ligamento periodontal al comparar AH Plus y GuttaFlow 2 (258).

Las células MSC de ligamento periodontal sembradas en presencia de extractos de GuttaFlow Bioseal, mostraron una mayor viabilidad celular que en los casos sembrados con GuttaFlow 2, AH Plus o MTA Fillapex. Estos resultados sugieren que otros componentes distintos al silicato de calcio contenidos en los cementos selladores

podrían causar citotoxicidad. De hecho, la alta citotoxicidad mostrada con MTA Fillapex podría ser causada por las resinas o por otros componentes contenidos en este material como el azufre. En esta cuestión, otros estudios han concluido que MTA Fillapex reduce los niveles de supervivencia celular (201, 239). En contraste, los cementos selladores basados en siliconas muestran una buena biocompatibilidad en estudios recientes. Por ejemplo, Silva y cols. no encontraron efectos citotóxicos en el cemento sellador GuttaFlow 2 sobre fibroblastos de ratón 3T3 (258). En otro estudio, GuttaFlow mostró menor citotoxicidad que el sistema Resilon/Epiphany o que AH Plus (243).

Con respecto a cementos selladores a base de resinas epoxy, diversos estudios muestran una citotoxicidad leve o moderada de AH Plus, a pesar de que se utilizaron modelos distintos a los utilizados en este estudio (246, 259) incluyendo tipos celulares diferentes (260, 261), áreas de contacto (249)(201) y el contacto directo o indirecto del material con las células (239, 247).

Estudios de laboratorio sobre propiedades físico-químicas de nuevos materiales pueden contribuir a entender mejor el potencial de comportamiento clínico y su modo de acción. Cuando se analizaron las propiedades físico-químicas de GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex y AH Plus (20), GuttaFlow 2 y MTA Fillapex mostraron una capacidad reducida o ninguna de liberar iones involucrados en la formación de apatita, mientras que GuttaFlow Bioseal mostró la capacidad de crear depósitos de hidroxiapatita y precursores de apatita pobre en Ca. Estos hallazgos previos están en concordancia con nuestros resultados, que determinaron que GuttaFlow Bioseal es más citocompatible que otros cementos endodónticos. La elevada cantidad de wolframio (W) encontrada en este estudio tanto en MTA Fillapex como en AH Plus podría estar relacionada con su citotoxicidad. MTA Fillapex además contiene azufre (S), pudiendo contribuir a una mayor citotoxicidad de este material con respecto a AH Plus.

Dentro de las limitaciones de este estudio, solo hemos encontrado un estudio en el que se compara la citotoxicidad de GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex y AH

Plus, publicado posterior a nuestros resultados y con células no humanas (262). Este estudio hecho a partir de células L929 de ratón concluye que tanto GuttaFlow2 como GuttaFlow Bioseal no son citotóxicos mientras que AH Plus y MTA Fillapex si lo son, siendo estos resultados consistentes con los de nuestro estudio. Los mejores resultados de viabilidad celular los obtuvo GuttaFlow Bioseal a los 7 días.

5. Sobre el ensayo de migración celular.

La reparación y regeneración del tejido implican una proliferación de las células residentes, a la vez que la migración de células progenitoras circulantes. Las MSCs tienen la capacidad de movilizarse y migrar hacia zonas con herida para proliferar y diferenciarse (263).

La interacción de las células vivas con superficies es importante dentro de las aplicaciones con biomateriales. La formación de tejido supone una serie de pasos: adhesión celular, diferenciación, proliferación y migración sobre una superficie. El tiempo que necesitan las células para adherirse y movilizarse en una superficie son elementos clave dentro de la interacción de las células con los biomateriales (264).

La técnica de “woundhealing” se inicia retirando una porción de la monocapa de células, dando como resultado dos frentes celulares que simulan una solución de continuidad creando así una “herida” o superficie a cerrar en un determinado tiempo. Estos parámetros caracterizan a la migración celular y proliferación y pueden utilizarse como un criterio cuantitativo para comparar materiales y condiciones *in vitro* de crecimiento celular (264).

Para detectar el cierre de la herida se necesita un tiempo mínimo de incubación de 24 horas. Las imágenes macroscópicas capturadas servirán para confirmar el cierre de la herida. La inspección visual en esta técnica es rápida, da mucha información y se puede comparar con otras imágenes (207). El número de observaciones, los tiempos a los que se realizan las observaciones y el tipo de herida son aspectos técnicos importantes de este ensayo (265). En este estudio los tiempos a los que se observaron las placas está en concordancia con otros estudios previos (266, 267) a las 24 y 48 horas, ya que a las 48 horas el control ya había cerrado por completo la herida.

El uso de materiales para el sellado apical en situaciones clínicas de periodontitis apical promueve una curación en éste tipo de lesiones (148). Se ha demostrado que si además, los materiales son bioactivos, inducen regeneración ósea mediante la regulación de la diferenciación y migración de células madre mesenquimales (267), siendo esencial en situaciones de necrosis y periodontitis apical, la presencia de biocerámicos que favorezcan la rápida migración de estirpes mesenquimales para reparar y regenerar la zona lesionada. Este hecho se ha demostrado en estudios como el llevado a cabo por Chen y cols. en el que se realizó un estudio histológico de la reparación de la periodontitis apical inducida en dientes de perro utilizando materiales biocerámicos como MTA y Endosequence Root Repair (268). Y en estudios clínicos como el llevado a cabo por Gusiyska y cols. en el que se concluye que el uso de biocerámicos como material de sellado apical promueven la reparación de lesiones periapicales severas (269).

6. Sobre ensayos de pH, osmolaridad e ICP-MS.

Las condiciones químicas que caracterizan a los materiales de uso médico deben ser estudiadas y concretadas, ya que son relevantes a nivel celular y cromosómico.

La liberación de moléculas por parte de los materiales al microambiente extracelular puede producir cambios de pH en dicho entorno. En estudios previos se ha relacionado niveles bajos de pH con un aumento en la citotoxicidad de algunos agentes quimioterapéuticos (270).

La incorporación de iones monovalentes al medio extracelular que provocan una alteración de los niveles de pH, pueden estar relacionados con daño celular a nivel cromosómico. En estos términos, se debe prestar atención a lo que podría ser llamado “efectos de las condiciones derivadas del material”. La genotoxicidad provocada por un pH bajo y una alta osmolalidad puede minimizarse con la alteración de las condiciones derivadas del material para mantener un pH neutral y reduciendo el contenido de iones que libera el tratamiento al medio (271). Debido a ello, debemos saber qué iones y en qué concentraciones se liberan derivados de los materiales que utilizamos. Para ello, realizamos pruebas de pH y osmolaridad de los materiales, para

no confundir el origen de la citotoxicidad. Con esto se pretende determinar si, además de las moléculas adecuadas, los materiales liberan iones en concentraciones biocompatibles.

En nuestros resultados, los extractos de GuttaFlow Bioseal mostraron un pH 8.40 ± 0.04 siendo un pH ligeramente superior al de GuttaFlow2 con 8.35 ± 0.04 . AH Plus mostró un pH similar al de las siliconas siendo de 8.40 ± 0.03 y MTA Fillapex obtuvo el valor más bajo de pH con 7.95 ± 0.18 .

Mediante la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) podemos realizar un análisis inorgánico elemental e isotópico para determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica de manera multielemental (272). Es una técnica versátil y un método que requiere una muestra simple pre-tratada de la que se puede obtener un espectro relativamente sencillo de interpretar (273).

Diversos autores han utilizado este sistema para el análisis de sus materiales, como Simesek N y cols. en el que determinan trazas de elementos en órganos de rata en los que implementaron materiales endodónticos de reparación (213). Lee y cols. en su estudio de citotoxicidad y efecto antiinflamatorio de los iones de zinc y de eugenol durante el fraguado de cementos de óxido de zinc-eugenol (274), también utilizado en el campo de la ortodoncia por Wendi y cols. en su estudio in vitro de liberación de iones de bandas y braquets ortodónticos (275). En un estudio llevado a cabo por nuestro equipo de investigación, también utilizamos el ICP-MS para obtener el análisis de los iones liberados por materiales de protección pulpar (276).

La liberación de iones inorgánicos al medio por parte de los materiales biocerámicos es una de las claves para la proliferación, adhesión y diferenciación de las células osteogénicas. La respuesta celular va a estar condicionada por los tipos de iones liberados al medio. Según Yamada y cols., cuando las células entran en contacto con iones silicato, magnesio y siloxano se produce un aumento de la efectividad en la adhesión y diferenciación en comparación a cuando solo existen iones calcio y silicato sin magnesio (277).

7. Sobre la morfología y adhesión celular

La morfología celular está estrechamente relacionada con su función. Al igual que otros tipos de células madre, las MSCs se diferencian hacia una línea concreta dependiendo de las señales que reciben del entorno, adaptando así su expresión de integrinas, caderinas y proteínas del citoesqueleto a su función (278).

En una revisión de la adhesión de células a materiales a base de MTA, realizada por Ahmed y cols., determinaron que muchos estudios demuestran que este tipo de materiales presentan unas propiedades favorables para la adhesión celular. Para este tipo de estudios, la utilización del microscopio electrónico de barrido (MEB) fue la técnica más utilizada, ya que proporciona información muy útil del comportamiento de las células al contacto con este tipo de materiales. A su vez, proponen que los investigadores deben ser cuidadosos a la hora de seleccionar el tipo celular a estudiar en contacto con este tipo de materiales y acompañarla con ensayos de biocompatibilidad (279).

En el estudio llevado a cabo por Chen y cols. Se valoró la adhesión de células de pulpa dental y de ligamento periodontal a materiales biocerámicos con MEB (280), técnica también utilizada en nuestro estudio, para la observación de la morfología celular y su adhesión a los materiales estudiados.

La configuración de actina en el citoesqueleto y la adhesión focal pueden utilizarse para determinar si las MSCs se van a diferenciar debido a la influencia señales externas que provengan, por ejemplo, de materiales bioactivos. La estructura del citoesqueleto es fundamental para entender la diferenciación de este tipo de células y para saber cómo podemos regularla tanto para aplicaciones de ingeniería de tejidos como en medicina regenerativa (281).

Así, a medida que las MSCs se diferencian en osteoblastos, se vuelven más alargadas y extendidas (282). Según los estudios de Kilian y cols, las MSCs que adquieren una forma elongada y estrellada muestran una alta actividad osteogénica (283). La relación entre focos de adhesión y la configuración del citoesqueleto cambia a medida que las MSCs se diferencian. Los osteoblastos expresan mayor cantidad de proteínas de adhesión que las MSCs, indicando que se adhieren mejor al estar más

diferenciadas (284). Todo ello nos hace pensar, según nuestros resultados, que los componentes de GuttaFlow Bioseal pudiesen promover la diferenciación de las hPDLSCs, ya que tras el contacto con este material bioactivo, se adhieren mejor que con AH Plus, MTA Fillapex y GuttaFlow 2, adquiriendo esta forma elongada y en extensión.

