



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CITOTOXICIDAD DE
CUATRO SELLADORES ENDODÓNTICOS MEDIANTE LA
ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y
SULFORRODAMINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

SANDRA MONSERRAT CÁZAREZ GALINDO

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESORAS: M.C. MARÍA TERESA RAMÍREZ APAN
Esp. ALEJANDRA RODRÍGUEZ HIDALGO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La tesis titulada “Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de cuatro selladores endodónticos mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa y sulforrodamina” que presenta la alumna Sandra Monserrat Cázarez Galindo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Eileen Uribe Querol y la asesoría de la M. en C. María Teresa Ramírez Apan y la Esp. Alejandra Rodríguez Hidalgo.

Parte del financiamiento para la realización de esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto IA202013, cuya responsable es la Dra. Eileen Uribe Querol del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA).

Dedicatoria

A mi madre, este y todos mis logros,
son por ti y para ti.

Verdaderamente no existen las palabras exactas para expresar de forma completa todo el agradecimiento que tengo a todas las personas y a mi Universidad que hicieron posible este logro, intentare en medida de lo posible expresar mi inefable gratitud:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la más grande institución a la que pude haber pertenecido, que me abrió sus puertas desde principios de mi juventud y me vio crecer en sus instalaciones de preparatoria y universidad. Hoy y siempre portaré su nombre con orgullo.

A la Facultad de Odontología que me albergó e instruyó para esta hermosa carrera y noble profesión.

A los honorables profesores Dr. Higinio Arzate, Dra. Brenda Barrón y Dra. Santa Ponce que prestaron su tiempo y atención para revisar y sugerir las correcciones para esta tesis.

En comparación con toda la ayuda recibida, estas líneas son realmente modestas, pero intentan, como en un acto de justicia, reconocer a la Dra. Eileen Uribe, a quien debo todo mi respeto y cariño. Agradezco toda la paciencia tuvo conmigo, constantemente me siguió alentando, siempre estuvo dispuesta a escucharme y ayudarme en todas mis dudas a lo largo de la creación de este gran proyecto.

A la M. en C. Teresa Ramírez y la Esp. Alejandra Rodríguez cuyos grandes conocimientos fueron parte esencial para la creación de esta tesis. Excelentísimas personas que pacientemente me brindaron su asesoría. Agradezco su importante colaboración y brillantes comentarios que contribuyeron para realizar la mejor versión de este trabajo.

A los grandes profesores que tuve a lo largo de mi carrera, quienes influyeron en mí, que me inspiraron y contagiaron desde el primer año de la carrera el amor a la odontología.

A mi madre, a quien ya he dedicado esta tesis, mi gran ejemplo a seguir, que me brindó importantes lecciones de vida y a lo largo de la carrera nunca dejo de confiar en mí, ni dejó que yo perdiera la fe en mí misma.

A mi hermano Luis Daniel, por ser mi mejor amigo, quien sin dudar estuvo dispuesto a participar en todas mis, como él llamaba, "prácticas de tortura medieval" sin miedo. Siempre me ha acompañado y guiado en esta y todas las etapas de mi vida y formó parte de las interminables noches de estudio y tareas.

A la Esp. Daniela Carmona, excelentísima maestra y amiga, sin su gran consejo probablemente este trabajo no hubiera sido realizado, pues fue la persona que inicialmente me alentó a realizar una tesis y a lo largo de todo el camino, sin dudarlo me brindó su ayuda y amplios conocimientos.

A mi mejor amiga Ana, por todos años de amistad, siempre se prestó para ayudarme a aprender y confió en mis habilidades desde el 1er año.

A Keyla, Frankie, Conny y Tom, mis grandes compañeros de vida, cuyos pedacitos alma llevo siempre en mi corazón.

A Armando, cuya aparición llevo a complementar y mejorar mi vida.

A todos los pacientes que confiaron en mí y ayudaron a mi formación profesional.

INDICE

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
3. Materiales de obturación	10
3.1. Gutapercha	10
3.2. Cementos Selladores endodónticos.....	11
3.2.1. Propiedades de los cementos selladores.....	11
3.3. Tipos de cementos selladores endodónticos.....	13
3.3.1. Cementos selladores a base óxido de zinc y eugenol.....	13
3.3.2. Cementos selladores a base hidróxido de calcio.....	21
3.3.3. Cementos selladores a base ionómero de vidrio.....	25
3.3.4. Cementos selladores a base resina.....	27
3.3.5. Cementos selladores a base silicón.....	30
3.3.6. Cementos selladores a base de biocerámica.....	34
3.3.6.1. Cementos selladores a base Agregado Trióxido Mineral (MTA).....	38
4. Actividad metabólica.....	41
4.1. Óxido nítrico.....	41
4.2. Óxido nítrico sintasa.....	42
5. Pruebas de biocompatibilidad.....	45
5.1. Pruebas <i>in vitro</i>	45
5.2. Prueba de Griess	46
5.3. Reacción de MTT	48
5.4. Sulforrodamina B	50
6. Cultivos celulares.....	52
6.1. Cultivo celular primario.....	52
6.1.1. Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH).....	54
6.2. Líneas celulares.....	54
6.2.1. Fibroblastos L929.....	54
6.2.2. RAW	55
7. Antecedentes.....	56
8. Planteamiento del problema	57
9. Justificación del estudio	58
10. Hipótesis	58
10.1. Hipótesis alterna	58
11. Objetivos	59
11.1. Objetivo general	59

11.2.	Objetivos particulares.....	59
12.	Material y métodos.....	60
12.1.	Líneas celulares.....	60
12.2.	Cultivo celular	61
12.2.1.	Fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos de la línea celular L929.....	61
12.2.2.	Macrófagos RAW.....	61
12.3.	Obtención de medios condicionados de cementos selladores endodónticos.....	62
12.4.	Determinación de nitritos en sobrenadantes de macrófagos	62
12.5.	Actividad metabólica en macrófagos para el ensayo de MTT.....	64
12.6.	Procedimiento del Método de Sulforrodamina B.....	65
13.	Recolección de datos	67
14.	Estadística	67
15.	Resultados	68
16.	Discusión.....	84
17.	Conclusiones	90
18.	Perspectivas.....	90
19.	Bibliografía.....	91

1. RESUMEN

Uno de los pasos en un tratamiento de conductos es la obturación de los conductos radiculares. Durante dicha obturación, se utilizan selladores endodónticos que idealmente, deben ser biocompatibles. Las pruebas para conocer la biocompatibilidad de un material involucran conocer, entre otras cosas, su citotoxicidad. Sabemos que selladores como AH PlusTM, *RSA RoekoSealAutomix*®, SealapexTM MTA-FILLAPEX® poseen una actividad citotóxica diferente. En este trabajo, evaluamos tanto la actividad citotóxica de los selladores, mediante el método de sulforrodamina, como la actividad mitocondrial, utilizando el método de MTT. Además, medimos de manera indirecta, la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, con el método de detección de nitritos por la reacción de Griess. Los resultados mostraron que el cemento sellador menos citotóxico es el cemento sellador de *RSA RoekoSealAutomix*®, seguido por el MTA-FILLAPEX® y en caso de los cementos selladores AH-PlusTM y SealapexTM únicamente presentaron buena biocompatibilidad en un inicio y después fueron citotóxicos.

2. INTRODUCCIÓN

Los dientes se mantienen vivos por una serie de vasos sanguíneos y nervios que se encuentran en su interior, conocidos como la pulpa dental. A veces, la pulpa es afectada ya sea por infecciones cariosas o por otras razones, como traumatismos que pueden causarle un daño irreparable. Cuando esto sucede, se necesita hacer un procedimiento llamado tratamiento de conductos. El fin de un tratamiento de conductos es preservar la integridad y devolver la función al diente afectado. El tratamiento comprende, primeramente, eliminar la mayor parte las bacterias presentes dentro del conducto y en el periápice, y posteriormente, limpiar el conducto de cualquier material orgánico remanente. Además, moldear la anatomía intraradicular propicia para que finalmente, el conducto se obture de manera tridimensional para lograr un sellado hermético. (1)

Para obturar un conducto se utilizan dos materiales, la gutapercha y un cemento sellador endodóntico. A veces, al momento de sellar el conducto, el material de obturación se extruye hacia los tejidos periapicales, ya sea de forma intencional o porque el procedimiento se realizó incorrectamente. El material extruido puede causar inflamación y toxicidad a los tejidos periapicales. Un material odontológico debe tener ciertas características y propiedades ideales. Así, un material de esta naturaleza no debe causar ningún efecto secundario perjudicial, por lo que los materiales pasan por una serie de pruebas antes de ser ofrecidos comercialmente.(1) Sin embargo, hasta el momento, no se ha logrado fabricar un material con características y propiedades ideales.

La mayoría de los materiales de obturación que se utilizan son biocompatibles.(1) Sin embargo, constantemente surgen nuevos materiales a los que se deben realizar estudios de biocompatibilidad. La citotoxicidad de los cementos selladores endodónticos, por ejemplo, es muy variable, puede ir desde muy baja hasta alta, cuando se exponen a los tejidos celulares periradiculares. (2, 3)

3. MATERIALES DE OBTURACIÓN

3.1. Gutapercha

La gutapercha es un material de relleno proveniente de árboles del género *Palaquium* (encontrados principalmente de países del continente asiático, como Malasia), que producen goma similar al látex, pero con mayor contenido de resina.

Los conductos radiculares poseen distinta anatomía interna, como deltas apicales y conductos accesorios. En la endodoncia se busca el uso de materiales que se acoplen de forma tridimensional al conducto preformado y a sus formas anatómicas. La gutapercha ha sido utilizada por los endodoncistas desde el principio de la odontología moderna, dada su versatilidad. (4)

La composición química de la gutapercha cambia ligeramente dependiendo de la casa comercial o el laboratorio, pero mantiene una composición básica, siendo ésta: gutapercha del 18.9% al 21.8%; óxido de zinc, del 59.1% al 75.3%; metales de sulfato, del 1.5% al 17.3%; cera o resina del 1.0% al 4.1% y colorantes.(5) Además, respecto a sus propiedades físicas, la gutapercha tiene alta flexibilidad, alta capacidad de compresión, considerable elongación, buena radio opacidad y fácil manipulación ante cambios de temperatura. (5, 6) **(Figura 1)**



Figura 1. Fotografía de la presentación de puntas de gutapercha de marca comercial *SybronEndo*TM. (7)

3.2 Cementos Selladores Endodónticos

La gutapercha por sí misma, no logra una obturación hermética de los conductos radiculares. Para ello, se usan los cementos selladores endodónticos que precisamente crean una capa de sellado, es decir, una interface entre la gutapercha y el conducto radicular. (8) Los cementos selladores también se encargan de cerrar posibles conductos accesorios y poseen diversas propiedades, como radio opacidad, fluidez, tiempo de fraguado y solubilidad. Además proporcionan estabilidad dimensional, un nivel adecuado de reabsorción,(8) adhesión a las paredes dentinarias y al material de obturación (9) y ayudan en la desinfección. Idealmente, los selladores, deben ser biocompatibles pues constantemente están en contacto directo con los tejidos periapicales. (3, 10) **(Figura 2)**

3.2.1 Propiedades de los cementos selladores

En el año 1958 el investigador Grossman L. con el objetivo de homogeneizar las propiedades de un cemento sellador, elaboró la siguiente serie de requerimientos idóneos para un cemento sellador de conductos radiculares. Algunos siguen siendo vigentes y se enlistan a continuación: (6, 11)

1. Debe ser pegajoso, cuando se mezcla para proporcionar buena adhesión entre la gutapercha y la pared del conducto, formando un sellado hermético que no permita la filtración.
2. Debe proporcionar un sellado completamente hermético en los conductos que se quieran obturar.
3. Debe ser radiopaco.
4. En el momento de fraguar no debe presentar cambios en su volumen final.
5. Lo más conveniente es que no pigmente los tejidos dentarios.
6. Debe ser bacteriostático o al menos no favorecer la reproducción de bacterias.
7. Debe ser insoluble una vez colocado en contacto con fluidos.