VII – CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio, tanto a investigadores como a clínicos les pueden resultar relevantes las siguientes conclusiones:

- En relación a la viabilidad celular, el GuttaFlow Bioseal® es el que mejores resultados obtiene, siendo el MTA Fillapex® el más citotóxico.
- Con respecto a la adhesión de las células, el material más favorable es el GuttaFlow Bioseal® y el MTA Fillapex® el peor.
- Los cementos selladores basados en silicona, presentan una superficie más uniforme y obtienen resultados más satisfactorios a nivel de migración celular.
- Se han observado trazas elevadas de wolframio en los cementos a base de resina, que podrían explicar su mayor toxicidad con respecto a los cementos a base de silicona.
- MTA Fillapex® es el único cemento de los estudiados con trazas de azufre (S), pudiendo contribuir a su citotoxicidad.
- A pesar de lo descrito por los fabricantes, no hemos encontrado trazas de plata ni platino en los cementos a base de silicona (GuttaFlow 2® y GuttaFlow Bioseal®) empleados en nuestro estudio.

VIII - BIBLIOGRAFÍA

1. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(6):348-81.
2. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1965;20(3):340-9.
3. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Science*. 1981;89(4):321-8.
4. Ørstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *International Endodontic Journal*. 1991;24(1):1-7.
5. Dalton B, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instruments. *Journal of Endodontics*. 1998;24(11):763-77.
6. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 1997;30(5):297-306.
7. Katebzadeh N, Sigurdsson A, Trope M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. *International Endodontic Journal*. 2000;33(1):60-6.
8. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit? *Endodontic Topics*. 2002;1(1):40-53.
9. Holland R, Otoboni Filho J, de Souza V, Nery M, Bernabé P, Dezan E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2003;29(3):121-4.
10. Nair P, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2005;99(2):231-52.
11. Ricucci D, Loghin S, Siqueira Jr. JF. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *Journal of Endodontics*. 2013;39(5):712-8.
12. Endodontology ESo. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *International Endodontic Journal*. 2006;39(12):921-30.
13. Ørstavik D. Endodontic filling materials. *Endodontic Topics*. 2014;31(1):53-67.
14. Ingle JJ, Bakland LK. Obturation of the radicular space. *Endodontics*. 5th ed 2002. p. 668-571.
15. Whitworth J. Methods of filling root canals: principles and practices. *Endodontic Topics*. 2005;12(1):2-24.
16. Chugal N, Clive J, Spångberg L. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(1):81-90.
17. Kirkevang LL, Ørstavik D, Hörsted-Bindslev P, Wenzel A. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in a Danish population. *International Endodontic Journal*. 2000;33(6):509-15.
18. Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. 1990;16(10):498-504.
19. Liang Y-H, Li G, Semesh H, Wesselink PR, Wu M-K. The association between complete absence of post-treatment periapical lesion and quality of root canal filling. *Clinical Oral Investigation*. 2012;16(6):1619-26.
20. Estrela C. Capítulo 13: Obturación del conducto radicular. 1 ed: Artes Médicas Latinoamérica; 2005.

21. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Journal of Endodontics*. 2006;32(4):281-90.
22. Ray H, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *International Endodontic Journal*. 1995;28(1):12-8.
23. Bryton S, Davis S, Goldman M. Gutta-percha root canal fillings: an in vitro analysis Part I. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1973;35(2):226-31.
24. Beatty R, Vertucci F, Zakariasen K. Apical sealing efficacy of endodontic obturation techniques. *International Endodontic Journal*. 1986;19(5):237-41.
25. Beatty R, Baker P, Haddix J, Hart F. The efficacy of four root canal obturation techniques in preventing apical dye penetration. *Journal of the American Dental Association*. 1989;119(3):633-7.
26. Schäfer E, Nelius B, Bürklein S. A comparative evaluation of gutta-percha filled areas in curved root canals obturated with different techniques. *Clinical Oral Investigation*. 2012;16(1):225-30.
27. Schwandt N, Gound T. Resorcinol-formalehyde resin "Russian Red" endodontic therapy. *Journal of Endodontics*. 2003;29(7):435-7.
28. Min-Kai W, Man-en W. Clinical and experimental observations on resinifying therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1986;62(4):441-8.
29. Vranas R, Hartwell G, Moon P. The effect of endodontic solutions on resorcinol-formal paste. *Journal of Endodontics*. 2003;29(1).
30. Bansode P, Pathak S, Wavdhane M, Kale D. Obturating materials present and past: a review. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2018;17(3):27-33.
31. Weine FS. *Endodontic Therapy*. 5th ed: Mosby; 1996.
32. AAE Position Statement: Use of silver points. 2013.
33. Pawinska M, Kierklo A, Marczuk-Kolada G. New technology in endodontics: The Resilon-Epiphany system for obturation of root canals. *Advances in Medical Sciences*. 2006;51(1):154-7.
34. Tomson R, Polycarpou N, Tomson P. Contemporary obturation of the root canal system. *British Dental Journal*. 2014;216(6):315-22.
35. Shrestha D, Wei X, Wu W, Ling J. Resilon: a methacrylate resin-based obturation system. *Journal of Dental Sciences*. 2010;5(2):47-52.
36. Tanomaru-Filho M, Sant'anna-Junior A, Bosso R, Guerreiro-Tanomaru J. Effectiveness of gutta-percha and resilon in filling lateral root canals using the Obtura II system. *Brazilian Oral Research*. 2011;25(3):205-9.
37. Lotfi M, Ghasemi N, Rahimi S, Vosoughhosse. Resiolon: a comprehensive literature review. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. 2013;7(3):119-30.
38. Abarca A, Bustos A, Navia M. A comparison of apical sealing and extrusion between Thermafil and lateral condensation techniques. *Journal of Endodontics*. 2001;27(11):670-2.
39. Lea C, Apicella M, Mines P, Yanicich P, Parker M. Comparison of the obturation density of cold lateral compactation versus warm vertical compactation using the continuous wave of condensation technique. *Journal of Endodontics*. 2005;31(1):37-9.
40. Wong M, Peters D, Lorton L. Comparison of gutta-percha filling techniques, compactation (mechanical), vertical (warm), and lateral condensation techniques, Part 1. *Journal of Endodontics*. 1981;7(12):551-8.
41. Collins J, P WM, Kulild J, Lee C. A comparison of three gutta-percha obturation techniques to replicate canal irregularities. *Journal of Endodontics*. 2006;32(8):762-5.
42. Peng L, Ye L, Tan H, Zhou X. Outcome of root canal obturation by warm gutta-percha versus cold lateral condensation: a meta-analysis. *Journal of Endodontics*. 2007;33(2):106-9.
43. De-Deus G, Brandão M, Fidel R, Fidel S. The sealing ability of GuttaFlow in oval-shaped canals: an ex vivo study using polymicrobial leakage model. *International Endodontic Journal*. 2007;40(10):794-9.

44. Giudice-García A, Torres-Navarro J. Obturación en endodoncia - Nuevos sistemas de obturación: revisión de la literatura. *Revista Estomatológica Herediana*. 2011;21(3):166-74.
45. Pereira A, Nishiyama C, Pinto L. Single-cone obturation technique: a literature review. *RSBO*. 2012;9(4):442-7.
46. Blum J-Y, Parahy E, Micallef J-P. Analysis of the forces developed during obturation: warm vertical compactation. *Journal of Endodontics*. 1997;23(2):91-6.
47. Brothman P. A comparative study of the vertical and lateral condensation of gutta-percha. *Journal of Endodontics*. 1981;7(1):27-30.
48. McSpadden J, Ingle J, West J. Obturation of the radicular space. In: LK B, editor. *Endodontics*. 4 ed. Baltimore: Wiliams&Wilkins; 1994. p. 228-329.
49. DuLac K, Nielsen C, Tomazic T, Ferrillo PJ, Hatton J. Comparison of the obturation of lateral canals by six techniques. *Journal of Endodontics*. 1999;25(5):376-80.
50. Ho E, Chang J, Cheung G. Quality of root canal fillings using three gutta-percha obturation techniques. *Restorative Dentistry & Endodontics*. 2016;41(1):22-8.
51. Clinton K, Himel V. Comparison of a warm gutta-percha obturation technique and lateral condensation. *Journal of Endodontics*. 2001;27(11):692-5.
52. Levitan M, Himel V, Luckey J. The effect of insertion rates on fill length and adaptation of a thermoplasticized gutta-percha technique. *Journal of Endodontics*. 2003;29(8):5005-508.
53. Johnson B. A new gutta-percha technique. *Journal of Endodontics*. 1978;4(6):185-8.
54. Moradas-Estrada M, Álvarez-López B. Do thermoplastic materials improve on the obturation of the root canal? Bibliographic review of the different techniques available in the market. *Journal of Dental Health Oral Disorders & Therapy*. 2018;9(1):23-7.
55. Gutmann J, Saunders W, Saunders E, Nguyen L. An assessment of the plastic Thermafil obturation technique: Part 1. Radiographic evaluation of adaptation and placement. *International Endodontic Journal*. 1993;26(3):173-8.
56. Fracassi L, Ferraz E, Albergaria S, Veeck E, daCosta N, Sarmento V. Evaluation of the quality of different endodontic obturation techniques by digital radiograph. *Clinical Oral investigation*. 2013;17(1):97-103.
57. Da Silva D, Endal U, Reynaud A, Portenier I, Orstavik D, Haapasalo M. A comparative study of lateral condensation, heat-softened gutta-percha, and a modified master cone heat-softened backfilling technique. *International Endodontic Journal*. 2002;35(12):1005-11.
58. Wilcox L, Juhlin J. Endodontic retreatment of Thermafil versus laterally condensed gutta-percha. *Journal of Endodontics*. 1994;20(3):115-7.
59. Schäfer E, Schrenker C, Zupanc J, Bürklein S. Percentage of gutta-percha filled areas in canals obturated with cross-linked gutta-percha core-carrier systems, single-cone and lateral compaction technique. *Journal of Endodontics*. 2015;42(2):294-8.
60. Hanna M, Daou M, Naaman A, Zogheib C. Push-out strenght of 3 warm obturation techniques: warm vertical compactation, GuttaCore, GuttaFusion. *Journal of International oral Health*. 2016;8(5):585-90.
61. Li G, Niu L, Selem L, Eid A, Bergeron B, Chen J, et al. Quality of obturation achieved by an endodontic core-carrier system with crosslinked gutta-percha carrier in single-rooted canals. *Journal of Dentistry*. 2014;42(9):1124-34.
62. Beasley R, Williamson A, Justman B, Quian F. Time required to remove guttacore, thermafil plus, and thermoplasticized gutta-percha from moderately curved root canals with protaper files. *Journal of Endodontics*. 2013;39(1):125-8.
63. Buchanan L. The continuous wave of obturation technique: "centered" condensation of warm gutta-percha in 12 seconds. *Dentistry Today*. 1996;15(1):64-7.
64. Silver G, Love R, Purton D. Comparison of two vertical condensation obturation techniques: Touch 'n Heat modified and System B. *International Endodontic Journal*. 1999;32(4):287-95.
65. Flores A, Pastenes A. Técnicas y sistemas actuales de obturación en endodoncia. Revisión crítica de la literatura. *KIRU*. 2018;15(2):85-93.