8. Debe ser biocompatible, por lo tanto, al ser colocado debe ser bien tolerado por tejidos periapicales.
9. En caso de que se necesite eliminar debe ser soluble en un solvente común.
10. No debe provocar una reacción inmunológica excesiva en tejidos periapicales.
11. No debe ser mutagénico, ni carcinogénico.
12. Después de colocado el cemento debe ser capaz de fluir y llenar conductos accesorios y forámenes múltiples con cualquier técnica de obturación empleada. (8) **(Figura 2)**

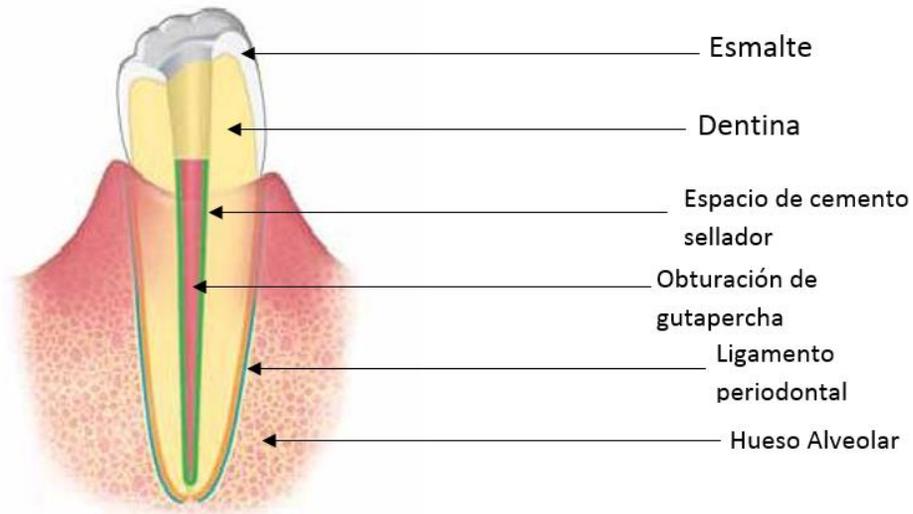


Figura 2. Esquema de un diente después de un tratamiento de conductos, señalizando gutapercha y cemento sellador. (12)

3.3 Tipos de cementos selladores endodónticos

3.3.1 Cementos selladores a base de óxido de zinc y eugenol

Los cementos selladores a base de óxido de zinc y eugenol fueron frecuentemente utilizados desde el siglo pasado hasta la fecha.(6) Su historia comienza a partir de que el investigador Rickert en 1927 presenta la primera formulación de un cemento sellador a base de óxido de zinc y eugenol. Años después, Grossman (1958) presenta por primera vez, un cemento sellador con una formulación parecida y sin los inconvenientes del sellador de Rickert.

Su fraguado ocurre cuando el eugenol y el óxido de zinc reaccionan y se obtiene por cristalización eugenolato de zinc.(8) La reacción química se realiza a un pH aproximado de 7. (13)

El eugenol, es un fármaco bencénico que tiene un efecto antimicrobiano sobre bacterias y hongos, a lo que se le agrega un efecto irritante y citotóxico en contacto con los tejidos peri-radicales. (8)

Algunos pacientes presentan una inflamación crónica en tejidos apicales y periapicales, asociado a lesiones de tejido periapical.(14, 15) A pesar de que el óxido de zinc y eugenol tiene propiedades físico químicas satisfactorias, es tóxico para sistemas biológicos (14) por la unión de ambos componentes.

La composición de los cementos selladores de óxido de zinc y eugenol varía mucho entre casa comercial y la forma original en que están basados. (6, 15) Al óxido de zinc y eugenol también se le pueden agregar elementos que mejoren sus propiedades.(6) Dependiendo de la casa comercial las proporciones de los componentes extra aumentan, disminuyen o son omitidos. Parte de los componentes son, resinas, para aumentar su unión físico-química a las paredes dentinarias; radioopacificadores, para aumentar visibilidad del cemento sellador en la radiografía; antimicrobianos, corticoides y en algunos casos hidroxiapatita o hidróxido de calcio, los últimos tres mencionados con la finalidad de mejorar su

biocompatibilidad, eliminar bacterias con mayor efectividad, disminuir la respuesta inmune y mejorar la recuperación apical.(6, 15-17)

Los cementos selladores de óxido de zinc y eugenol cumplen varias de las reglas estipuladas por Grossman. Parte de su atractivo es su fácil manipulación. Para el empleo de estos cementos selladores en las especificaciones durante su mezcla es necesario operar los componentes con la mayor incorporación posible del óxido de zinc, pues así se evita en lo posible, dejar la menor cantidad de eugenol libre en el producto final, que será colocado en contacto con los tejidos.(6, 15)

A lo largo de la historia, diferentes autores e investigadores desarrollaron diferentes fórmulas, entre las que destacan son las siguientes: (6, 15, 17-19)

Cemento de Grossman:

Fabricantes: Proco-Sol™ de *Star Dental*, U/P-Grossman de *Sultan®*, Endo-G-Fill de *Densell®*, Roth 801 de *Roth Int*, Endo R2 de *Klepp®*, Full-Canal de *Farmadental-Arg®*. **(Figura 3)**

Componentes principales: Óxido de zinc y eugenol.

Presentación: Polvo (Óxido de zinc, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bario, borato de sodio) y líquido (Eugenol).

Características: Es uno de los primeros cementos selladores utilizados, a partir de este se han comparado las características de otros cementos sellador. El tiempo de trabajo y endurecimiento que ofrece es largo (en estudios realizados *In vitro* comenzó a endurecer a las 24 horas y terminó a las 40 horas) (6, 20) La radiopacidad que presenta tiende a ser escasa o mediana, de igual modo su adhesión a la dentina es medianamente aceptable. La mezcla de eugenolato de zinc al estar en contacto con tejidos tiende a disolverse.(19) Tiene propiedades antibacterianas amplias, por ejemplo, destruye bacterias anaerobias como *Enterococcus faecalis*. (15) Su tiempo de fraguado oscila entre 30 min y 2 horas, dependiendo del grado de humedad en los túbulos que tiende a acelerar su fraguado. (19)

Algunos de sus componentes en formulas iniciales se quitaron, como los residuos de plata, aun así, el sellador tiende a teñir los tejidos de forma mínima. De acuerdo con los fabricantes, se especifica que en la manipulación del producto exista un espátulado amplio y lento con el fin de aumentar la cantidad de polvo a la mezcla y evitar eugenol en mayores cantidades a las adecuadas. (6) Además, posee una gran capacidad de penetración en túbulos dentinarios. (17)



Figura 3. Fotografía de la presentación del cemento de Grossman de la marca comercial *Farmadental®*. (21)

Cemento de Rickert: (6, 17)

Fabricantes: Kerr Pulp Canal Sealer™ y Pulp Canal Sealer™ EWT de *Sybron Kerr*.

(Figura 4)

Componentes principales: Óxido de zinc, plata precipitada, yoduro de timol, resina blanca, aceite de clavo y bálsamo de Canadá.

Presentación: Polvo (Óxido de zinc, plata precipitada, yoduro de timol, resina blanca) Líquido (Eugenol y bálsamo de Canadá).

Características: Es el primer cemento sellador utilizando eugenol y óxido de zinc, desarrollado por Rickert. En sus componentes principales se el alto contenido en plata, por lo que, a largo plazo, genera tinciones en los tejidos. Posee excelente radiopacidad por sus componentes y escasa adhesión a dentina.(6) Además, tiene buenas propiedades de estabilidad dimensional, fluidez por presencia de plata precipitada. El hecho de que sea aceite de clavo y no eugenol puro hace que su mezcla sea ligeramente menos agresiva con los tejidos que pueda estar en contacto. (17)

Posee un tiempo de trabajo corto, por lo que la casa comercial *Sybron Endo™* creó una versión con mayor tiempo de trabajo versión *EWT*. (15, 18) El aumento de temperatura y humedad en el ambiente, tanto en el conducto como durante la manipulación, disminuyen el tiempo de trabajo. (15)

El componente de yoduro de timol funciona como un antiséptico potente y de larga duración. (15)



Figura 4. Fotografía de la presentación del cemento Pulp Canal Sealer™ EWT de *Sybron Kerr™*. (22)

Cemento de N-Rickert (17)

Fabricantes: *Fórmula & Ação, Sao Paulo (Brasil)*. **(Figura 5)**

Componentes principales: Óxido de zinc, plata precipitada, colofonia, di yodo timol, delta-hidroclortisona, aceite de clavo y bálsamo de Canadá.

Presentación: Polvo y líquido.

Características: Modificación del cemento sellador de Rickert. Se le agregó un 2% de delta-hidroclortisona para ayudar en proceso de cicatrización.



Figura 5. Fotografía de la presentación del cemento N-Rickert de casa comercial *Fórmula & Ação*. (23)

Cemento de Wach

Fabricantes: *Sultan Chemist®*. **(Figura 6)**

Componentes principales: Óxido de zinc, trióxido de bismuto, oleorresinas, yoduro de bismuto, óxido de magnesio eugenol y bálsamo de Canadá. (6)

Presentación: Polvo y líquido.

Características: Posee una radiopacidad mediana. El bálsamo de Canadá proporciona mayor adhesividad y facilita la manipulación de la gutapercha, pues, permite la formación de una masa homogénea.(24)



Figura 6. Fotografía de la presentación del cemento de Cemento de Wach marca comercial *Sultan Chemist®*. (25)

Tubli Seal (6)

Fabricantes: Tubli-Seal y Tubli Seal EWT de *Sybron Kerr™*. **(Figura 7)**

Componentes principales: Óxido de zinc, trióxido de bismuto, oleorresinas, yoduro de timol, aceites y modificadores.

Presentación: Pasta - Pasta (Base y catalizador)

Características: Libre de eugenol, su tiempo de trabajo es menor que el del cemento sellador de Rickert, el tiempo de endurecimiento es entre 20 min y 1 hora. (6, 18)

Radiopacidad mediana, fluidez elevada, adhesión aceptable, el hecho de que sea pasta-pasta permite una mejor dosificación. Además, crea una mezcla más homogénea. (18)

Versión Tubli Seal EWT™ con tiempo de trabajo más prolongado para mejor manipulación. (18)

Como Lopreite dijo en 2016: “La presencia de oleorresinas en su composición lo torna irritante para los tejidos periapicales”. (15)



Figura 7. Fotografía de la presentación del cemento Tubli-Seal de marca comercial *SybronEndo*. (26)

Endomethasone

Fabricantes: Endomethasone™ de *Septodont*. (6) **(Figura 8)**

Componentes principales: Óxido de zinc, óxido rojo de plomo, yoduro de timol, dexametasona, hidrocortisona, sulfato de bario, magnesio, trioximetileno y eugenol.

Presentación: Polvo (Óxido de zinc, paraformaldehído, óxido rojo de plomo o minio, yoduro de timol, dexametasona, hidrocortisona, sulfato de bario, magnesio) y líquido (Eugenol).

Características: Polvo de grano muy fino (15) El elemento de trioximetileno es un bactericida potente que disminuye su acción hasta desaparecer con el paso del tiempo. (15)

Poca adherencia a la dentina, radiopacidad mediana. Tiempo de trabajo largo (hasta 3 horas). (6, 15)

Criticado por los componentes altamente tóxicos (Paraformaldehído) y la intervención de la cicatrización con antiinflamatorios (Corticoides) (6, 17) crea grandes áreas con necrosis en caso de que sea extruido por error a la zona periradicular. (17)



Figura 8. Fotografía de la presentación del cemento Endomethasone™ de marca comercial Septodont. (27)

3.3.2 Cementos Selladores a base de Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio es un compuesto que se usa como medicamento y se ha agregado a los cementos selladores endodónticos por sus múltiples cualidades. Durante décadas fue utilizado con distintos fines, entre ellos, reparar perforaciones radiculares, detener resorciones radiculares internas y externas, controlar el exudado purulento en dientes con problemas bacterianos y estimular tanto la apicoformación como el recubrimiento pulpar directo e indirecto.(28) El hidróxido de calcio es utilizado como medicamento dadas sus numerosas propiedades y por ello, se usa como componente de cementos selladores para la obturación de conductos radiculares. (8).

Las características del hidróxido de calcio como sellador en particular son, un tiempo de trabajo y endurecimiento muy prolongado (aproximadamente 45 min), (29) que se endurece en el conducto con presencia de humedad. Posee plasticidad y corrimiento adecuados y escasa radiopacidad su alta solubilidad permite liberar el hidróxido de calcio en el medio en que se encuentra (28) y por el mismo principio se duda de su capacidad para una obturación óptima a largo plazo. (15)

Dentro de las primeras formulaciones de cementos selladores a base de hidróxido de calcio destaca el *Calcibiotec Root Canal Sealer-CRCS™*, de la marca Hygienic cuya composición fue base para el resto de cementos selladores que después fueron modificándose, dentro de sus características destacaban el tiempo de fraguado que podía ser de hasta 3 días, este cemento sellador fue desarrollado en el año de 1982 y ya no es utilizado.

Sealapex™

Fabricantes: Sealapex™ de Sybron Kerr. **(Figura 9)**

Componentes principales: Hidróxido de calcio, sulfato de bario, óxido de zinc, dióxido de titanio, estearato de zinc, mezcla de etil-tolueno-sulfonamida, metileno-metil-salicilato, isobutil-salicilato y pigmento.

Presentación: Pasta - Pasta una base y un catalizador.

Características: Tiempo de trabajo limitado, que puede ser más corto con el aumento de temperatura y humedad. (6) Radiopacidad escasa, (6, 17) fluidez adecuada, es bien tolerado por los tejidos.(6)

Tiene alta solubilidad y por lo tanto poca estabilidad, esta estabilidad es la que permite que los iones de calcio sean liberados en el medio. Por ser un cemento sellador que libera iones Ca^{++} , es un cemento sellador con un pH alcalino. (15, 18)

Este cemento sellador tiene buen corrimiento además de una densidad uniforme después de ser manipulado.(15) Es bien tolerado por los tejidos, dentro de sus propiedades, se ha demostrado que favorece el sellado del orificio apical por aposición de tejido calcificado. (6, 16)

Para que haya un fraguado óptimo se necesita humedad en el ambiente del conducto, tardando hasta 3 semanas en fraguar. (19)



Figura 9. Fotografía de la presentación del cemento Sealapex™ de marca comercial *SybronEndo* (30)

Apexit® Plus

Fabricantes: *Ivoclar Vivadent*. **(Figura 10)**

Componentes principales Apexit®: Base (Hidróxido de calcio, óxido de zinc, óxido de calcio, dióxido de calcio, estearato de zinc, colofonia hidrogenada, fosfato tricálcico, polidimetilsiloxano) y activador (Trimetil hexanedioldisalicilato, carbonato de bismuto básico, óxido de bismuto, dióxido de silicio, 1.3 butanedioldisalicilato, colofonia hidrogenada, fosfato tricálcico, estearato de zinc). (19)

Componentes principales Apexit® Plus: Hidróxido de calcio, estearato de zinc, fosfato tricálcico, colofonia hidrogenada, carbonato de bismuto, polimetilsiloxano, óxido de zinc, salicilato de butanodiol.

Presentación: Pasta – Pasta (Jeringa auto mezclable).

Características: Tiempo de trabajo adecuado, altamente irritante, (18) también es un material con características físicas al Sealapex y con buena adhesión a la dentina. (6)

Presenta buena capacidad de corrimiento en el conducto. Se desarrolla Apexit® Plus después de que la presentación de Apexit® (Pasta - Pasta) resultara ser altamente citotóxica con los tejidos periapicales. (15)



Figura 10. Fotografía de la presentación del cemento Apexit® Plus de marca comercial *Ivoclar Vivadent*. (31)

3.3.3 Cementos selladores a base de Ionómero de Vidrio

Los cementos selladores de ionómero de vidrio fueron introducidos en el año 1972 por los científicos Wilson & Kent. (32).

Las características del cemento sellador a base de ionómero de vidrio son, óptima radiopacidad, contracción mínima, excelente estabilidad dimensional, buen sellado, escasa irritación tisular y óptima adhesión a dentina (por adhesión química). (6, 15) (19, 33) Por su componente principal, (vidrio fluorsilicato) este cemento sellador tiene la capacidad de crear puentes de hidrógeno con el colágeno y los componentes inorgánicos de la estructura dentaria, particularmente con el calcio. (8, 15)

La principal desventaja del cemento sellador a base de ionómero de vidrio es que, dado que no se conoce un material solvente que pueda romper la unión del cemento sellador con el diente, aumenta la dificultad al intentar retirar el cemento sellador del conducto radicular en caso de ser necesario un retratamiento. (6, 8, 33) Como Gunnar dijo en 2011: "Pueden existir filtraciones y formar poros por la sensibilidad a la humedad durante el endurecimiento". (16) El endurecimiento resulta incompleto y en estos casos el material puede liberar componentes citotóxicos. (15)

Ketac™ Cem Aplicap™

Fabricantes: *3M ESPE*. **(Figura 11)**

Componentes principales: Polvo (Calcio aluminio lantano, vidrio fluorsilicato, wolframato de calcio, ácido silícico, pigmentos) Líquido (Polietilenglicol, ácido maleico, ácido tartárico, agua destilada).

Presentación: Polvo - Líquido en cápsulas pre-dosificadas.

Características: Por ser un cemento sellador a base principal de ionómero de vidrio, este proporciona un excelente sellado a la superficie del conducto. (6)

La adhesión a la superficie dentinaria provee de una estabilidad a las paredes del conducto, fortaleciendo las mismas y minimizando el riesgo de fractura. (19)

Por su capacidad de corrimiento, proporciona mayor facilidad en su manipulación en el conducto.(19) Tiene baja capacidad antimicrobiana. (24)



Figura 11. Fotografía de la presentación de cemento Ketac™ Cem Aplicap de marca comercial 3M ESPE. (34)

3.3.4 Cementos selladores a base de Resina

Son definidos como cementos selladores a base de polímeros. Resinas, ya sean polivinílicas y epóxicas, diseñados con la finalidad de adherirse a la estructura dental. (15, 24, 35)

Cada casa comercial elige que tipo de moléculas agregará al cemento sellador, dándole distintas propiedades. En 2002, Carlos Boveda menciona que “Los cementos selladores de resina tienen varias características favorables, como la adhesión a la estructura dentaria, largo tiempo de trabajo, facilidad de manipulación y buen sellado”. (36)

Otras propiedades son su escasa solubilidad, por lo tanto, se les considera un cemento sellador resistente, con mediana radiopacidad y en casos de sobre obturación su reabsorción es muy lenta, (8) tienden a presentar inconvenientes con la pigmentación que después puede presentar el diente obturado, (33) también cabe mencionar que son de difícil remoción en caso de un retratamiento.(6)

Los cementos selladores de resina se caracterizan porque tienen una alta toxicidad inicial que genera una rápida respuesta inmunológica en las primeras horas, que después disminuye.(2, 17) Aunque tengan un bajo índice de fluidez, tienen la capacidad de adaptarse a las paredes del conducto. (24) Las propiedades de sellado y estabilidad dimensional a largo plazo han demostrado ser efectivas en este tipo de cementos selladores por su capacidad de adaptación. (8) A lo largo de la historia, los cementos a base de resina han tenido cambios significativos en su estructuración respecto a nano y macropartículas, saliendo así, cementos selladores nuevos constantemente y dejando cementos selladores como Sealer 26® de la casa *Dentsply* y Diaket™ de la casa *3M ESPE™* como una referencia, para las siguientes generaciones de cementos selladores, estos cementos selladores presentaban características básicas respecto a fluidez y adhesión como buenos cementos selladores, pero citotóxicos en tejidos periapicales al terminar su polimerización por liberación de subproductos como hexaclorofeno. (15, 17, 18)

AH 26®

Fabricantes: *De Trey / Dentsply*. (**Figura 12**)

Componentes principales: Polvo (Óxido de bismuto, hexametilenteramina, polvo de plata y dióxido de titanio. Resina (Éter bisfenol diglicidilo). (6, 15)

Presentación: Polvo – Gel.

Características: Su componente base es una resina epóxica. Su tiempo de trabajo es prolongado, buena radiopacidad, tanto su fluidez como el corrimiento son elevados, citotoxicidad elevada al liberar paraformaldehído. El tiempo final de endurecimiento, oscila entre 24 y 48 horas. (6) (15, 18, 19)

Tiene un efecto antimicrobiano bajo y de duración corta.(15) Este cemento sellador dejó de estar en el comercio en algunos países, dado que su formulación básica, contiene polvo de plata, el cual a largo plazo creaba una pigmentación en el diente. (16) Su estabilidad dimensional es aceptable por su poco encogimiento al final de su polimerización. (15)



Figura 12. Fotografía de la presentación del cemento Ah 26® de marca comercial *Dentsply*. (37)

AH-Plus™ o Topseal

Fabricantes: *Dentsply / Maillefer / De Trey*. **(Figura 13)**

Componentes principales: Pasta A (Resina epóxica, tungstenato de calcio oxanonadamina-1,9, óxido de hierro) Pasta B (Amina adamantina, N-dibencil-5-TCD-diamina, óxido de circonio, tungstenato de calcio, óxido de circonio, aerosil, aceite de silicona). (18)

Presentación: Pasta – Pasta.

Características: Es un cemento sellador con biocompatibilidad aceptable, pues a diferencia del AH 26[®], este no ha demostrado formar paraformaldehído, un subproducto al final de su polimerización.(15) Tiene propiedades aceptables en radiopacidad, fluidez y adherencia, destaca por su buena adaptación al conducto radicular y a sus vertientes, así como estabilidad dimensional aceptable a largo plazo. Tiempo de trabajo prolongado, aproximadamente 4 horas de fase plástica y 8 horas hasta su endurecimiento final. (6, 15, 18, 19)



Figura 13. Fotografía de la presentación del cemento Ah-Plus™ de marca comercial *Dentsply*. (38)

3.3.5 Cementos selladores a base de Silicón

Los cementos selladores a base de silicón tienen en su composición polidimetilsiloxano, que es un silicón que polimeriza por adición. Los cementos selladores de silicón tienen como característica que principalmente son insolubles, biocompatibles, estables dimensionalmente y radiopacos. Puede usarse en conductos secos o húmedos, con un tiempo de trabajo de 15 -30 minutos. (8, 15) Una desventaja es que no tienen propiedades antimicrobianas en su composición y existen pocos datos clínicos específicos de su actividad tóxica en el cuerpo. (16) Los cementos selladores a base de silicón tienen una alta capacidad de fluidez, esto les da la capacidad de extenderse a conductos laterales y llenar el espacio entre la pared del conducto y el cono maestro. (39)

Lee Endo – Fill ®

Fabricantes: *Lee Pharmaceuticals*. **(Figura 14)**

Componentes principales: Dimetilpolisiloxano, ácido indecilenico, alcohol, sílice, subnitrate de bismuto y catalizadores (tetraetilortosilicato, polidimetilsiloxano). (6)

Presentación: Pasta – Líquido.

Características: Posee un tiempo de trabajo aceptable, al igual que su radiopacidad. es bien tolerado por los tejidos periapicales y posee buenas propiedades de sellado y adhesión al conducto. (6)



Figura 14. Fotografía de la presentación del cemento Lee-Endo-Fill® de marca comercial *Lee Pharmaceuticals*. (40)

RSA RoekoSeal Automix®

Fabricantes: *Roeko*. (**Figura 15**)

Componentes principales: Polidimetilsiloxano, aceite de silicona, aceite de parafina, dióxido de circonio y como catalizador, ácido hexacloroplatinico.

Presentación: Pasta base - Pasta catalizadora (Jeringa mezcladora).