66. Kytridou V, Gutmann J, Nunn M. Adaptation and sealability of two contemporary obturation techniques in the absence of the dentinal smear layer. *International Endodontic Journal*. 1999;32(6):464-74.
67. Gençoğlu N, Garip Y, Bas M, Samani S. Comparison of different gutta-percha root filling techniques: Thermafil, Quick-fill, System B and lateral condensation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics*. 2002;93(3):333.
68. Perry C, Kulild JC, Walker MP. Comparison of warm vertical compaction protocols to obturate artificially created defects in the apical one-third. *Journal of Endodontics*. 2013;39(9):1176-8.
69. Ørstavik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics*. 2005;12(1):25-38.
70. Rahimi M, Jainaen A, Parashos P, Messer HH. Bonding of resin-based sealers to root dentin. *Journal of Endodontics*. 2009;35(1):121-4.
71. Grossman L. Root canal sealers. In: Health WK, editor. *Grossman's Endodontic Practice*. New Delhi - Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2010. p. 301-4.
72. Tyagi S, Mishra P, Tyagi P. Evolution of root canal sealers: An insight story. *European Journal of General Dentistry*. 2013;2(3):199-218.
73. Bellizzi R, Cruse W. A historic review of endodontics, 1689-1963, part 3. *Journal of Endodontics*. 1980;6(5):576-58'.
74. Antrim D. Evaluation of the cytotoxicity of root canal sealing agents on tissue culture cells in vitro: Grossman's sealer, N2(permanent), Rickert's sealer and Cavit. *Journal of Endodontics*. 1976;2(4):111-6.
75. Cisneros Cabello R, Segura Egea J. Reparación postendodoncia con el cemento de Grossman: presentación de dos casos clínicos. *Revista Oficial de la Asociación Española de Endodoncia*. 2004;22(1):7-15.
76. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*. 1992;73(6):729-37.
77. Gualti N, Chandra S, Aggarwal P, Jaiswal J, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endodontics & Dental Traumatology*. 1991;7(4):181-5.
78. Briseno B, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. 1. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *Journal of Endodontics*. 1990;16(8):383-6.
79. Margelos J, Eliades G, Verdelis C, Palaghias G. Interaction of calcium hydroxide with zinc-eugenol type sealers: a potential clinical problem. *Journal of Endodontics*. 1997;23(1):43-8.
80. Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *Journal of the history of dentistry*. 2008;56(1):9-23.
81. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *Journal of Endodontics*. 2009;35(4):475-80.
82. Mohammadi Z, Dummer P. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011;44(8):697-730.
83. Milosevic A. Calcium hydroxide in restorative dentistry. *Journal of Dentistry*. 1991;19:3-13.
84. Manhart M. Conventional endodontic therapy and a calcium hydroxide sealant. *Chronicle*. 1974;37(9):226-7.
85. Özata F, Onal B, Erdilek N, Türkün S. A comparative study of apical leakage of Apexit, Ketac-Endo, and Diaket root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 1999;25(4):603-4.
86. Caicedo R, von Fraunhofer J. The properties of endodontic sealer cements. *Journal of Endodontics*. 1988;14(11):527-34.
87. Eldeniz A, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 2007;103(3):e86-91.

88. Azar N, Heidari M, Bahrami Z, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *Journal of Endodontics*. 2000;26(8):462-5.
89. Pane ES, Palamara JE, Messer HH. Thin and thick layers of resin-based sealer cement bonded to root dentine compared: Adhesive behaviour. *Australian Endodontic Journal*. 2015;41(3):128-34.
90. Pane ES, Palamara JE, Messer HH. Behavior of resin-based endodontic sealer cements in thin and thick films. *Dental Materials*. 2012;28(9):e150-e9.
91. Miletić I, Anić I, Karlović Z, Marsan T, Osmak M. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endodontics & Dental Traumatology*. 2000;16(6):287-90.
92. Leonardo M, Bezerra da Silva L, Filho M, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 1999;88(2):221-5.
93. Koulaouzidou E, Papazisis K, Beltes P, Germichalos G, Kostsaris A. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endodontics & dental traumatology*. 1998;14(4):182-5.
94. Vitti R, Prati C, Silva E, Sinhoreti M, Zanchi C, de Souza e Silva M, et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *Journal of Endodontics*. 2013;39(7):915-8.
95. Camilleri J. Sealers and warm gutta-percha obturation techniques. *Journal of Endodontics*. 2015;41(1):72-8.
96. Schäfer E, Bering N, Bürklein S. Selected physicochemical properties of AH Plus, EndoREZ and RealSeal SE root canal sealer. *Odontology*. 2015;103(1):61-5.
97. McMichen F, Pearson G, Rahbaran S, Gulabivala K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *International Endodontic Journal*. 2003;36(9):629-35.
98. Scarparo R, Grecca F, Fachin E. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 2009;35(2):229-32.
99. Hubbe K, de Oliveira K, Coelho B, Baratto-Filho F. AH Plus extrusion into periapical tissue: literature review of main related properties and report of clinical cases. *The South Brazilian Dentistry Journal RSBO*. 2016;13(4):280-8.
100. Duarte M, Ordinola-Zapata R, Bernardes R, Bramante C, Bernardineli N, de Moraes I. Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *Journal of Endodontics*. 2010;36(6):1048-51.
101. Ruiz-Linares M, Bailón-Sánchez M, Baca P, Valderrama M, Ferrer-Luque C. Physical properties of AH Plus with chlorhexidine and cetrimide. *Journal of Endodontics*. 2013;39(12):1611-4.
102. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. 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*. 2014;40(4):555-61.
103. Kim Y, Grandini S, Ames J, Gu L, Kim S, Pashley D, et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 2010;36(3):383-99.
104. Marin-Bauza G, Rached-Junior F, Souza-Gabriel A, Sousa-Neto M, Miranda C, Silva-Sousa Y. Physicochemical properties of methacrylate resin-based root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 2010;36(9):1531-6.
105. Kim Y, Mai S, Haycock J, Kim S, Loushine R, Pashley D, et al. The self-etching potential of Relaseal versus Realseal SE. *Journal of Endodontics*. 2009;35(9):1264-9.
106. Stelzer R, Schaller H, Gemhardt C. Push-out bond strength of realseal SE and AH Plus after using different irrigation solutions. *Journal of Endodontics*. 2014;40(10):1654-7.

107. Rokaya D, Srimaneepong V, Sapkota J, Qin J, Siraleatmukul K, Siriwongrunson V. Polymeric materials and films in dentistry: an overview. *Journal of Advanced Research*. 2018;14(3):25-34.
108. Tanomaru-Filho M, JM G-T, Leonardo M, Bezerra L. Periapical repair after root canal silling with different root canal sealers. *Brazilian Dental Journal*. 2009;20(5):389-95.
109. Gençoglu N, Türkmen C, Ahiskali R. A new silicon-based root canal sealer (RoekoSeal-Automix). *Journal of Oral Rehabilitation*. 2003;30(7):753-7.
110. Wu M, Tigos E, Wesselink P. An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: a leakage study in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 2002;94(4):499-502.
111. Barbizam J, Souza M, Cecchin D, Dabbel J. Effectiveness of a silicon-based root canal sealer for filling of simulated lateral canals. *Brazilian Dental Journal*. 2007;18(1):20-3.
112. Zielinski T, Baumqarter J. An evaluation of Guttaflow and gutta-percha in the filling of lateral grooves and depressions. *Journal of Endodontics*. 2008;34(3):295-8.
113. Wainstein MM, RD Waltrick, SB Oliveira, SD Vier-Pelisser, FV Figueiredo, JA Steier, L Tavares, CO Scarparo, RK. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Brazilian Oral Research*. 2016;30(1):1-5.
114. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dental Materials*. 2016;32(5):E113-E26.
115. Shinde A, Kokate S, Hedge V. Comparative assessment of apical sealing ability of three different endodontic sealers: A scanning electron microscopic study. *Journal of Pierre Fauchard Academy (India Section)*. 2014;28(3):78-82.
116. Parioikh M, Torabinejad M. Calcium Silicate-Based Cements. In: Torabinejad M, editor. *Mineral Trioxide Aggregate: Properties and clinical applications*: Wiley Blackwell; 2014. p. 284-321.
117. Obando Pereda G, Torres Chávez K, Salas Beltrán H, Hofing J. Análisis de la composición química, capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas del MTA y del cemento Portland. *Endodoncia*. 2009;27(3):111-20.
118. Koulaouzidou E, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *Journal of Oral Science*. 2008;50(4):397-402.
119. Marciano M, Duarte M, Camillleri J. Calcium silicate-based sealers: Assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dental Materials*. 2016;32(2):30-40.
120. Zhou H, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng Y, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 2013;39(10):1281-6.
121. Tavares C, Böttcher D, Assmann D, Kopper P, de Figueiredo J, Grecca F, et al. Tissue reaction to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *Journal of Endodontics*. 2013;39(5):653-7.
122. Best S, Porter A, Thian E, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008(7):1319-27.
123. Koch K, Brave D, Nasseh AA. A review of bioceramic technology in endodontics. *Roots*. 2012(4):6-12.
124. Malhotra S, Hegde M, Shetty C. Bioceramic technology in endodontics. *British Journal of Medicina & Medical Research*. 2014;4(12):2446-54.
125. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Periodoncia de inserción: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. In: Panamericana, editor. *Histología y embriología bucodental 2ª ed*2002.
126. Sustercic D, Sersa I. Human tooth pulp anatomy visualización by 3D magnetic resonance microscopy. *Radiology and Oncology*. 2012;46(1):1-7.
127. Van Hassel H. Physiology of the human dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*. 1971;32(1):126-34.

128. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Japanese Dental Science Review*. 2016;52(3):63-74.
129. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.
130. Mégarbané J. The physiology of the periodontal ligament. *Revue Dentaire Libanese*. 1973;23(2):31-8.
131. Berkovitz B. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dental Update*. 2004;31(1):46-50.
132. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1998;9(4):498-521.
133. García Esteo F, García Castellano J, Pérez-Caballer A. Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2005;49(1):5-16.
134. Zaki D, Zaazou M, Khallaf M, Hamdy T. In vivo comparative evaluation of periapical healing in response to calcium silicate and calcium hydroxide based endodontic sealers. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2018;6(8):1475-9.
135. Lin L, Rosenberg P. Repair and regeneration in endodontics. *International Endodontic Journal*. 2011;44(10):889-906.
136. Bezerra Silva L, Leonardo M, Faccioli L, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 1997;23(2):86-90.
137. Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canal in dogs. *Journal of Endodontics*. 1999;25(5):364-8.
138. Brackett M, Marschall A, Lockwood P, Lewis J, Messer R, Bouillaquet S, et al. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *Journal of biomedical materials research Part B, applied biomaterials*. 2009;91(2):839-44.
139. Friedman S. Prognosis of initial endodontic therapy. *Endodontic Topics*. 2002;2(1):59-88.
140. Ng Y, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *International Endodontic Journal*. 2011;44(7):583-609.
141. Ørstavik D, Mjör IA. Histopathology and X-ray microradiography of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 1988;14(1):13-23.
142. Soares I, Goldberg F, Massone E, Soares IM. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 1990;16(4):166-9.
143. Pascon E, Leonardo M, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991;72(2):222-37.
144. Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *International Endodontic Journal*. 1998;31(6):394-409.
145. Bernáth M, Szabó J. Tissue reaction initiated by different sealers. *International Endodontic Journal*. 2003;36(4):256-61.
146. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed: Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2005.
147. Huang F, Yang S, Chang Y. Effects of root canal sealers on alkaline phosphatase in human osteoblastic cells. *Journal of Endodontics*. 2010;36(7):1230-3.
148. Leonardo M, Salgado A, daSilva L, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dog's teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Brazilian Oral Research*. 2003;17(1):69-74.

149. Sousa C, Loyola A, Versiani M, Biffi J, Oliveira R. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *International Endodontic Journal*. 2004;37(11):738-48.
150. Leonardo M, Silva L, Utrilla L, Assed S, Ether S. Calcium hydroxide root canal sealers- histopatologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. 1997;23(7):428-32.
151. Ricucci D, Rôças I, Alves F, Siqueira JJ. Apically extruded sealers: Fate and influence on treatment outcome. *Journal of Endodontics*. 2016;42(2):243-9.
152. Zmener O, Banegas G, Pameijer C. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. *Journal of Endodontics*. 2005;31(6):457-9.
153. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):35-8.
154. Nava M, Raimondi M, Pietrabissa R. Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012(797410):12.
155. Hanna J, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143(2):508-25.
156. Wada N, Wang B, Lin N, Laslett A, Gronthos S, Bartold P. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*. 2011;46(4):438-47.
157. Kang K, Trosko J. Stem Cells in toxicology: Fundamental biology and practical considerations. *Toxicological Sciences*. 2011;120(1):s269-s89.
158. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2015;6(1):29-34.
159. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1966;16(3).
160. Afanasyev B, Elstner E, Zander A. A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2009;1(3):35-8.
161. Horwitz E, Le blanc K, D'Amico M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
162. D'Amico M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
163. Bühring H, Battula V, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1106:262-71.
164. Battula V, Tremel S, Bareiss P, Geiseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal cell antigen-1. *Haematologica*. 2009;94(2):173-84.
165. Lin H. The tao of stem cells in the germline. *Annual Review of Genetics*. 1997;31:455-91.
166. Tuan R, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*. 2003;5(1):32-45.
167. Hassan H, El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *Journal of The Royal Society of Medicine*. 2004;97(10):465-71.
168. Schipani E, Kronenberg H. Adult mesenchymal stem cells. In: *Community TSCR*, editor. *StemBook*: Harvard Stem Cell Institute; 2009.
169. González-García M, Rodríguez-Lozano F, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González M, Oñate-Sánchez R, et al. Mesenchymal stem cells and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the future? *Oral Diseases*. 2012;18(8):823-4.

170. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016;45(1):124-31.
171. Nasef A, Fouillard L, El-Taguri A, Lopez M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Libyan Journal of Medicine*. 2007;2(4):190-201.
172. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*. 2012;56(3):151-65.
173. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13625-30.
174. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*. 2002;81(8):531-5.
175. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *Journal of Dental Research*. 2010;89(8):773-8.
176. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L, Robey P, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(10):5807-12.
177. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Takayoshi Y, Seo B, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLOS One*. 2006;1(1):e79.
178. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R, Wang S, Huang G. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*. 2008;34(2):166-71.
179. Huang G, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bio-root engineering. *Journal of Endodontics*. 2008;34(6):645-51.
180. Bekovitz B. The structure of the periodontal ligament: an update. *European Journal of Orthodontics*. 1990;12(1):51-76.
181. McCulloch C, Lekic P, McKee M. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology 2000*. 2000;24:56-72.
182. Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
183. Gronthos S, Graves S, S O, Simmons P. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84(12):4164-73.
184. Gronthos S, Mrozik K, Si S, Bartold P. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcified Tissue International*. 2006;79(5):310-7.
185. Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *Journal of Dental Research*. 2005;84(10):907-12.
186. Li Y, Jin F, Du Y, Z M, Li F. Cementum and periodontal ligament-like tissue formation induced using bioengineered dentin. *Tissue Engineering Part A*. 2008;14(10):1731-42.
187. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et al. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Engineering Part A*. 2011;17(7-8):1015-26.
188. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P. Clinical utility of stem for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2012;59(1):203-27.
189. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold P, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;219(3):667-76.
190. Estrela C, Freitas Silva B, Silva J, Yamamoto-Silva F, Pinto-Júnior D, Gomez R. Stem cell marker expression in persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2017;43(1):63-8.
191. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *International Endodontic Journal*. 1980;13(3):131-8.

192. Krewski D, Acosta DJ, Andersen M, Anderson H, Bailar Jr, Boekelheide K, et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and strategy. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B, Critical Reviews*. 2010;13(2-4):51-138.
193. Murray P, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina oral, Patología oral y Cirugía Bucal*. 2007;12(3):E258-E66.
194. K M, Brook I, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*. 2009;2(2):514-48.
195. Wennberg A. Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo methods. *Journal of Endodontics*. 1980;6(10):784-7.
196. Osorio R, Hfti A, Vertucci F, Shawley A. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*. 1998;24(2):91-6.
197. Torabinejad M, Hong C, Ford T, Kariyawasam S. Tissue reaction to implanted super-EB and mineral trioxide aggregate in the mandibel of guinea pigs: A preliminary report. *Journal of Endodontics*. 1995;21(11):569-71.
198. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Jornal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
199. Edmondson J, Armstrong L, AO M. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of Tissue Culture Methods*. 1988;11(1):15-7.
200. Browne R. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role? *International Endodontic Journal*. 1988;21(2):50-8.
201. da Silva E, Zaia A, Peters O. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimesional cell culture model. *Clinical Oral Investigations*. 2017;21(5):1531-6.
202. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on Good Cell Culture Practice - A report of the second ECVAM task force on Good Cell Culture Practice. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. 2005;33(3):261-87.
203. Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, Tagle D, Allen D, Gerhold D, et al. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. *ALTEX*. 2017;34(1):95-132.
204. Peters O. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *International Endodontic Journal*. 2013;46(3):195-7.
205. Rodríguez-Lozano F, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo J, Coronado-Parra M, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda J. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damage or apoptosis and mesenchymal markers expression). *Journal of Materials Acience Materials in Medicine*. 2013;24(4):979-88.
206. Lauffenburger D, Horwitz A. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996;84(3):359-69.
207. Yarrow J, Perlman Z, Westwood N, Mitchison T. A high-throughput cell migration assay usign scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology*. 2004;4(21):1-9.
208. Liang C, Park A, Guan J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2007;2(2):329-33.
209. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research*. 2013;752(1):10-24.
210. Bae K, Chang S, Nae K, Park D. Evaluation of ph and calcium ion release in capseal I and II and two other root canal sealers. *Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2011;112(5):e23-e8.
211. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru J, Hungaro-Duarte M, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dental Materials*. 2014;30(9):1005-20.

212. Camillieri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *International Endodontic Journal*. 2012;45(8):737-43.
213. Simsek N, Bulut E, Ahmetoglu F, Alan H. Determination of trace elements in rat organs implanted with endodontic repair materials by ICP-MS. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2016;27(3):1-46.
214. Gumbiner B. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996;84(3):345-57.
215. Hynes R. Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Cell Biology*. 1999;9(12):m33-m7.
216. Sampaio F, Alencar A, Guedes O, Veloso H, Santos T, Estrela C. Chemical elements characterization of root canal sealers using scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Oral Health and Dental Management*. 2014;13(1):27-34.
217. Saleh I, Ruyter I, Haapasalo M, Orstavik D. Adhesion of endodontic sealers: a scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. *Journal of Endodontics*. 2003;29(9):595-601.
218. Borges R, Sousa-Neto M, Versiani M, Rached-Júnior F, De-Deus G, CE M, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal*. 2012;45(5):419-28.
219. Khalil I, Naaman A, Camillieri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *Journal of Endodontics*. 2016;42(10):1529-35.
220. Wataha J. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001;86(2):203-9.
221. Williams D. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
222. ISO 10993-5/ ISO-12 Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Test for in vitro cytotoxicity. Part 12: Sample preparation and reference materials., (2009).
223. Hanks C, Wataha J, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*. 1996;12(3):186-93.
224. Schmalz G, Widbiller M, Galler K. Material tissue interaction-From toxicity to tissue regeneration. *Operative Dentistry*. 2016;41(2):117-31.
225. Peng L, L Y, Zhou X. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *International Journal of Oral Science*. 2009;1(1):6-12.
226. Bartold P, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 2006;40:164-72.
227. Viña-Almunia J, Borrás C, Gambini J, El Alamy M, Peñarrocha M, Viña J. Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2016;1;21(3):e374-e9.
228. Lee J, Kim E, Han S, Kang K, Heo J. Evaluating the oxysterol combination of 22(S)-hydroxycholesterol and 20(S)-hydroxycholesterol in periodontal regeneration using periodontal ligament stem cells and alveolar bone healing models. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8(276).
229. Yao S, Zhao W, Ou Q, Liang L, Lin X, Wang Y. MicroRNA-214 Suppresses Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells by Targeting ATF4. *Stem Cell International*. 2017;2017(Article ID 3028647):13.
230. Daltoé M, Paula-Silva F, Faccioli L, Gatón-Hernández P, De Rossi A, Bezerra Silva L. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*. 2016;42(4):596-603.
231. Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*. 2014;40(8):1118-23.

232. Borges A, Guedes O, Dorileo M, Coelho Bandeca M, Almeida Estrela C, Estrela C. Analysis of chemical elements and heavy metals in MTA Fillapex and AH Plus. *Journal of Oral Health and Dental Management*. 2014;13(4):1007-12.
233. Reszka P, Nowicka A, Lipski M, Dura W, Drozdziak A, Wozniak K. A Comparative Chemical Study of Calcium Silicate-Containing and Epoxy Resin-Based Root Canal Sealers. *Biomed Research International*. 2016:8.
234. Camargo R, Silva-Sousa Y, Rosa R-C, JF, Lopes F, Steier L, Sousa-Neto M. Evaluation of the physicochemical properties of silicone-and epoxy resin-based root canal sealers. *Brazilian Oral Research*. 2017;31:e72.
235. Tanomaru-Filho M, Torres F, Chávez-Andrade G, de Almeida M, Navarro L, Steier L, et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers *Journal of Endodontics*. 2017;43(12):2097-101.
236. Keiser K, Johnson C, Tipton D. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 2000;26(5):288-91.
237. da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes E, Basso F, Hebling J, de Souza Costa C, Soares D. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clinical Oral investigations*. 2016;20(7):1559-66.
238. Silva G, Cavalcanti B, Oliveira T, Bin C, Camargo S, Camargo C. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clinical Oral Investigations*. 2016;20(4):815-9.
239. Rodríguez-Lozano F, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Ortolani-Seltenerich P, Forner L, Moraleda J. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *International Endodontic Journal*. 2017;50(1):67-76.
240. Tai K, Huang F, Chang Y. Cytotoxic Evaluation of Root Canal Filling Materials on Primary Human Oral Fibroblast Cultures and a Permanent Hamster Cell Line. *Journal of Endodontics*. 2001;27(9):571-3.
241. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *Journal of Endodontics*. 2005;31(4):307-9.
242. Brackett M, Marshall A, Lockwood P, Lewis J, Messer R, Bouillaguet S, et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-week ex vivo. *International Endodontic Journal*. 2008;41(12):1072-8.
243. Bouillaguet SW, JC, Tay F, Brackett M, Lockwood P. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 2006;32(10):989-92.
244. Al-Hiyasat A, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International Endodontic Journal*. 2010;43(2):148-53.
245. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes M. Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate-based endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 2016;42(1):113-9.
246. Bin C, MC, Camargo S, Rabelo S, Silva G, Balducci I, Camargo C. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*. 2012;38(4):495-500.
247. Silva E, Rosa T, Herrera D, Jacinto R, Gomes B, Zaia A. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *Journal of Endodontics*. 2013;39(2):274-7.
248. Yoshino P, Nishiyama C, Modena K, Santos C, Sipert C. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Brazilian Dental Journal*. 2013;24(2):111-6.
249. Zhou H, Du T, Shen Y, Wang Z, Zheng Y, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics*. 2015;41(1):56-61.

250. Chang S, Lee S, Kang S, Kum K, Kim E. 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*. 2014;40(10):1642-8.
251. Camargo C, oliveira T, Silva G, Rabelo S, Valera M, BN C. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *Journal of Endodontics*. 2014;40(4):530-3.
252. Eldeniz A, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl J. 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*. 2007;40(5):329-37.
253. Brzovic V, Miletic I, Zelijezić D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, et al. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *International Endodontic Journal*. 2009;42(3):253-63.
254. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang Y, Safavi K, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2011;112(5):657-61.
255. Cortázar Fernández C, García Aranda R, Willerhausen I, Willerhausen R, Briseño Marroquin B. Evaluación de la citotoxicidad de distintos cementos selladores endodónticos en cultivos de fibroblastos gingivales. *Revista Odontológica Mexicana*. 2013;17(1):33-41.
256. Accardo C, Himel V, Lallier T. A novel Guttaflow sealer supports cell survival and attachment. *Journal of Endodontics*. 2014;40(2):231-233.
257. Mandal P, Zhao J, Sah S, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of Guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 2014;40(8):1156-9.
258. Silva E, Neves A, De-Deus G, Accorsi-Mendoza T, Moares A, Valentim R, et al. Cytotoxicity and gelatinolytic activity of new silicon-based endodontic sealer. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. 2015;13(4):e376-e80.
259. Güven E, Yalvaç M, Kayahan M, Sunay H, Şahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *Journal of Applied Oral Science*. 2013;21(4):351-7.
260. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas J. Behaviour of co-cultures human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers' extracts. *Clinical Oral Investigations*. 2014;18(1):479-88.
261. Candeiro G, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto R, Azambuja-Júnior N, Marques M, Cai S, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *International Endodontic Journal*. 2015;49(9):858-64.
262. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Davut Capar I. In vitro cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iranian Endodontic Journal*. 2017;12(3):354-9.
263. Rennert R, Sorkin M, Garg R, Gurtner G. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regenerative Medicine*. 2012;7(6):833-50.
264. Tremel A, Cai A, Tirtaatmadja N, Hughes B, Stevens G, Landman K, et al. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chemical Engineering Science*. 2009;64(2):247-53.
265. Johnston S, Ross J, Binder B, Sean McElwain D, Haridas P, Simpson M. Quantifying the effect of experimental design choices for in vitro scratch assays. *Journal of Theoretical Biology*. 2012;400(7):19-31.
266. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Ortolani-Seltenerich P, Álvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *International Endodontic Journal*. 2017;50 Suppl 2:e19-e30.
267. Aquino-Martínez R, Angelo A, Pujol F. Calcium-containing scaffolds induce bone regeneration by regulating mesenchymal stem cell differentiation and migration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8(1):265-75.

268. Chen I, Karabucak B, Wang C, Wang H, Koyama E, Kohli M, et al. Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. *Journal of Endodontics*. 2015;41(3):389-99.
269. Gusiyska A, Dyulgerova E. Calcium phosphate bioceramic as apical barrier material in complicated cases - A case report. *International Journal of Science Research*. 2015;4:2177-81.
270. Hahn G, Shiu E. Effect of pH and elevated temperatures on the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents on Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Research*. 1983;43(12 Pt 1):5489-791.
271. Brusick D. Genotoxic effects in cultures mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*. 1986;8(6):879-86.
272. Taylor Howard E. *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Practices and Techniques*. Kingsport: Physical and Analytical Research, Eastman Chemical Company; 2001.
273. Lyon T, Fell G, Hutton R, Eaton A. Evaluation of inductively coupled argon plasma mass spectrometry (ICP-MS) for simultaneous multi-element trace analysis in clinical chemistry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1988;3(1):265-71.
274. Lee JH, Lee HH, Kim KN, KM K. Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of zinc ions and eugenol during setting of ZOE in immortalized human oral keratinocytes grown as three-dimensional spheroids. *Dental Materials*. 2016;32(5):e93-e104.
275. Wendl B, Wiltsche H, Lankmayr E, Winsauer H, Walter A, Muchitsch A, et al. Metal release profiles of orthodontic bands, brackets, and wires: an in vitro study. *Journal of Orofacial Orthopedics*. 2017;78(6):494-503.
276. Tomás-Catalá C, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal*. 2017;50(S2):e63-e72.
277. Yamada S, Ota Y, Obata A, Kasuga T. Osteoblast-like cell responses to ion products released from magnesium- and silicate-containing calcium carbonates. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2017;28(1):47-56.
278. McBeath R, Pirone D, Nelson C, Bhadriraju K, Chen C. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*. 2004;6(4):483-95.
279. Ahmed H, Luddin N, Kannan T, Mokhtar K, Ahmad A. Cell attachment properties of Portland cement-based endodontic materials: biological and methodological considerations. *Journal of Endodontics*. 2014;40(10):1517-23.
280. Chen I, Salhab I, Setzer F, Kim S, Nah H. A New Calcium Silicate-based Bioceramic Material Promotes Human Osteo- and Odontogenic Stem Cell Proliferation and Survival via the Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling Pathway. *Journal of Endodontics*. 2016;42(3):480-6.
281. Mathieu P, Lobo E. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012;18(6):436-44.
282. Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008;12(2):537-52.
283. Kilian K, Bugarija B, Lahn B, Mrksich M. Geometric cues directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(11):4872-7.
284. Titushkin I, Cho M. Controlling cellular biomechanics of human mesenchymal stem cells. 2009.

IX – ANEXOS

1. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

1.1. LISTADO DE TABLAS

N° de tabla	Descripción	Página
Tabla 1	Clasificación de cementos según su composición.	17
Tabla 2	Tabla de componentes de los cementos utilizados.	64
Tabla 3	Valores de absorbancia obtenidos a las 24 horas.	81
Tabla 4	Valores de absorbancia obtenidos a las 48 horas.	81
Tabla 5	Valores de absorbancia obtenidos a las 72 horas.	82
Tabla 6	Valores de absorbancia obtenidos a las 168 horas.	82
Tabla 7	Comparativa mediante t-Student entre todos los cementos y su significancia ($P < 0.05$, $P < 0.01$), $p < 0.001$).	83
Tabla 8	ANOVA de un factor para los valores de absorbancia sin diluir.	84
Tabla 9	ANOVA de un factor para los valores de absorbancia para la dilución $\frac{1}{2}$.	85
Tabla 10	ANOVA de un factor para los valores de absorbancia para la dilución $\frac{1}{4}$.	86
Tabla 11	Tabla de test de t de Student con respecto a la representación del porcentaje de área sin cubrir tras el tiempo indicado (24 o 48 horas). * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.0001 .	93
Tabla 12	Resultados de los ensayos de pH, presión osmótica e ICP-MS	94