Características: Cemento sellador con propiedades como radiopacidad, biocompatibilidad y adhesión aceptables. (19, 24) Tiene una solubilidad muy baja.(19)

La característica más destacada de este cemento sellador es su fluidez, el espesor de película que llega a formarse es de 5 μm , permitiendo extenderse a lo largo de todo el conducto, conductos laterales y túbulos dentinarios. (19) Tiene un tiempo de trabajo prolongado y un ligero índice en expansión final, del 0,2%. (6, 19, 24)

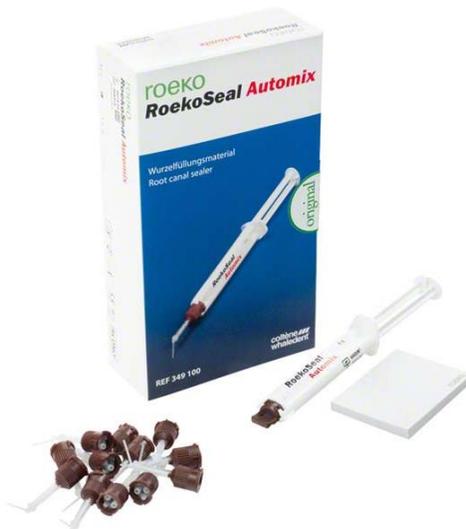


Figura 15. Fotografía de la presentación del cemento RoekoSeal Automix® de marca comercial Roeko. (41)

GuttaFlow®2

Fabricantes: *Roeko*. (**Figura 16**)

Componentes principales: Polidimetilsiloxano, polvo de gutapercha en partículas inferiores a 30 μm , óxido de zinc, dióxido de circonio, aceite de silicona, y catalizador (Ácido hexacloroplánico).

Presentación: Pasta – Pasta (Jeringa mezcladora).

Características: Se requiere una técnica específica para utilizar este tipo de cemento sellador, donde se utiliza una punta única de gutapercha y el cemento sellador es inyectado directamente en el conducto. (6)

Sus propiedades en radiopacidad y estabilidad son aceptables. También destaca su capacidad de fluidez y distribución en el conducto. (19) El tiempo de trabajo es corto, pudiéndose manipular aproximadamente 15 minutos y su polimerización final fluctúa entre 25 y 30 minutos. (6, 15, 24)



Figura 16. Fotografía de la presentación del cemento GuttaFlow®2 de la marca comercial *Roeko*. (42)

3.3.6 Cementos selladores a base de Biocerámica

Endosequence® BC sealer

Fabricantes: *Brasseler, Savannah, EUA. (Figura 17)*

Componentes principales: Base de fosfato de calcio, óxido de circonio, silicatos de calcio, fosfato monobásico de calcio, óxido de tántalo, hidróxido de calcio, material de relleno y agentes espesantes. (43)

Presentación: Jeringa con pasta prehomogeneizada inyectable.

Características: Este cemento sellador endurece por contacto a la humedad presente en el conducto y túbulos dentinarios al formar un hidrogel.(43)

Debido a la presencia de hidróxido de calcio en su formulación durante su acción final de endurecimiento presenta liberación de iones Ca^{++} y un pH de entre 10 y 12.

Tiene un elevado índice de fluidez, estabilidad dimensional y a su vez de solubilidad, está siendo más elevada comparada con AH-Plus™. Aunque posee buena una radiopacidad. (43, 44)



Figura 17. Fotografía de la presentación del cemento EndoSequence® de marca comercial *Brasseler*_(45)

SmartpasteBio

Fabricantes: *Smart-seal™, Stamford, UK. (Figura 18)*

Presentación: Kit de Smartseal.

Características: Los elementos de hidróxido de calcio e hidroxiapatita liberan iones Ca^{++} y dado su largo tiempo de fraguado, (hasta 10 horas) los iones siguen actuando a nivel apical formando andamios para la neoformación de hueso en zona periradicular apical.

Posee un elevado índice de estabilidad dimensional, adhesión a las paredes dentinarias y penetración, estas características son dadas por la naturaleza hidrófila de sus componentes, que absorben agua y posteriormente se expandirán dentro de los túbulos dentinarios. (44)



Figura 18. Fotografía de la presentación del cemento SmartPasteBio de la marca comercial *Smart-seal™*. (46)

iRoot® SP

Fabricantes: *Innovative Bioceramix, Vancouver, Canadá. (Figura 19)*

Componentes principales: Fosfato de calcio, silicato de calcio, hidróxido de calcio, óxido de zirconio y otros agentes para el espesado.

Presentación: Jeringa con pasta prehomogeneizada inyectable al conducto radicular

Características: En los componentes principales de la formulación de este cemento sellador destaca la hidroxiapatita, que proporciona la ventaja de formar una conexión entre la pared dentinaria y el cemento sellador durante el tiempo de fraguado. También se le atribuyen cualidades como resistencia radicular y efectos antimicrobianos durante y después de su fraguado. (44)



Figura 19. Fotografía de la presentación del cemento iRoot®SP de marca comercial *Innovative Bioceramix*. (47)

Biodentine™

Fabricantes: *Septodont, Saint Maur des Fosses, Francia. (Figura 20)*

Componentes principales: Silicato tricálcico, carbonato de calcio y óxido de circonio; y un líquido que contiene agua, cloruro de calcio y un policarboxilato modificado

Presentación: Líquido y cápsulas.

Características: Este cemento sellador presenta varias opciones para uso, al igual que el MTA tiene muchas indicaciones para diente vitales, se puede utilizar como un sustituto de dentina debajo de restauraciones, sellado de comunicaciones pulpares, retro-obturación, etc. (27)

Posee características como buena radiopacidad, alta capacidad de sellado, resistencia a la compresión. (27)

El Biodentine tiene un pH alcalino, aproximadamente 11, el tiempo de manipulación es corto pues su fraguado es entre 12 y 45 minutos. (25)

El cemento sellador Biodentine posee una formulación similar al MTA, esta formulación le da características favorables respecto a la biocompatibilidad. Promueve la proliferación celular del complejo dentinopulpar vivo; la osteoinducción y la mineralización por la constante liberación de iones Ca^{++} . También reacciona como el MTA al tener una adhesión a paredes y túbulos dentinarios. (43)



Figura 20. Fotografía de la presentación del cemento Biodentine™ de marca comercial *Septodont*. (48)

3.3.6.1 Cementos a base de Agregado Trióxido Mineral (MTA)

El Agregado Trióxido Mineral es biomaterial comúnmente conocido por su abreviatura MTA.

El MTA fue desarrollado y evaluado en la universidad de Loma Linda E.E.U.U. en el año 1993 por Lee Torabinejad y colaboradores. (49)

Su formulación está basada en el cemento sellador de Portland, con moléculas más finas y se agregaron moléculas de óxido de bismuto para aumentar la radiopacidad. (16, 24)

En sus primeras formulaciones el MTA, era de un color grisáceo, con el tiempo se realizaron versiones de color más blanco y cuyo tiempo de trabajo era ligeramente menor. (16)

Se comporta como un cemento sellador de hidróxido de calcio con propiedades biológicas comparables a las de la pasta, aunque con mejores propiedades físicas. (18)

El MTA tiene muchas formas de ser utilizado, puede utilizarse como barrera apical en dientes con ápices inmaduros y pulpa necrótica, apicoformación, apicogénesis, reparación de perforaciones dentales, para el tratamiento de reobturaciones y dientes con rizogénesis incompleta, sellador corona y como material de obturación temporal. (16, 18, 24, 49)

MTA-FILLAPEX®

Fabricantes: *Angelus, Londrina, Brasil.* **(Figura 21)**

Componentes principales: Resina (Resina salicilato, resina soluble, resina natural) y biocerámica (Óxido de silicio, óxido de potasio, óxido de aluminio, óxido de sodio, óxido de hierro, ácido sulfúrico, óxido de bismuto, óxido de magnesio, sílice cristalina, sulfatos de potasio y sodio). (15, 43)

Presentación: Jeringa auto mezclable o dos tubos. (44)

Características: Las cualidades principales que el MTA presenta son, la capacidad de formar puentes dentinarios, ser biocompatible, tener un pH de 12.5 (Alcalino) que no favorece la inflamación y elevada capacidad de sellado marginal. (16, 24, 49)

Los cementos selladores de MTA poseen una naturaleza hidrofílica, que, al fraguar en un ambiente húmedo, como el de la boca, tienden a expandirse un 0,1%, esta cualidad permite que su manipulación, aún en contacto con los fluidos orales, sea eficiente. (15, 18, 24, 44) En periodos de 1 a 28 días aumentan características como solubilidad y absorción de agua. (44)

Su manipulación en boca no requiere aditamentos especiales, pero si pericia de parte del operador, en cualquier caso, instrumentos para que sea más fácil el llevarlo a lugar deseado, en ocasiones tiende a endurecer mientras se está operando, para tal caso se agrega más agua y facilitar su manipulación. (18)

El atractivo de estos cementos selladores es que poseen la capacidad de ser osteoinductores, además de que son biocompatibles y bien tolerados por los tejidos peri-radicales. (15, 16, 44) Como dijo Gunnar en el 2011 “No se ha demostrado mutagenicidad del MTA ni publicado hasta el momento sobre reacciones alérgicas”. (16)



Figura 21. Fotografía de la presentación del cemento MTA FILLAPEX® de marca comercial *Angelus*. (50)

Endo CPM Sealer®

Fabricantes: *EGEO, Buenos Aires, Argentina. (Figura 22)*

Características: Cemento sellador formulado a partir de MTA FILLAPEX®, cuya composición de nano partículas hidrofílicas, en presencia de agua ayudan a su gelificación.

Durante su fraguado tiene liberación de iones Ca^{++} y acción bactericida en microorganismos propios de lesiones endodónticas.

Las ventajas de este cemento sellador radican en su capacidad de formación en osteoinducción y biocompatibilidad y las desventajas que se refieren son respecto al aspecto de su sellado periférico. (44)

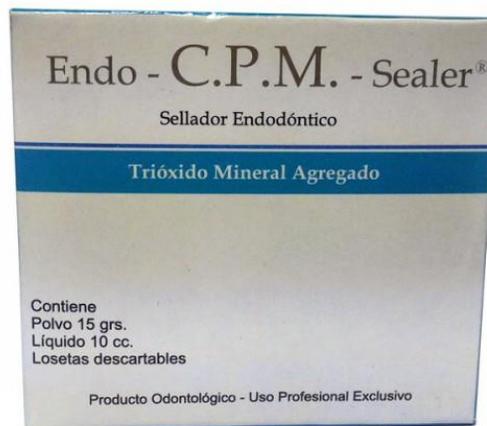


Figura 22. Fotografía de la presentación del cemento Endo CPM Sealer® de marca comercial *EGEO* (51)

4. ACTIVIDAD METABÓLICA

4.1. Óxido nítrico

En año 1980, investigadores, queriendo conocer cómo se regula la presión sanguínea, identificaron un «factor relajante del endotelio». Años después, se demostró que ese “factor” es el óxido nítrico (NO° , por sus siglas en inglés, nitric oxide) y se identificó el modo en que las células lo sintetizan a partir del aminoácido L-arginina. (52)

El NO° es una molécula única, con las características de un neurotransmisor y con múltiples funciones en el organismo. El NO° se difunde rápidamente (no se almacena), por su naturaleza gaseosa. Comparado con otros radicales, el NO° es una molécula estable, pero en contacto con el aire se oxida rápidamente a dióxido de nitrógeno. (52) La vida media del NO° es extremadamente corta, por lo cual su cuantificación directa es difícil. (53)

El NO° , en bajas cantidades, media efectos fisiológicos como la comunicación celular y en altas cantidades promueve citotoxicidad. La función citotóxica se relaciona al efecto microbicida y tumoricida en procesos de la inmunidad inespecífica. (53, 54)

Los mecanismos de citotoxicidad del NO° aún no son claros, pero participan diversas vías que llevan a las células a procesos apoptóticos o necróticos. El NO° ejerce su efecto principalmente en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células. La citotoxicidad del NO° en los sistemas biológicos está relacionada a su capacidad de difusión celular, a su autooxidación y a la reacción con superóxidos para formar nitritos (ONOO^-). (54)

4.2. Óxido nítrico sintasa

El óxido nítrico sintasa es una enzima estudiada por sus efectos e importancia en el proceso inflamatorio. (54). Es decir, es un indicador indirecto de una respuesta inflamatoria. La óxido nítrico sintasa pertenece a una familia enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico (NOS por sus siglas en inglés Nitric oxide synthases). Las familias de enzimas NOS son capaces de reaccionar con formas reactivas del oxígeno y moléculas biológicas para formar una gran cantidad de productos finales, incluyendo NO^{2-} , NO^{3-} (nitritos y nitratos) y S nitrosotioles. (52-54)