1.2. LISTADO DE FIGURAS

N° de figura	Descripción	Página
Figura 1	Técnica de la condensación lateral en frío.	8
Figura 2	Técnica de la condensación vertical en caliente.	10
Figura 3	Técnica de obturación con transportadores.	12
Figura 4	Técnica de la onda continua.	13
Figura 5	AH Plus® comercializado en formato de dos pastas.	21
Figura 6	GuttaFlow 2® comercializado en formato de doble jeringa.	25
Figura 7	GuttaFlow Bioseal® comercializado en formato de doble jeringa.	26
Figura 8	MTA Fillapex® comercializado como jeringa de doble pasta.	28
Figura 9	Esquema de las estructuras del diente y de los tejidos periapicales.	31
Figura 10	Fuentes de células madre en la región oral y maxilofacial. SGSCs: células madre derivadas de glándula salival; DFSCs: células madre de folículo dental; TGPCs: células madre de germen dental; SCAP: células madre de papila apical; DPSCs: células madre de pulpa dental; PDLSCs: células madre de ligamento periodontal; SHED: células madre de diente deciduo exfoliado; BMSCs: célula madre de médula ósea; OESCs: células madre de tejido oralepitelial; GMSCs: células madre adultas derivadas de tejido gingival; PSCs: células madre derivadas de periostio.	41
Figura 11	Ejemplo de cordal utilizado y modo de transporte de dientes extraídos en tubo Falcon con MEM.	57
Figura 12	Obtención del LP a partir de los dientes exodonciados en cabina de seguridad biológica Clase II. Se rascó con un bisturí	

	el tercio medio y apical hasta depositar suficiente sustrato en la placa Petri.	58
Figura 13	Disgregación mecánica y enzimática.	59
Figura 14	Frasco de cultivo celular ventilado de 75cm ² .	60
Figura 15	Modelo gráfico de la identificación celular mediante inmunocitofluorescencia.	61
Figura 16	A) y B) Recuento celular manual con azul tripán. C) Cámara de Neubauer o hemocitómetro.	62
Figura 17	Cementos endodónticos utilizados.	63
Figura 18	Discos de los cementos endodónticos fraguados.	64
Figura 19	Método de elución para los cementos endodónticos.	65
Figura 20	A) Adición del MTT. B) Frasco de dimetil sulfóxido.	67
Figura 21	A) Ejemplo de placa de 96 pocillos con células en contacto con los eluatos a distintas diluciones. B) Ensayo MTT.	67
Figura 22	A) Agitación mediante el espectrofotómetro. B) Ejemplo de liberación de formazán.	68
Figura 23	Esquema del ensayo de migración.	69
Figura 24	Técnica “wound healing” para realizar ensayo de migración.	70
Figura 25	Medidor de pH modelo GLP21+.	71
Figura 26	Espectrómetro para ICP-MS Agilent 7900, Stockport, UK.	72
Figura 27	Cámara de secado de punto crítico Leica EM CPD030.	74
Figura 28	A) Metalizador 134 Bio RAD Polaron SEM COATEM SYSTEM E5100 B) Muestras recubiertas de oro mediante la técnica de “sputtering”.	74

Figura 29	Microscopio electrónico de barrido (Jeol 6100 EDAX, USA).	75
Figura 30	A) unidad CC7650 SEM Carbon Coater B) Muestras recubiertas con carbón.	76
Figura 31	Evolución en tiempo del sembrado y confluencia celular. A) Pellet celular del ligamento periodontal día 0. B) Primeras células se adhieren al frasco día 10. C) Ya vemos colonias de células adheridas y dividiéndose día 15. D) Observamos confluencia de un 80-90% día 20.	79
Figura 32	Inmunocitofluorescencia para la identificación de las hPDLSCs. A) Positivo para el marcador CD 90. B) Positivo para el marcador CD 73. C) Positivo para el marcador CD 105. D) Negativo para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45.	80
Figura 33	Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT sin diluir. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.	84
Figura 34	Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT con dilución 1/2. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.	85
Figura 35	Representación gráfica de líneas para los resultados del MTT con dilución 1/4. La absorbancia está representada en el eje de ordenadas o eje Y. El tiempo (en horas) está representado en el eje de abscisas o eje X.	86
Figura 36	Comparativa de migración GuttaFlow Bioseal vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.	88
Figura 37	Comparativa de migración GuttaFlow 2 vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.	89
Figura 38	Comparativa de migración MTA Fillapex vs. Control. Se	

	observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.	90
Figura 39	Comparativa de migración AH Plus vs. Control. Se observan las imágenes obtenidas a las 0, 24 y 48 horas en todas las diluciones.	91
Figura 40	Representación del porcentaje de área sin cubrir tras el tiempo indicado (24 o 48 horas). El nivel de significancia respecto al control se indica en la gráfica. El nivel de significancia entre los diferentes tratamientos se indica en la tabla inferior. En todos los casos dicho nivel de significancia se ha evaluado mediante el test de t de Student. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.0001 .	92
Figura 41	MEB de la adhesión y morfología celular a 100x, 500x y 1000x de GuttaFlow 2 y GuttaFlow Bioseal a las 168 horas.	95
Figura 42	MEB de la adhesión y morfología celular a 100x, 500x y 1000x de AH Plus y MTA Fillapex.	96
Figura 43	MEB EDX de GuttaFlow Bioseal y GuttaFlow 2. Observamos la imagen capturada de la superficie del cemento, el espectro de los elementos de esa superficie y la cuantificación de dichos elementos.	97
Figura 44	MEB EDX de AH Plus y MTA Fillapex. Observamos la imagen capturada de la superficie del cemento, el espectro de los elementos de esa superficie y la cuantificación de dichos elementos.	98

2. HOJA EXPLICATIVA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Investigación titulado: “Estudio *in vitro* de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental”.

Investigadores principales: D. Christopher Joseph Tomás Catalá, Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano.

Promotor: Servicio de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina (Universidad de Murcia).

Se solicita su participación en este proyecto de investigación, cuyo **objetivo principal** es profundizar en el conocimiento de la biocompatibilidad de cementos selladores endodónticos.

En este estudio participa el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y el Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) de la Universidad de Murcia

Se estima que participen un total de 10 pacientes de dicho servicio hospitalario.

Su participación en este estudio no implica que obtenga un beneficio económico. Sin embargo, la identificación de posibles factores citotóxicos relacionados con la utilización de estos cementos selladores endodónticos podría beneficiar el curso de la terapia endodóntica a nivel clínico. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide participar, se le realizará una historia clínica breve y la exodoncia de un/varios cordal/es programada por su dentista/facultativo y se extraerá el ligamento periodontal de la/las pieza/as exodonciada/as para obtener las muestras de células madre de dicho ligamento periodontal que contiene su ADN y que, en este estudio, no será tipificado ni utilizado para ningún otro fin. La toma de muestras de ligamento periodontal no supone ningún riesgo para su salud ya que se realiza en un laboratorio de manera *in vitro* a partir de los cordales ya exodonciados.

Se le pedirá su consentimiento para que con sus cordales exodonciados se hagan 2 cosas:

1. Que acepte que se obtengan células madre del ligamento periodontal de sus cordales para la realización de este estudio.
2. Que autorice al investigador a almacenar su muestra para la realización de otros estudios similares al presente, con técnicas similares y con los mismos u otros cementos endodónticos selladores que se desarrollen en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella.

usted puede aceptar que sólo se utilice el ligamento periodontal de sus cordales para el estudio descrito en el punto 1.

usted puede aceptar las propuestas de los puntos 1 y 2.

usted puede decidir no aceptar ninguna de ellas.

Si usted acepta sólo el estudio descrito en el punto 1, su muestra se destruirá después de completar la prueba. Si usted acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en el punto 2, el investigador garantizará que guardará y utilizará la muestra. Una vez desvinculada la muestra no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar con usted.

Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético acepta y firmando este documento, antes de la obtención del ligamento periodontal.

Título del estudio: “Estudio *in vitro* de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental”.

Promotor del estudio: Servicio de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina (Universidad de Murcia)

Investigadores principales del estudio: D. Christopher Joseph Tomás Catalá y el Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano.

1. Yo
declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio.

2. Se me ha entregado una copia de la hoja de información al paciente y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi/s cordal/es con un número codificado.

4. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.

5. Entiendo que el objetivo del estudio es evaluar la biocompatibilidad de células madre del ligamento periodontal (LP) frente a cementos selladores endodónticos y que los resultados del mismo no se comunicarán ni a mí ni a mi médico, excepto en el caso de que dichos hallazgos tienen ninguna implicación significativa para la salud de los participantes y que exista una posibilidad real de mejorar el uso de los cementos endodónticos selladores.

Responda con un círculo en una de las dos opciones:

Punto 1. Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar el estudio referente a la biocompatibilidad de los cementos selladores endodónticos frente a las células madre del ligamento periodontal en mi muestra de LP.

Punto 2. Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra de LP con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro cuando se desarrollen otros cementos endodónticos.

Punto 3. Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que en mi muestra de LP desvinculada se puedan realizar futuros estudios con otros cementos selladores endodónticos.

Consiento en participar voluntariamente en el apartado marcado de este estudio.

Fecha:

Firma del paciente:.....

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus apartados y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Firma del facultativo: D. Christopher Joseph Tomás Catalá

COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS

D. Christopher Joseph Tomás Catalá y el Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano.

Servicio de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina (Universidad de Murcia)

Hace constar:

- Que va a realizar el Proyecto de Investigación titulado: “Estudio *in vitro* de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental”, utilizando muestras biológicas procedentes de material obtenido a partir de cordales exodonciados, siguiendo lo establecido en el Proyecto de Investigación autorizado por la Comisión Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.
- Que se compromete a mantener una estricta confidencialidad de los datos personales procedentes de dichas muestras.
- Que los resultados obtenidos de dicho Proyecto de Investigación podrán ser divulgados en congresos, reuniones y publicaciones científicas salvaguardando siempre la confidencialidad de los datos personales.
- Que dicho estudio se llevará a cabo contando con la colaboración de D^a. María del Mar Collado González y el Dr. Ricardo Elías Oñate Sánchez como investigadores colaboradores.

En Murcia a de de 2017

Dr. Christopher Joseph Tomás Catalá.
Investigador principal.

Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano
González.
Investigador principal.

María del Mar Collado
Co-investigadora.

Dr. Ricardo Elías Oñate Sánchez
Co-investigador.

3. CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DELA ARRIXACA DE MURCIA



Arrixaca

Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"

Ctra. Madrid - Cartagena · Telf. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 27/03/2017, acta 03/17 ha evaluado la propuesta del investigador **Christopher Joseph Tomás Catalá** referida al estudio:

Título: Estudio in vitro de la citotoxicidad de materiales biocerámicos utilizados en endodoncia sobre células mesenquimales de origen dental

Código Interno: 2017-3-8-HCUVA

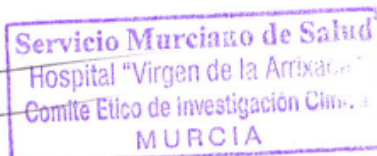
1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Murcia, a 27 de marzo de 2017

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

4. CERTIFICADO DE FORMACIÓN Y COMPETENCIA PARA LA MANIPULACIÓN DE CÉLULAS DE ORIGEN ANIMAL.



EL VICERRECTORADO DE FORMACIÓN E INNOVACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA
conforme a las disposiciones y circunstancias previstas por la legislación vigente, expide a

D. CHRISTOPHER TOMÁS CATALÁ

con D.N.I. N° 48520203R, por haber seguido con asiduidad y aprovechamiento el presente

CERTIFICADO DE ASISTENCIA EN EL CURSO CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES: CONCEPTOS BÁSICOS Y TÉCNICAS APLICADAS
(XXII Edición)

con una asignación de 4 ECTS, realizado del 13 de febrero al 30 de marzo de 2017, y promovido por SERVICIO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (SAI)

Murcia, a 31 de mayo de 2017

EL VICERRECTOR



Fdo.: D. PEDRO MIRALLES MARTÍNEZ



LA DIRECTORA DEL CURSO

A. Busal

Fdo.: D^a ANTONIA BERNABEU ESCLAPEZ

N° de registro: 78923

La actividad tiene la siguiente acreditación/homologación, Acreditación de Interés Sanitario Expt. 63/2016 otorgado por Consejería de Sanidad y Consumo de la CARM

5. CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE POSTER EN LAS III JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

Máster en Endodencia VIERNES ENDODÓNCICOS

Diploma de colaboración a favor de:

D. Cristopher J. Tomás Catalá

Por su participación en el Máster de Endodencia de la Universitat de València,
en el marco de las jornadas "Viernes Endodóncicos",

presentando la ponencia de investigación:

"Nuevos cementos basados en silicona y MTA y su efecto sobre las células madre de origen dental".

Valencia, 3 de febrero de 2017



Prof. Dr. Forner Navarro

Dra. Almenar Garcia

7. CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE COMUNICACIÓN ORAL EN LA FDI WORLD DENTAL CONGRESS 2017



Bringing the World together
to improve oral health



Madrid, Spain
29 August - 1 September 2017

FC268

CERTIFICATE of PRESENTATION

THIS IS TO CERTIFY THAT

Christopher Joseph Tomás-Catalá

has contributed with a **Free Communication** presentation titled:

Cytotoxicity of new bioceramic materials on human dental stem cells

Authors:

Christopher Joseph Tomás-Catalá, Maria Del Mar Collado-González, Francisco Javier Rodríguez-Lozano, Ricardo Elías Oñate-Sánchez

in the **FDI World Dental Congress** in Madrid, Spain,
29 August-1 September 2017



Dr. Sally Hewett
FDI Educational Committee Chair



Dr. Oscar Castro
Local Organizing Committee President

FDI World Dental Federation – PO Box 3, Avenue Louis Casai 51, 1216 Geneve – Cointrin SWITZERLAND
Tel. +41225608150 Fax: +41225608140 – e-mail: info@fdiworlddental.org

8. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN PUBLICADO EN EL JOURNAL OF ENDODONTICS

J Endod. 2017 May;43(5):816-822. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.001.

Basic Research—Technology

Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on Human Periodontal Ligament Stem Cells



Mar Collado-González, BSc, MBB, MSc,* Christopher J. Tomás-Catalá, DDS, MSc,*[†]
Ricardo E. Oñate-Sánchez, MD, DDS, PhD,[‡] José M. Moraleda, MD, PhD,*
and Francisco J. Rodríguez-Lozano, DDS, PhD*[‡]

Abstract

Introduction: The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of endodontic sealers (GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, and MTA Fillapex) on human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). As a reference, AH Plus was compared with the more recent endodontic sealers regarding cell viability and cell attachment. **Methods:** Biological testing was carried out *in vitro* on hPDLSCs. Cell viability assay was performed by using eluates from each endodontic sealer. To assess cell morphology and attachment to the different sealers, the hPDLSCs were directly seeded onto the material surfaces and analyzed by scanning electron microscopy. Chemical composition of the sealers was determined by energy-dispersive x-ray, and eluates were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry. Statistical differences were assessed by analysis of variance and Tukey test ($P < .05$). **Results:** Cell viability was evident after 24 hours in the presence of GuttaFlow Bioseal and GuttaFlow 2 but not in the case of AH Plus or MTA Fillapex. At 168 hours, GuttaFlow Bioseal and GuttaFlow 2 exhibited high and moderate cell viability, respectively, whereas AH Plus and MTA Fillapex revealed low rates of cell cell viability ($P < .001$). Finally, scanning electron microscopy studies revealed a high degree of proliferation, cell spreading, and attachment, especially when using GuttaFlow Bioseal disks. **Conclusions:** GuttaFlow Bioseal and GuttaFlow2 showed lower cytotoxicity than MTA Fillapex and AH plus. Further *in vitro* and *in vivo* investigations are required to confirm the suitability of GuttaFlow Bioseal for clinical application. (J Endod 2017;43:816–822)

Key Words

Adhesion, calcium silicate-based endodontic sealers, cytotoxicity, human periodontal ligament stem cells, mineral trioxide aggregate

The aim of endodontic treatment, after cleaning and shaping the root canal system, is three-dimensional filling and sealing of all root canals and their accessory spaces

to avoid the presence of microorganisms and promote periradicular tissue repair (1).

Combined with gutta-percha, endodontic sealers have an important role within obturation techniques (2). It is known that such techniques may involve the non-intentional extrusion of the obturation materials beyond the apical foramen (3, 4). Endodontic sealers are expected to have at least a minimum contact with periradicular tissues when sealing the apex. However, when extruded into the periradicular spaces, sealers may not always be removed by periradicular tissue reaction (5) and may alter tissue repair time (6) and cause different tissue reactions depending on the sealer's composition (7). As a result, *in vitro* cytotoxic studies of these endodontic sealers are the first step toward an evaluation of their safety (8).

The biological properties of endodontic sealers have been tested *in vitro* for a long time by using animal cell lines such as L-929 mouse fibroblast, RPC-C2A rat pulp cells, osteoblastic cells, and more recently, human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs), which are a multipotent stem cell population able to differentiate into cementoblasts and to develop a new periodontal ligament, including cementum, alveolar bone, and periodontal fibers (9–12). It has been reported that PDLSCs express mesenchymal stem cell (MSC) markers, CD105, CD73 and CD90, and have immunosuppressive properties (13).

Calcium silicate-based materials are recognized as bioactive materials through their capacity to induce hard tissue formation in both the dental pulp and bone, defining a new treatment approach for dentin remineralization, vital pulp therapy, and bone regeneration (14). The excellent properties of mineral trioxide aggregate (MTA) (including their biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity) have fostered a race to develop new calcium silicate-based endodontic sealers incorporating MTA.

Significance

These results may suggest that GuttaFlow Bioseal may achieve better biological response and healing when compared with GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus.

From the *Cellular Therapy and Hematopoietic Transplant Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB-Arrixaca, and [†]School of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain.

Address requests for reprints to Dr Francisco J. Rodríguez-Lozano, School of Dentistry, University of Murcia, Hospital Morales Meseguer 2pl, Av. Marqués de los Vélez s/n, 30008 Murcia, Spain. E-mail address: fcojavier@um.es
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2017 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.001>



9. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN PUBLICADO EN EL INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDODONTICS

Int Endod J. 2017 Dec;50 Suppl 2:e63-e72. doi: 10.1111/iej.12859.

INTERNATIONAL
ENDODONTIC JOURNAL

doi:10.1111/iej.12859

Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells

C. J. Tomás-Catalá^{1,2,*}, M. Collado-González^{1,*}, D. García-Bernal¹, R. E. Oñate-Sánchez², L. Forner³, C. Llana³ , A. Lozano³, P. Castelo-Baz⁴, J. M. Moraleda¹ & F. J. Rodríguez-Lozano^{1,2} 

¹Cellular Therapy and Hematopoietic Transplant Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMB-Arrixaca, University of Murcia, Murcia; ²Faculty of Medicine, School of Dentistry, University of Murcia, Murcia; ³Department of Stomatology, University of Valencia, Valencia; and ⁴University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Abstract

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llana C, Lozano A, Castelo-Baz P, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal*, 50, e63–e72, 2017.

Aim To evaluate the biological effects *in vitro* of MTA-Angelus (MTA-Ang; Angelus, Londrina, PR, Brazil), MTA Repair HP (MTA-HP; Angelus) and NeoMTA Plus (NeoMTA-P; Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, USA) on human dental pulp stem cells (hDPSCs).

Methodology Cell viability and cell migration assays were performed using eluates of each material. To evaluate cell morphology and cell attachment to the different materials, hDPSCs were directly seeded onto the material surfaces and analysed by immunocytofluorescence and scanning electron microscopy, respectively. The chemical composition of the materials was determined by energy-dispersive X-ray (EDX), and eluates were analysed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Statistical analysis was performed with the analysis

of variance and Bonferroni or Tukey post-test ($\alpha < 0.05$).

Results Undiluted MTA-Ang, MTA-HP and NeoMTA-P displayed a significant increase in cell viability greater than that obtained using complete medium alone (control) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Moreover, a cell migration assay revealed cell migration rates after incubation with extracts of MTA-Ang, MTA-HP and NeoMTA-P that were similar to levels obtained in the control group. In addition, stretched cytoskeletal F-actin fibres were detected in the cells treated with the three material extracts. SEM studies revealed a high degree of cell proliferation and attachment on all three materials. EDX analysis demonstrated similar weight percentages of C, O and Ca in all three materials, whilst other elements such as Al, Si and S were also found.

Conclusions MTA-Ang, MTA-HP and NeoMTA-P were associated with biological effects on hDPSCs in terms of cell proliferation, morphology, migration and attachment.

Keywords: bioactivity, cytotoxicity, mineral trioxide aggregate, stem cells.

Received 15 April 2017; accepted 5 September 2017

Correspondence: Francisco Javier Rodríguez Lozano, School of Dentistry, Hospital Morales Meseguer 2pl, University of Murcia, Av. Marqués de los Vélez s/n, C.P.: 30008, Murcia, Spain (Tel.: +0034 868889518; e-mail: fcojavier@um.es).

*These authors equally contributed to this work.

Introduction

Previous reports have described the physico-mechanical (Camilleri 2008a, Cutajar *et al.* 2011), chemical

Basic Research—Technology

Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells



Christopher J. Tomás-Catalá, DDS, MSc,^{*†*} Mar Collado-González, BSc, MBB, MSc,^{*†*} David García-Bernal, BSc, PhD,^{*} Ricardo E. Oñate-Sánchez, MD, DDS, PhD,[‡] Leopoldo Forner, MD, DDS, PhD,[‡] Carmen Llana, MD, DDS, PhD,[‡] Adrián Lozano, MD, DDS, PhD,[‡] José M. Moraleda, MD, DDS, PhD,^{*} and Francisco J. Rodríguez-Lozano, DDS, PhD^{*†*}

Abstract

Introduction: The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of MTA Repair HP, NeoMTA Plus, and Biodentine, new bioactive materials used for dental pulp capping, on human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods:** Biological testing was carried out *in vitro* on hDPSCs. Cell viability and cell migration assays were performed using eluates of each capping material. To evaluate cell morphology and cell attachment to the different materials, hDPSCs were directly seeded onto the material surfaces and analyzed by scanning electron microscopy. The chemical composition of the pulp-capping materials was determined by energy-dispersive X-ray and eluates were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Statistical differences were assessed by analysis of variance and Tukey test ($P < .05$). **Results:** Cell viability was moderate after 24 and 48 hours in the presence of MTA Repair HP and NeoMTA Plus, whereas at 48 and 72 hours, Biodentine showed higher rates of cell viability than MTA Repair HP and NeoMTA Plus ($P < .001$). A cell migration assay revealed adequate cell migration rates for MTA Repair HP and NeoMTA Plus, both similar to the control group rates, meanwhile the highest cell migration rate was observed in the presence of Biodentine ($P < .001$). Scanning electron microscope studies showed a high degree of cell proliferation and adhesion on Biodentine disks but moderate rates on MTA Repair HP and NeoMTA Plus disks. Energy-dispersive X-ray pointed to similar weight percentages of C, O, and Ca in all 3 materials, whereas other elements such as Al, Si, and S were also found. **Conclusions:** The new pulp-capping materials MTA Repair HP, NeoMTA Plus, and Biodentine showed a suitable degree of cyto-compatibility with hDPSCs, and good

cell migration rates, although Biodentine showed higher rates of proliferation time-dependent. (J Endod 2018;44:126–132)

Key Words

Adhesion, bioceramic materials, bioactivity, cytotoxicity, dental pulp capping, human dental pulp stem cells, mineral trioxide aggregate

Vital pulp therapy includes procedures such as direct pulp capping, in direct pulp capping, and partial or full pulpotomy (1). Direct pulp capping is a method designed to preserve exposed dental pulp with a protective agent, inducing hard tissue repair. Indirect pulp capping refers to the application of a material, on a thin layer of dentin where no vital pulp exposure occurs. Pulpotomy differs from pulp-capping only in that a portion of the remaining pulp is removed before the capping material is applied (2). The materials used in the vital pulp method should possess adequate biocompatibility and bioactivity to promote dental pulp stem cells activity and pulp healing in permanent teeth (3).

Recently, the clinical efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) has been demonstrated in vital molar therapy in adult patients (4). MTA improves on the effectiveness of other biomaterials used in vital pulp therapy such as calcium hydroxide (CH), calcium-enriched mixture cement, glass ionomers, adhesive resins or enamel matrix derivative (1). Because of the good biological properties of MTA, new versions of calcium-silicate-based materials such as Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France) have also been developed as pulp-capping material (5). MTA/calcium silicates have similar action mechanisms to CH, although MTA/calcium silicates induce odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells and produce more uniform and thicker dentin bridge formations with less inflammatory response and less necrosis of pulp tissue than CH (6, 7).

Human dental pulp stem cells (hDPSCs) are mesenchymal stem cells isolated from adult teeth that have the ability to differentiate into osteoblastic, adipogenic, chondrogenic, and odontoblastic-like cells (8, 9). These cells possess immunosuppressive and

Significance

These results may suggest that the pulp-capping materials MTA Repair HP, NeoMTA Plus, and Biodentine showed a suitable degree of biocompatibility with hDPSCs.

From the ^{*}Cellular Therapy and Hematopoietic Transplant Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB-Arrixaca, University of Murcia, Murcia, Spain; [†]School of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain; and [‡]Department of Stomatology, Universitat de València, Valencia, Spain.

^{*}These authors equally contributed to this work.

Address requests for reprints to Dr Francisco Javier Rodríguez-Lozano, School of Dentistry, Hospital Morales Meseguer 2pl, University of Murcia, Murcia, Av. Marqués de los Vélez s/n 30008, Spain. E-mail address: fcojavier@um.es
0099-2399/18 - see front matter

Copyright © 2017 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.017>

11. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN PUBLICADO EN DENTAL MATERIALS

Dent Mater. 2019 Jan;35(1):114-124. doi: 10.1016/j.dental.2018.11.003.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema



GuttaFlow Bioseal promotes spontaneous differentiation of human periodontal ligament stem cells into cementoblast-like cells

F.J. Rodríguez-Lozano^{a,b,*,1}, M. Collado-González^{a,b,1}, C.J. Tomás-Catalá^{a,b},
D. García-Bernal^a, S. López^c, R.E. Oñate-Sánchez^b, J.M. Moraleda^a,
L. Murcia^c

^a Cellular Therapy and Hematopoietic Transplant Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB-Arrixaca, University of Murcia, Murcia, Spain

^b School of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain

^c Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biology, University of Murcia, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2018

Received in revised form

27 October 2018

Accepted 2 November 2018

Available online xxx

Keywords:

Bioceramics

Cementogenic differentiation

CEMP1

Endodontic sealers

Human periodontal ligament stem

cells

ABSTRACT

Objectives. To evaluate *in vitro* the cementogenic potential and the biological effects of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex and AH Plus on human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs).

Methods. Cell viability, cell migration and cell morphology assays were performed using eluates of each material. To evaluate cell attachment, hPDLSCs were directly seeded onto the material surfaces and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The effects of endodontic sealers on cementum protein 1 (CEMP1), cementum-derived attachment protein (CAP), bone sialoprotein (BSP), ameloblastin (AMBN), amelogenin (AMELX) and alkaline phosphatase (ALP) gene expression on hPDLSCs were investigated by qPCR and immunofluorescence (IF). Statistical analysis was performed with analysis of variance and Bonferroni or Tukey post-test ($\alpha < 0.05$).

Results. More than 90% of viable cells were obtained using extracts of GuttaFlow Bioseal and GuttaFlow2 after 72 h of culture. By contrast, AH Plus and MTA Fillapex induced significantly lower levels of cell viability. GuttaFlow2 and GuttaFlow Bioseal promoted wound closure in a concentration-dependent manner, comparable to that observed with control extracts ($*p < 0.05$). However, with AH Plus and MTA Fillapex, cell migration was significantly lower than in the control ($***p < 0.0001$). SEM analysis pointed to an organized stress fiber assembly and high degree of cell adhesion on GuttaFlow Bioseal disks but low rates on GuttaFlow2, MTA Fillapex and AH Plus. When hPDLSCs were cultured with GuttaFlow Bioseal-conditioned media, qPCR assays and IF showed a higher level of AMELX, AMBN, CEMP1 and CAP expression than the control ($*p < 0.05$), whereas no such expression was observed in the other sealers.

* Corresponding author at: School of Dentistry, University of Murcia, Hospital Morales Meseguer 2 pl., Av. Marqués de los Vélez, s/n, 30008 Murcia, Spain.

E-mail address: fcojavier@um.es (F.J. Rodríguez-Lozano).

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.003>

0109-5641/© 2018 The Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Physicochemical, cytotoxicity and *in vivo* biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material

Received: 10 July 2018
Accepted: 13 February 2019
Published online: 08 March 2019

Cláudio M. A. Ferreira¹, Luciana M. Sassone¹, Alexia S. Gonçalves², Jorge José de Carvalho², Christopher J. Tomás-Catalá^{3,4}, David García-Bernal^{3,4}, Ricardo E. Oñate-Sánchez⁴, Francisco J. Rodríguez-Lozano^{3,4} & Emmanuel João Nogueira Leal Silva¹

The purpose of this work was to evaluate the physicochemical properties, the cytotoxicity and *in vivo* biocompatibility of MTA Repair HP (MTA HP) and White MTA (WMTA). The setting time, flow, radiopacity and water solubility were assessed. To the cytotoxicity assay, primary human osteoblast cells were exposed to several dilutions of both materials eluates. MTT assay, apoptosis assay and cell adhesion assay were performed. The *in vivo* biocompatibility was evaluated through histological analysis using different staining techniques. No differences were observed between MTA HP and WMTA for setting time, radiopacity, solubility and water absorption ($P > 0.05$). However, MTA HP showed a significantly higher flow when compared to WMTA ($P < 0.05$). Cell viability results revealed that the extracts of WMTA and MTA HP promoted the viability of osteoblasts. After incubation of cells with the endodontic cement extracts, the percentage of apoptotic or necrotic cells was very low ($< 3\%$). Furthermore, SEM results showed a high degree of cell proliferation and adhesion on both groups. MTA HP showed similar *in vivo* biocompatibility to the WMTA and the control group in all time-points. The MTA HP presented adequate physicochemical and biological properties with improved flow ability when compared to WMTA. Such improved flow ability may be a result of the addition of a plasticizing agent and should be related to an improvement in the handling of MTA HP.

The materials used for perforation repair and root-end filling should be biocompatible and bioactive because they are in close contact with surrounding tissues¹. The presence of stem cells in periapical tissues and their interaction with endodontic materials have been considered important in order to favor healing². Thus, the biocompatibility, excellent sealing ability, hard tissue induction and conduction, and high rate of success have made bioactive endodontic cements a good choice for root-end filling^{3,4}.

Mineral trioxide aggregate (MTA) is considerable the gold standard material for several clinical procedures, as confirmed by a robust body of evidence supporting the physicochemical and biological properties of this material^{3,4}. However, the traditional MTA formulation presents some drawbacks such as handling difficulties, granular consistency and long setting-time⁵. Furthermore, the use of bismuth oxide as a radiopacifying agent may promote discoloration of the tooth and marginal gingiva^{5,6} and affect the physicochemical properties of this material^{5,7}.

In the search for the improvement of the MTA, a new formulation of the White MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) called MTA Repair HP (MTA "High Plasticity", Angelus) was launched in the form of a bioceramic material with high plasticity aiming to maintain the biological properties of the MTA, improving its chemical and physical properties. The main differences to its predecessor are the addition of an organic plasticizer to the distilled water (promoting greater plasticity to the material) and the exchange of bismuth oxide by calcium tungstate as a radiopacifying agent. Studies demonstrated that the use of plasticizers may lead to improvements in the

¹Endodontic Department, School of Dentistry, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil. ²Department of Histology and Embryology, Laboratory of Ultrastructure and Tissue Biology, Biomedical Center, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil. ³Cell Therapy Unit at Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Biomedical Research Institute of Murcia, University of Murcia, Murcia, Spain. ⁴Department of Special Care in Dentistry and Gerodontology, University of Murcia, Murcia, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.R.-L. (email: fcojavier@um.es)