Existen tres isoformas de la NOS:

1. Isoforma tipo I (NOS1), también denominada neuronal (nNOS).
 2. Isoforma tipo II (NOS2), también denominada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).
 3. Isoforma tipo III (NOS3) también conocida como endotelial (eNOS).
- (54)

La iNOS es la enzima estudiada en las pruebas de biocompatibilidad en cementos selladores. Es estudiada porque puede ser inducida en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio. [La iNOS se activa en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: el interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$), el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y algunas citocinas como la interleucina 1 (IL1). (52-54) **(Figura 23)**

La enzima óxido nítrico sintasa inducible tiene la capacidad de producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. (54)

Todas las isoformas de NOS catalizan la oxidación de la L- arginina, dando lugar a la formación de óxido nítrico y L-citrulina y las isoformas nNOS y eNOS median la

producción de óxido nítrico en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular. (Figura 23 y 24) (52, 54)

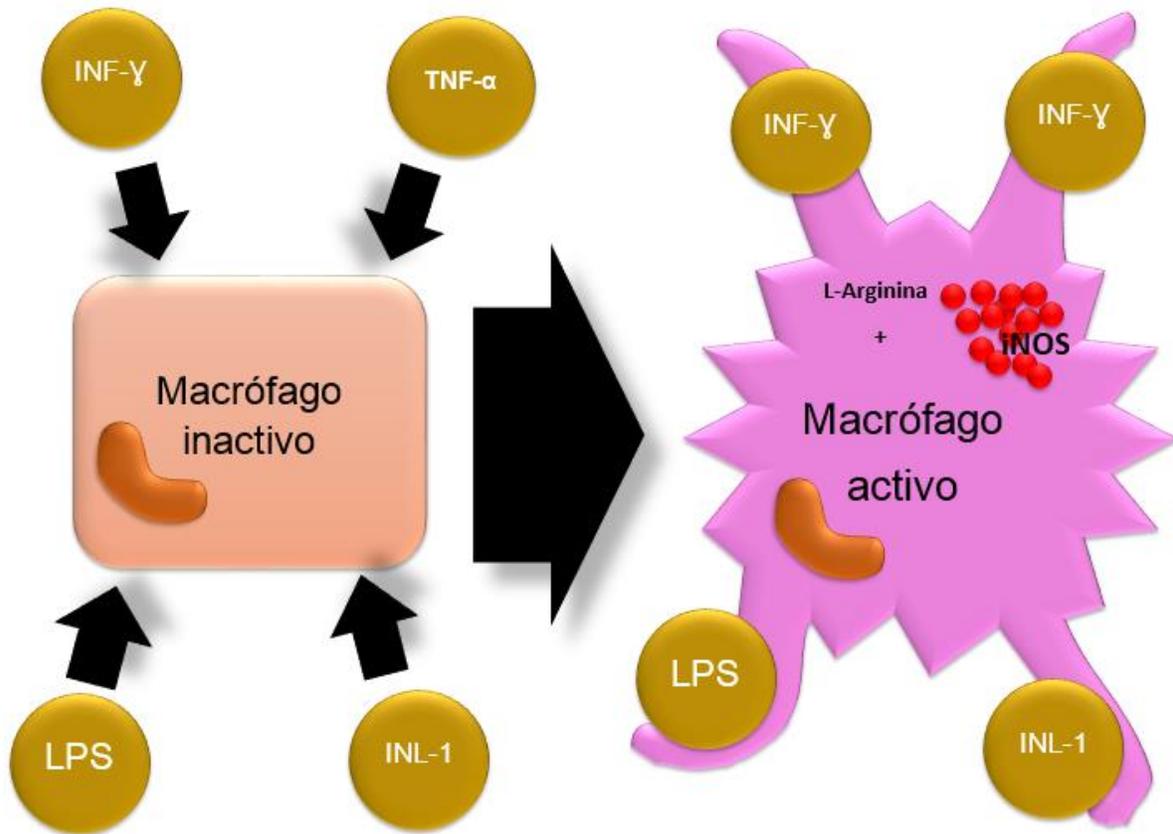


Figura 23. Activación de Macrófago. Activación del macrófago para la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por interferón gamma (IFN-γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), lipopolisacárido bacteriano (LPS) e interleucina 1 (INL-1). (Fuente directa)

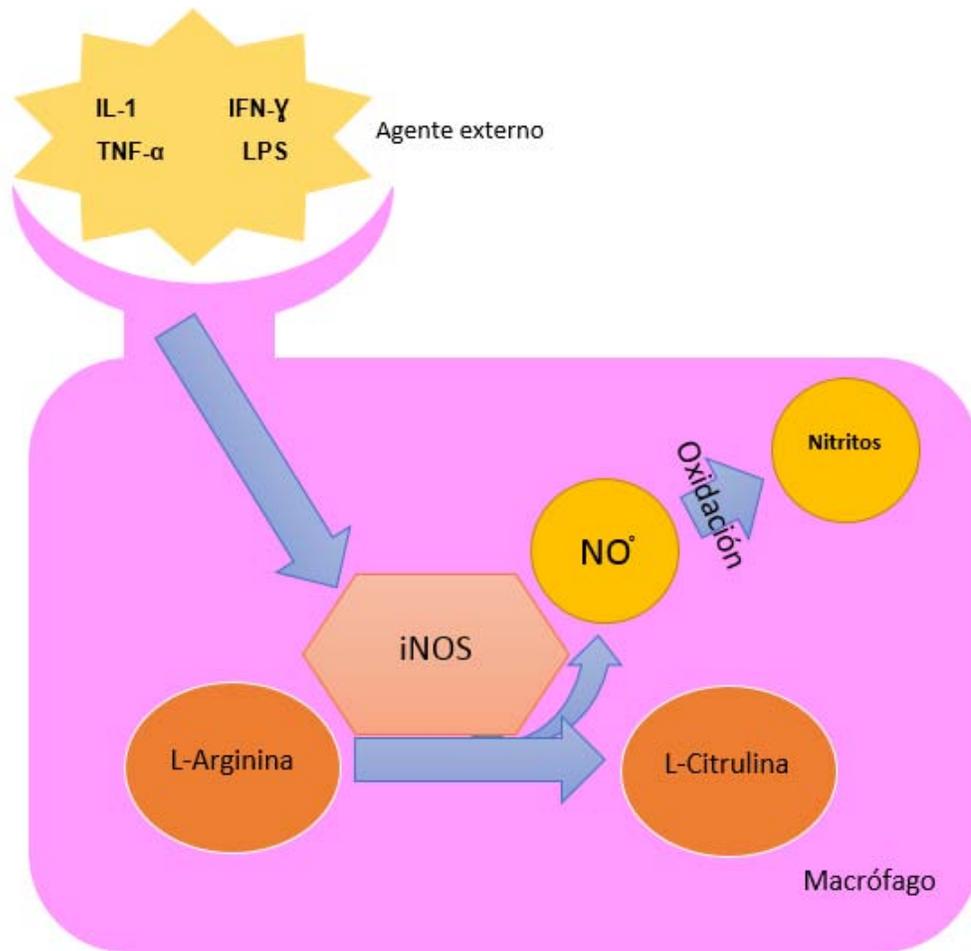


Figura 24. Formación de nitritos. Esquema de metabolismo celular de la molécula NO, el agente causal como son. interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lipopolisacárido bacteriano (LPS) o interleucina 1 (IL1) activan al macrófago, este a su vez activa la iNOS y se metabolizan los nitritos. (Fuente directa)

5. PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Las pruebas de biocompatibilidad se realizan en los materiales dentales con la finalidad de determinar la capacidad que tiene un material de uso odontológico para provocar una respuesta biológica favorable o desfavorable. (1)

Un biomaterial se define como aquel elemento, que al interactuar con el tejido no le causa daño y se relaciona de forma armónica con los tejidos naturales del organismo sin causarles daño alguno y sin que el cuerpo humano lo rechace, de tal manera que se establece un equilibrio de compatibilidad biológica entre ambos. (1)

También, un biomaterial debe resistir la degradación o corrosión de parte del cuerpo. Con un biomaterial el organismo no debe mostrar una respuesta exagerada. (13)

La mayor parte de pruebas de biocompatibilidad usadas en odontología miden los siguientes rubros:

- Citotoxicidad.
- Mutagenicidad o carcinogénesis.
- Niveles de reacciones inflamatorias o de respuestas inmunológicas frente a un material.

Las pruebas de uso son aquellas que se realizan en animales y humano que son realizadas de acuerdo con las Normas ISO 6876:2001, ISO 10993-5 (Estas bajo la aprobación de un comité de ética certificado). (1, 55)

5.1. Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* se realizan con el material completo o un extracto de material. El material se pone en contacto con algún sistema biológico. Con las pruebas *in vitro* se puede determinar la muerte o el crecimiento celular, la función celular y evaluar la integridad del material genético de la célula.(1) Estas pruebas resultan muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y tienen varias ventajas. No requieren el uso de animales de experimentación, son rápidas

y tienen una excelente relación costo-efectividad. Sin embargo, las respuestas *in vitro* no siempre son indicadoras de las reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son sólo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*. (1)

5.2. Prueba de Griess

La prueba de Griess, desarrollada en el año de 1858, lleva el nombre en honor a Peter Griess, el primero en describirla. La prueba fue elaborada para la identificación de compuestos químico - biológicos de nitritos orgánicos.

Actualmente, esta prueba tiene distintos usos, tanto en el ámbito de la biocompatibilidad celular como en el ámbito forense.(56)

La utilidad de esta prueba para los ensayos de biocompatibilidad e inflamación en los materiales químicos utilizados en odontología radica en el estudio de la cadena de inflamación en la que se presenta el óxido nítrico. El NO° en la célula es un gas sumamente permeable, con una vida inestable que oscila entre 6 a 10 segundos, dificultando la cuantificación exacta del NO°, esta molécula puede salir u oxidarse de forma inmediata en la célula. De este modo se utiliza la reacción de Griess para identificar la acción de la iNOS que produjo nitritos. La enzima iNOS aparece en el proceso de inflamación cuando es activada directamente en un macrófago en la reacción de señalización de algún factor que interactúe con los receptores de la célula.

El método de este ensayo radica en una reacción de diazotización, para que el espectrofotómetro pueda medir la absorbancia y detectar los nitritos formados por la oxidación espontánea del NO°, quiere decir que las moléculas presentes en la reacción de Griess tienden a reaccionar con los nitritos presentes, por eso cuando encuentran un nitrito, cambian de color. (52-54)

Específicamente, la reacción de Griess consiste en una diazotización que ocurre en dos pasos.

Primero el ácido sulfanílico reacciona con los nitritos acidificados y producen un agente nitrosido. Después, este ión se aparea con N-(1-naftil) etilendiamina (α -naftilamina) para formar una sal de diazonio y se desarrolla un color rosado.

Con el reactivo de Griess en las muestras puestas a prueba, el nitrito que es detectado y analizado causa la formación de un color rojo rosado cuando una muestra tiene en su contenido NO_2^- . **(Figura 25)** (52-54, 56)

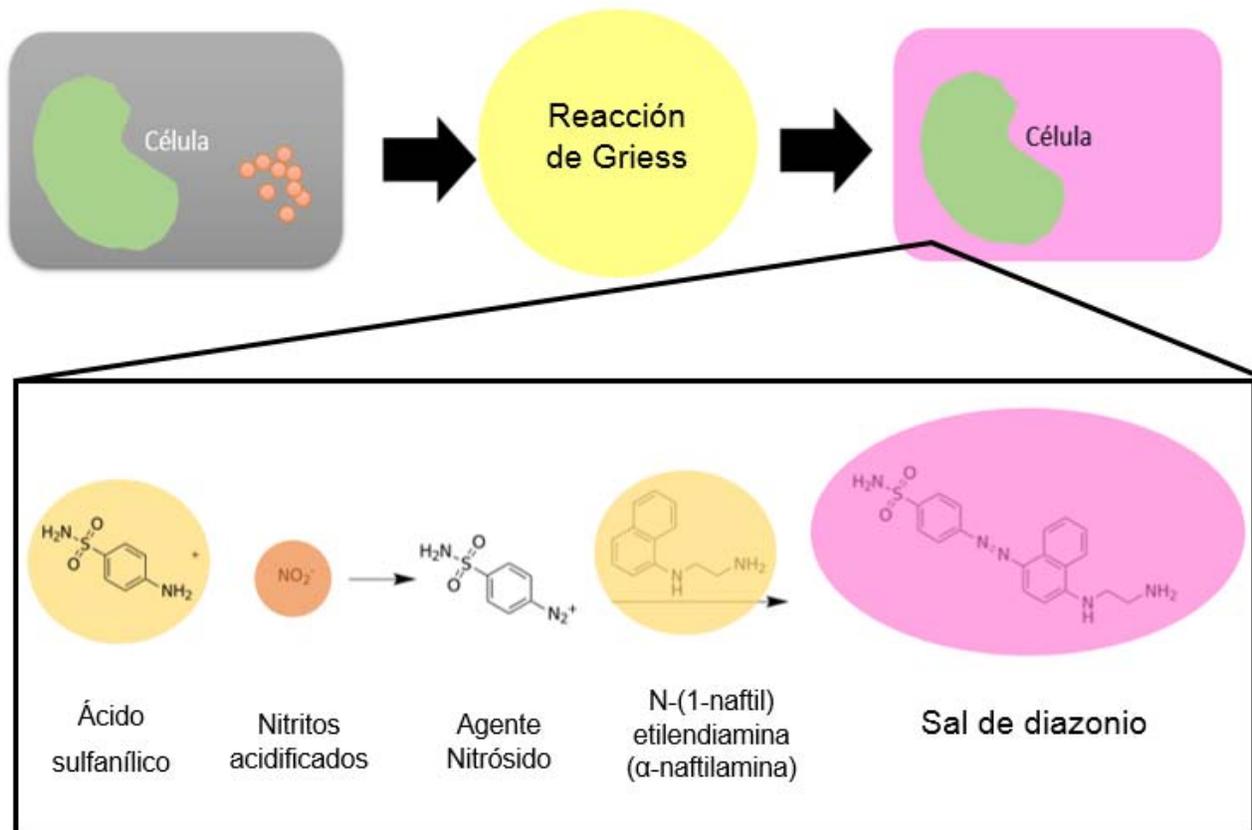


Figura 25. Esquema reacción de Griess. Los componentes en la fórmula de Griess interactúan con los nitritos que la célula produjo, creando la sal de diazonio que da un color rosado. (Fuente directa)

5.3. Reacción de MTT

La reacción de MTT es una reacción metabólica realizada en mitocondrias de células vivas, en la que se produce una reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta reacción fue desarrollada para la cuantificación de actividad metabólica mitocondrial. (57)

De forma natural el compuesto de MTT pertenece a la familia de sales de tetrazolio, tiene una coloración amarilla y es soluble en agua, durante la reducción que se realiza por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa el MTT gana un electrón H^+ y termina convirtiéndose en formazan, un compuesto coloreado de color azul, insoluble en agua. Una vez realizada la reacción, el compuesto resultante suele ser combinado con un disolvente orgánico (DMSO) para facilitar su cuantificación. **(Figura 26)** (57, 58)

La prueba de reacción de MTT permite determinar la acción mitocondrial de las células tratadas, que, en el caso de ensayos de biocompatibilidad, serán las células que hayan quedado vivas y con acción energética nula o excesiva. (57) Las células expuestas al MTT que estén vivas y tengan una acción mitocondrial efectiva, provocarán que el compuesto tome una coloración azulada/violeta, en caso contrario, mantendrán el color inicial, óseo amarillo claro. **(Figura 26)** (57, 59)

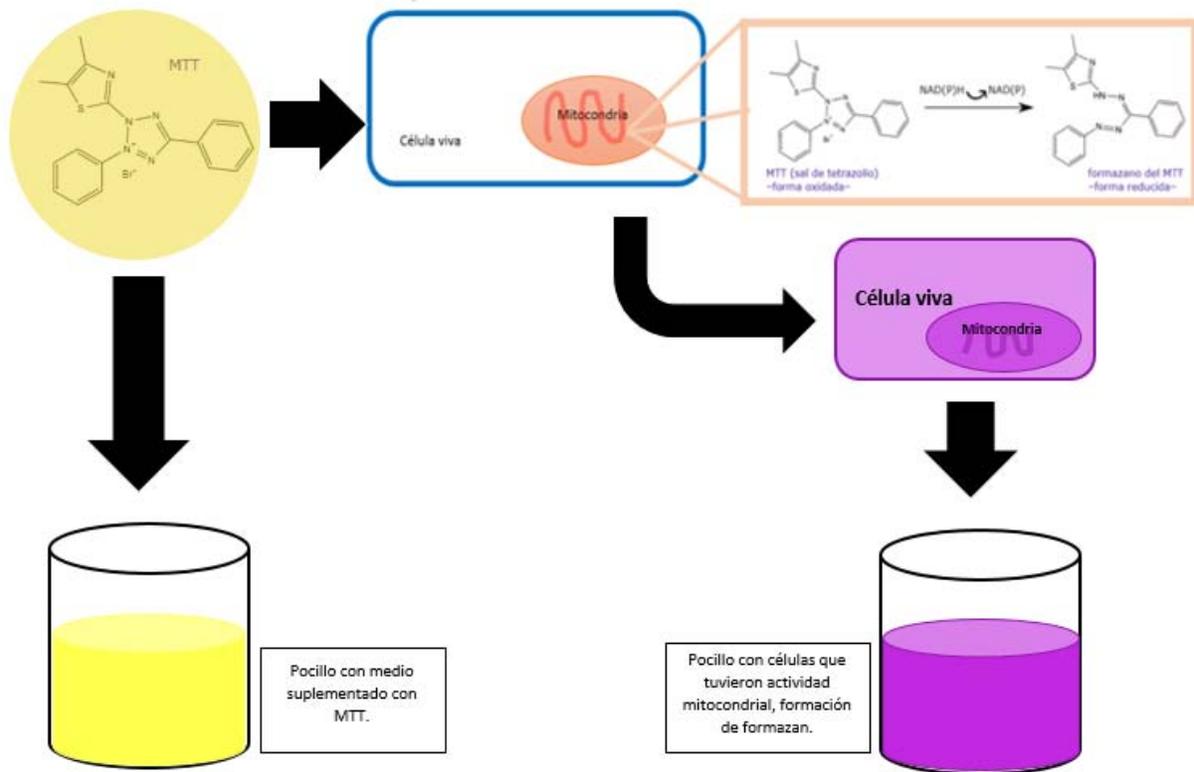


Figura 26. Esquema acción de MTT en células vivas. La célula con actividad mitocondrial metaboliza la molécula del MTT convirtiéndolo a formazan y tiñendo la célula. (Fuente directa)

5.4. Método de Sulforrodamina B

El método de tinción con sulforrodamina B (SRB) fue desarrollado en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos. El método de sulforodaminas tiene como objetivo ser una alternativa al empleo del método de reducción de MTT *in vitro*, para el descubrimiento de nuevos agentes anti-neoplásicos. (60)

La Sulforrodamina B es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. (Figura 27)

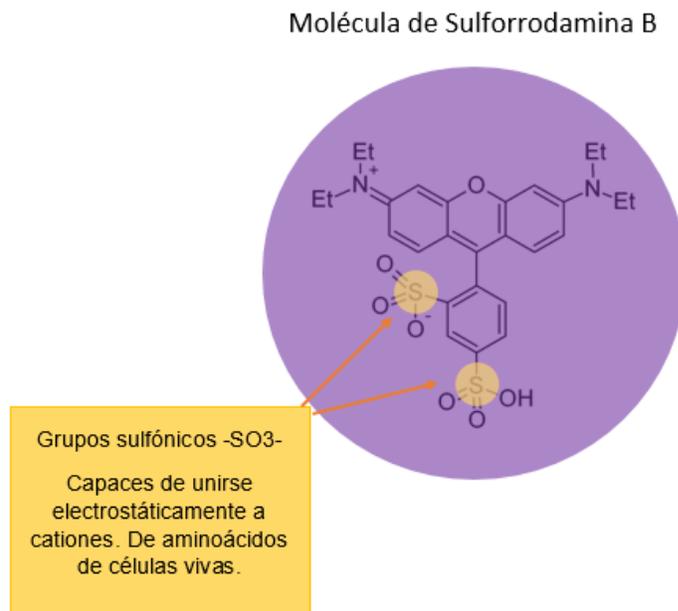


Figura 27. Molécula de Sulforrodamina B y grupos sulfónicos. Se señalan los iones sulfónicos tienen afinidad a aminoácidos en la membrana de la célula. (Fuente directa)

La sulforrodamida B en condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas de la membrana o dentro

de la célula, y se fija selectivamente a éstos. La característica de afinidad por aminoácidos proporciona un índice del contenido de proteína celular, siempre y cuando las células sean fijadas con ácido tricloroacético (TCA). **(Figura 28)**

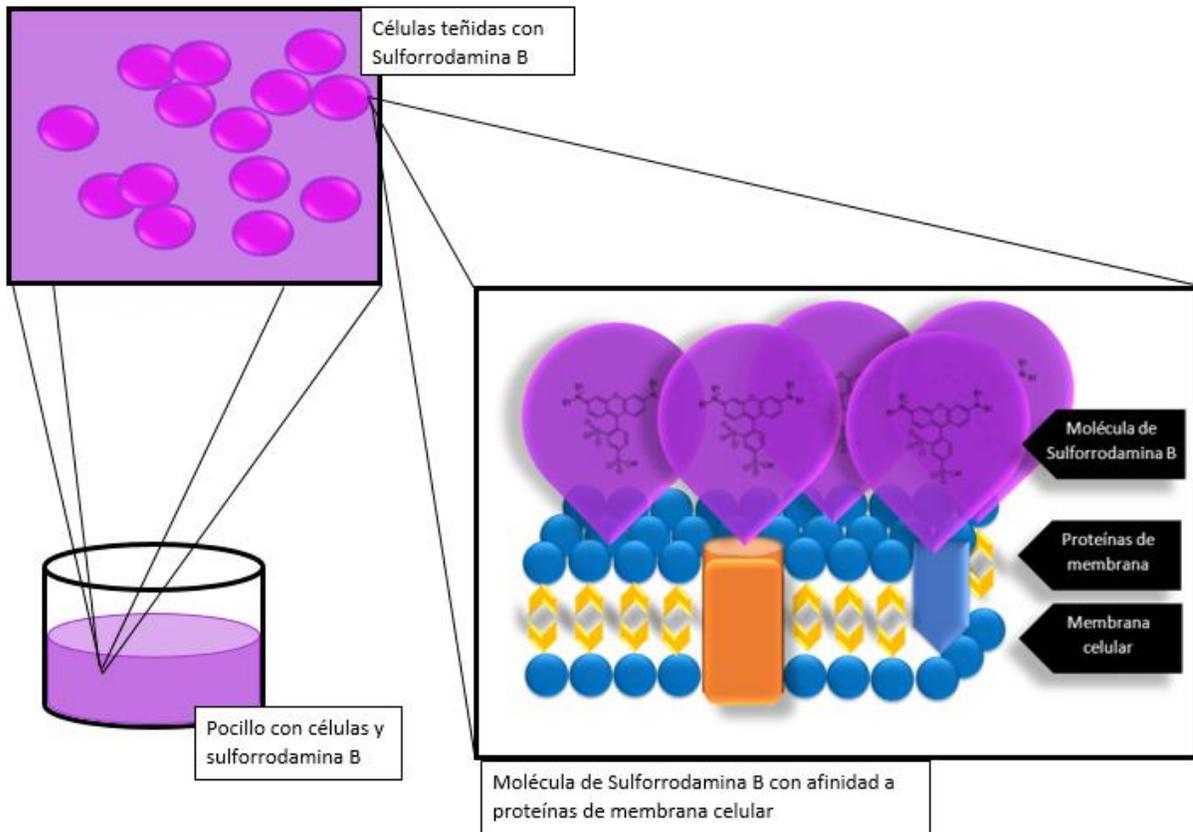


Figura 28. Esquema de afinidad y acción de Sulforrodamina B. Los iones sulfónicos se unen a los aminoácidos de la membrana celular, tiñendo la membrana. (Fuente directa)

6. CULTIVOS CELULARES

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. En 1948, Earle y colaboradores aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo.

Existen cuatro tipos de cultivos celulares:

- Cultivo celular primario (Cultivos en monocapa y cultivos en suspensión).
- Cultivo de órganos.
- Explantes primarios.
- Cultivos histotípicos y organotípicos.

6.1. Cultivo celular primario

El cultivo celular primario es el tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En los cultivos de disgregación celular se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. En los cultivos de disgregación las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente, cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia.

El hecho de que se detenga la proliferación en los cultivos de disgregación celular es porque las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. El subcultivo o pase es la operación que trasplantar las células que han crecido a un nuevo soporte. (61)

Existen dos tipos de cultivo celular primario:

- Cultivos en monocapa: las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.
- Cultivos en suspensión: las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes. (62)

Las células del cultivo primario en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en medio fresco.

Los cultivos sucesivos formados por estas técnicas se denominan una línea celular.

La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- Aumenta el número de células obtenidas
- Acaban predominando uno o dos tipos celulares: los que tienen mayor tasa de crecimiento
- La población celular se hace uniforme y homogénea
- Sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida.

Las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones.

Cuando se supera el límite de líneas celulares, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren.

Algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente.

Las células que evitan la senescencia pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de DNA) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación. (61, 62)

6.1.1. Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH)

En este estudio, se utilizó un cultivo primario de fibroblastos gingivales derivado de una biopsia de encía de un donador humano sano. Los fibroblastos tienen la morfología de huso, típica de fibroblastos y un crecimiento celular normal. (63)

6.2. Líneas celulares

6.2.1. Fibroblastos L929

Línea celular perteneciente a tejido conectivo de ratón. Proveniente de células modificadas de ratón, macho, de 100 días de vida, con el nombre comercial y científico de "L929", su morfología corresponde a "fibroblasto", el medio de cultivo es DMEM + 2 mM de glutamina + 10% de suero bovino fetal inactivado. El medio está formulado para incubar a 37° C en atmósfera con 5% CO₂. Susceptibilidad a otros virus según el medio de cultivo empleado. Viene con una leyenda que dice "Subclon de una línea parental cepa L, establecida por Earle en 1940. Fue una de las primeras líneas que se establecieron como cultivo continuo. La cepa L derivaba de tejido alveolar subcutáneo normal y tejido adiposo de un ratón C34/An, macho de 100 días".(64, 65)

6.2.2. RAW

La línea celular RAW pertenece a un cultivo celular, específicamente su nombre comercial y científico es RAW 264.7, en su ficha técnica se le describe como un “Macrófago monocito” y la morfología con que se describe es como “Macrófago”. Proveniente de células modificadas de ratón, macho, adulto. Además, aparece la siguiente leyenda “Esta línea fue establecida desde un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon”

También en la ficha técnica se especifica que el medio de cultivo es DMEM + 2mM glutamina + 1.5 g/ L bicarbonato sódico + 10 mM HEPES + 1 mM piruvato sódico + 4.5 g/L glucosa+ 10% suero bovino fetal inactivado. El medio está formulado para incubar a 37° C en atmósfera con 5% CO₂. (66, 67)

7. ANTECEDENTES

Durante la obturación de conductos, los cementos selladores endodónticos pueden ser extruidos desde el foramen apical hacia los tejidos periapicales. En estas condiciones, los cementos selladores pueden causar daño a las células y entonces inducir inflamación y retardar o incluso impedir el proceso de curación. Al evaluar la citotoxicidad de cuatro cementos selladores: Roeko Seal Automix®, Sealapex™, MTA FILLAPEX® y AH Plus™ sobre cultivos tanto de fibroblastos gingivales humanos como de la línea celular L929. Un estudio previamente realizado en el laboratorio se encontró que tanto los cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos como los fibroblastos de la línea celular L929 tratados con medios condicionados a diferentes tiempos (Fresco, fraguado, 1 hora, 24 y 72 horas después de fraguado) fueron diferentes. (68) Las células presentaron una morfología de forma ahusada típica de fibroblastos y se mantuvieron adheridos a la caja de cultivo al usar *Roeko Seal Automix®*. Sólo entre el 20 y 40 % de las células tratadas con el cemento sellador AH Plus™ fueron viables y las células presentaron una morfología esférica. Las células tratadas con el cemento sellador MTA FILLAPEX® fueron viables en condiciones de fresco, al tiempo de fraguado y a una hora después de fraguado y la morfología celular fue normal. Sin embargo, sólo el 50% de las células sobrevivieron a medios condicionados después de 24 y 72 h de fraguado. Las células presentaron una morfología celular esférica en estos casos. Finalmente, las células tratadas con el cemento sellador Sealapex™ mostraron una actividad metabólica celular de entre el 60 y el 80 % y su morfología fue similar a la forma normal. En conclusión, los cementos selladores Sealapex™, MTA Fillapex® y AH Plus™ poseen diferentes grados de citotoxicidad lo que sugiere que no son totalmente inocuos. A diferencia, el cemento sellador Roeko Seal Automix® no fue citotóxico, lo que sugiere que es un cemento sellador biocompatible. (68)

Además, en otro estudio también del laboratorio se evaluó la actividad inflamatoria generada por estos cementos selladores endodónticos en un modelo *in vivo*, utilizando el modelo de edema inducido por TPA (69). En este estudio, se evaluó de manera indirecta, la infiltración de neutrófilos, la respuesta inmunológica promovida

por neutrófilos, mediante la determinación del contenido de la enzima mieloperoxidasa. (69) El AH-Plus™ genera una inflamación, mientras que ninguno de los otros cementos selladores endodónticos genera inflamación. La inflamación generada por el AH-Plus™ recluta neutrófilos mientras el cemento sellador está fresco y hasta el tiempo de fraguado. Después del tiempo de fraguado, al disminuir la inflamación, también disminuye la cantidad de neutrófilos reclutados. Los cementos selladores endodónticos en general no producen inflamación en el sitio de aplicación.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En el mercado existen diversos cementos selladores endodónticos. Sin embargo, no todos ellos poseen características ideales. Algunos cementos selladores causan inflamación crónica en los tejidos periapicales al ser extruidos por lo que es importante conocer el grado de biocompatibilidad. En este estudio evaluamos cambios en la actividad metabólica de fibroblastos y macrófagos al ser expuestos a los cementos selladores AH-Plus™, Sealapex™, RSA RoekoSealAutomix® y MTA-FILLAPEX® que son de los más usados en la clínica. Esta evaluación se realizó, a través de conocer la producción de óxido nítrico, de manera indirecta midiendo la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa; la actividad mitocondrial, mediante la reducción de MTT y su citotoxicidad, a través del ensayo de sulforrodamina B.

9. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

Aunque existen diversos cementos selladores en el mercado pocos reportes muestran datos del grado de citotoxicidad y de inflamación que puedan provocar en los tejidos periapicales. Además, es muy difícil hacer comparaciones entre los cementos selladores ya que los datos no se han obtenido bajo las mismas condiciones. En nuestro laboratorio hemos empezado a comparar de manera sistemática los cementos selladores AH-Plus™, Sealapex™, RSA RoekoSealAutomix® y MTA-FILLAPEX® que son usados en la clínica. En este trabajo decidimos evaluar la citotoxicidad mediante el método de sulforrodamina, MTT y la producción de óxido nítrico.

10. HIPÓTESIS

La citotoxicidad y la producción de óxido nítrico son menores en células tratadas con medios condicionados de MTA-FILLAPEX®.

10.1. Hipótesis alterna

La citotoxicidad y la producción de óxido nítrico son mayores en células tratadas con medios condicionados de MTA-FILLAPEX®.

11. OBJETIVOS:

11.1. Objetivo general.

Evaluar el grado de biocompatibilidad de los cementos selladores endodónticos AH-Plus™, Sealapex™, RSA RoekoSealAutomix®, MTA-FILLAPEX® en dos tipos de cultivos de fibroblastos y monocitos *in vitro*.

11.2. Objetivos particulares:

1. Obtener medios condicionados de los cementos selladores endodónticos.
2. Cultivar fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos de ratón de la línea L-929 y de macrófagos murinos de la línea celular RAW.
3. Medir la actividad metabólica por reducción de MTT de los macrófagos RAW.
4. Cuantificar nitritos como medida indirecta de la activación del óxido nítrico sintasa en macrófagos murinos.
5. Medir la actividad citotóxica de los cementos selladores usando el método de sulforrodamina B en el cultivo celular FGH y línea celular L929.

12. MATERIAL Y MÉTODOS:

Material:

- Campana de flujo laminar clase II A/B3 (Forma Scientific, Inc. USA)
- Incubadora (Forma Scientific, Inc. USA)
- Microscopio (AmScope, Microsistemas)
- Centrífuga
- Cajas de cultivo de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Frascos para cultivo celular (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Pipetas
- Micropipetas (Rainin, Pipet - Lite, Mettler Toledo, USA)
- Puntas para micropipetas de 0.1-10 μ l (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Vaso de precipitados
- Matraz de cultivo celular (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Tubos Eppendorf (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Tubos cónicos (Costar, Corning Incorporated, Corning NY)
- Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY), suplementado con: 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 8mM de L-glutamina (GIBCO) y penicilina/estreptomicina/Fingizone® (10,000 unidades/ml, 10,000 μ g/ml y 25,000 μ g/ml, respectivamente; GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY)
- Tripsina/EDTA (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY).
- Espectómetro (BIO-TEK, Synergy HT)
- Medios condicionados
- Cemento sellador AH Plus™ (Dentsply)
- Cemento sellador MTA FILLAPEX® (Angellus)
- Cemento sellador RSA (RoekoSeal Automix®)
- Cemento sellador Sealapex™ (Sybron Kerr)

12.1. Líneas celulares

1. Fibroblastos gingivales humanos. Cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos (FGH) que ya se tienen en el laboratorio.
2. Fibroblastos de ratón de la línea celular L929 donados por el Dr. Alfonso González Noriega (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).
3. Macrófagos RAW obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71)

12.2. Cultivo celular

12.2.1. Fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos de la línea celular L929

Ambas líneas celulares de fibroblastos fueron cultivadas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY), suplementado con: 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 8mM de L-glutamina (GIBCO) y penicilina/estreptomicina/Fingizone® (10,000 unidades/ml, 10,000 µg/ml y 25,000 µg/ml, respectivamente; GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY). Los cultivos celulares se mantuvieron en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, Incorporated, Corning, NY) hasta que llegaron a un 80-90% de confluencia y se sub-cultivaron. Para esto, los fibroblastos fueron despegados con 0.25% de tripsina/EDTA (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY). La tripsina fue neutralizada con un volumen igual de medio de cultivo fresco. La suspensión celular fue centrifugada tres minutos a 1,500 rpm. El sobrenadante fue desechado y el botón celular se resuspendió en 5ml de medio fresco. Un cuarto de la resuspensión fue colocado en una botella de cultivo nueva. Todos los experimentos se realizaron entre los subcultivos 3 y el 10.

12.2.2. Macrófagos RAW

Las células fueron cultivadas en medio esencial modificado Dulbecco (DMEM) con L-glutamina a 4Mm, glucosa a 4.5 g/l, piruvato de sodio (1mM) suplementado con suero fetal bovino inactivado con calor (ATCC-302002) al 10%. Las células se mantuvieron al 37°C con atmosfera de CO₂ (5%). Las células se suspendieron en medio DMEM y la actividad metabólica celular se determinó por exclusión con azul de tripano. Todos los experimentos se realizaron entre los subcultivos 3 y el 10.

12.3. Obtención de medios condicionados de cementos selladores endodónticos

Los cementos selladores 1) AH Plus™, 2) MTA-FILLAPEX®, 3) RSA RoekoSealAutomix® y 4) Selapex™ fueron preparados dentro de la campana de flujo laminar en condiciones estériles y de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes. Brevemente, en losetas estériles sobre campos estériles fueron mezclados los cementos selladores que requirieron y se colocaron dentro de cilindros de teflón (Tetraflón, Toluca, Estado de México). En cajas de cultivo de 24 pozos, se colocó un cuadro de Mylar Sheet (Tetraflón, Toluca, Estado de México) estéril por pozo. Sobre cada uno de los cuadros se colocó un cilindro de teflón estéril de 5.5 mm de diámetro. Dentro de cada cilindro se colocó el cemento sellador. A cada pozo de cultivo se le agregaron 1.5 ml de medio de cultivo (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY). El medio de cultivo se dejó en contacto con el cemento sellador por diferentes tiempos y luego se colectó pasándolo a un tubo Eppendorf y se guardó a -20°C hasta su uso. Los medios condicionados de los cementos selladores se obtuvieron: fresco (tiempo inicial), tiempo de fraguado, y 1, 24 y 72 h después del fraguado.

Como control de medio condicionado se recolectaron medios que no fueron expuestos a ningún cemento sellador, a los mismos tiempos.

12.4. Determinación de nitritos en sobrenadantes de macrófagos

Se emplearon la línea celular RAW a una densidad de 1×10^6 cel/ml en 100 μ l por pozo, se incubaron por 12 h para favorecer su adherencia. Las células se trataron con los medios condicionados que fueron agregados en un volumen 100 μ l y se incubaron por 24 h a 37°C. Para medir la concentración de nitritos en el medio se utilizaron 100 μ l de cada sobrenadante y se mezcló con el mismo volumen de reactivo de Griess el cual contiene, 1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico y 0.1% de dihidrocloruro de N-(naftil)-etilendiamina en agua. **(Figura 29)** La sulfanilamida reaccionó con los nitritos en medio ácido para formar un compuesto

de diazonio, el que interacciona con las aminas aromáticas del dihidrocloruro de N-(naftil)-etilendiamina formando un producto de color rosado. Las absorbancias de las muestras se determinaron a 515 nm con un lector de ELISA (Syner/HT Biotek Instruments). Los datos se procesaron a los promedios de la Densidad óptica (DO) de los pozos/línea tratados con los cementos selladores (DO_T) entre los pozos tratados con medio (DO_M) y luego multiplicando por 100. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad metabólica celular que se calcula con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Nitritos} = (DO_T / DO_M) * 100$$

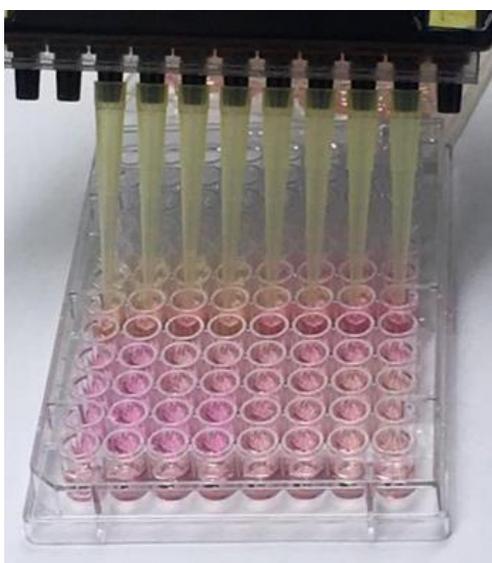


Figura 29. Placa de 96 pozos con células a las que se les agrega reactivo de Griess (lado izquierdo). Placa de 96 pozos donde se observa la reacción de Griess. Es decir, los colores más rosados son los pozos donde hubo mayor actividad metabólica celular (lado derecho).

12.5. Actividad metabólica en macrófaos por el ensayo de MTT

Se utilizaron las mismas células RAW que sirvieron para medir nitritos, 100 µl/pozo de 1×10^6 células/ml, las células fueron lavadas después de 24 h con solución amortiguadora de fosfatos antes de agregar la solución de MTT. La respiración celular fue usada como un indicador de actividad metabólica y fue determinada por la reducción de bromuro de 3-(4, 5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a formazan. Esta reducción es dependiente de la mitocondria. Se añadieron 10 µl de MTT en 100 µl de PBS a cada pozo de la placa y se incubaron por 4h a 37°C. Se decantó la solución de cada pozo y se agregaron 100 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar el formazán producido por la actividad mitocondrial. Se determinó la absorbancia a 570 nm. **(Figura 30)** Los datos se procesaron multiplicando por 100 a los promedios de la Densidad óptica (DO) de los pozos/línea tratados con los cementos selladores (DO_T) entre los pozos tratados con medio (DO_C). Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad metabólica celular que se calcula con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Actividad metabólica} = 100 * (DO_T / DO_C).$$



Figura 30. Placa de 96 pozos con células a las que se les agrega reactivo de MTT (lado izquierdo). Placa de 96 pozos donde se observa la reacción de MTT. Es decir, los colores más violetas son los pozos donde hubo mayor actividad metabólica (lado derecho).

12.6. Procedimiento del método de sulforrodamina B

La línea celular L929 y el cultivo primario de FGH fueron cultivados en frascos de 25 cm², con medio de cultivo DMEN (DulbeccoModified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (10%), una solución de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina. Los cultivos con una confluencia del 80%, fueron cosechados adicionando 1 ml de 0.25% de tripsina-EDTA. Las células en suspensión fueron depositadas en tubos cónicos y centrifugadas por 3 min, ya formado el botón celular se le agregó medio de cultivo para resuspender las células. Se tomó una alícuota de 30 µl inóculo y se agregaron 30 µl de azul de tripano, y a los 5 minutos se depositaron 10 µl en placas de lectura del contador celular automatizado (BioRad TC20) y cuantificó la actividad metabólica celular, y se ajusta el volumen del inóculo por ml. Para ambos cultivos, se empleó una población de células de 10x10⁴ cel/ml. Se emplearon placas de 96 pozos, y con ayuda de una pipeta multicanal se adicionaron 100 µl por pozo y en la misma placa se adicionaron los dos tipos de cultivo celulares por triplicado. La placa se preincubó por 24 h a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la adherencia de las células al sustrato de la placa. Los medios condicionados se agregaron 100 µl, siendo el volumen final del pozo de 200 µl. Nuevamente la microplaca fue incubada por 24 h bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación los cultivos en los pozos fueron fijadas *in situ* añadiendo 50 µl de una solución de ácidotricloroacético (TCA) frío al 50% e incubadas a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua destilada y secadas al ambiente. La tinción de las células fijadas al sustrato del pozo fue realizada agregando 100µl de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida fue removida por 3 lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar al ambiente. Las placas teñidas se les agregó 10 µl de un amortiguador de tris y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo. A continuación, se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. **(Figura 31)**

Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los pozos/línea tratados con los cementos selladores (DOt), los pozos tratados con medio (DOc) y pozos de testigos, es decir aquellos que no tienen células, pero si compuesto (DObg). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición de Crecimiento} = 100 - (\text{DOt} - \text{DOb} / \text{DOc} - \text{DOb}) * 100$$

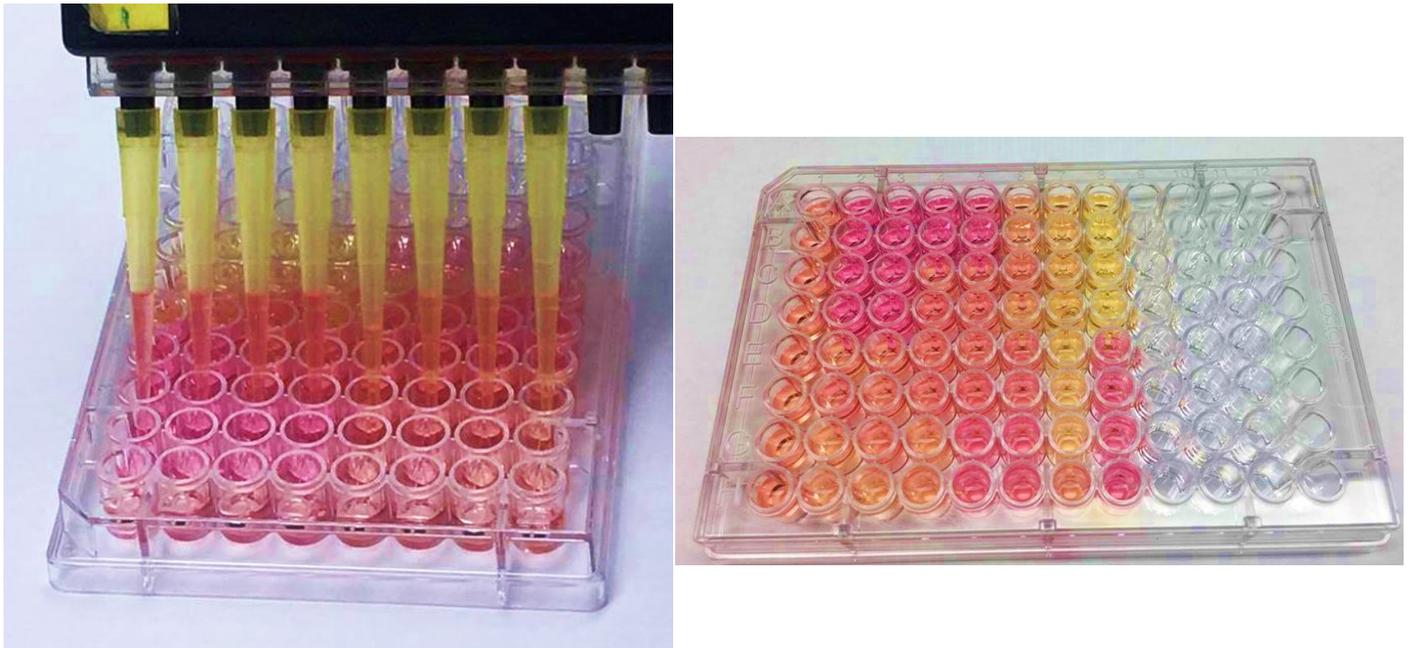


Figura 31. Placa de 96 pozos con células a las que se les agrega sulforrodamina (lado izquierdo). Placa de 96 pozos donde se observa la reacción de sulforrodamina. Es decir, los colores más rosados son los pozos donde hubo menor inhibición del crecimiento (lado derecho).

13. RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos después de realizar los experimentos se agruparon del siguiente modo:

NOMENCLATURA	
Selladores	Tiempo
A – AH Plus™	1 - Fresco
R - RoekoSealAutomix®	2 - Fraguado
M - MTA-FILLAPEX®	3 - 1 hora después de fraguar
S – Sealapex™	4 - 24 horas después de fraguar
	5 - 72 horas después de fraguar

14. ESTADÍSTICA

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con prueba posthoc Bonferroni. Esto, con el propósito de conocer si existe una diferencia significativa entre tratamientos y los cementos selladores.

15.RESULTADOS

Actividad metabólica y generación de nitritos en macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador AH-Plus™.

Los macrófagos de la línea celular RAW fueron incubados con medios condicionados del cemento sellador AH-Plus™ en condiciones de fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas después de fraguado. La actividad metabólica fue medida por el ensayo de reducción de MTT. Los macrófagos al ser expuestos a medio condicionado de AH-Plus™ en fresco presentaron una actividad metabólica mayor al 100%. Sin embargo, cuando se les adicionó medio condicionado del cemento sellador fraguado, la actividad disminuyó al 12% ($p=0.0011$). Este mismo comportamiento se observó en la actividad metabólica a los tiempos de 1, 24 y 72 horas después de fraguado. **(Figura 32)**

En el caso de la producción de nitritos, ensayo que muestra la activación de los macrófagos, se observó que la producción de nitritos fue del 19% con el cemento sellador en fresco, este comportamiento se mantuvo al tiempo de fraguado (13%) y a la hora del fraguado (16%). Sin embargo, a las 24 horas se observó que la actividad aumentó, alcanzando un 57% ($p=0.0081$) que nuevamente disminuyó al 11% ($p=0.0025$) a las 72 horas. **(Figura 32)**

Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador AH-Plus™

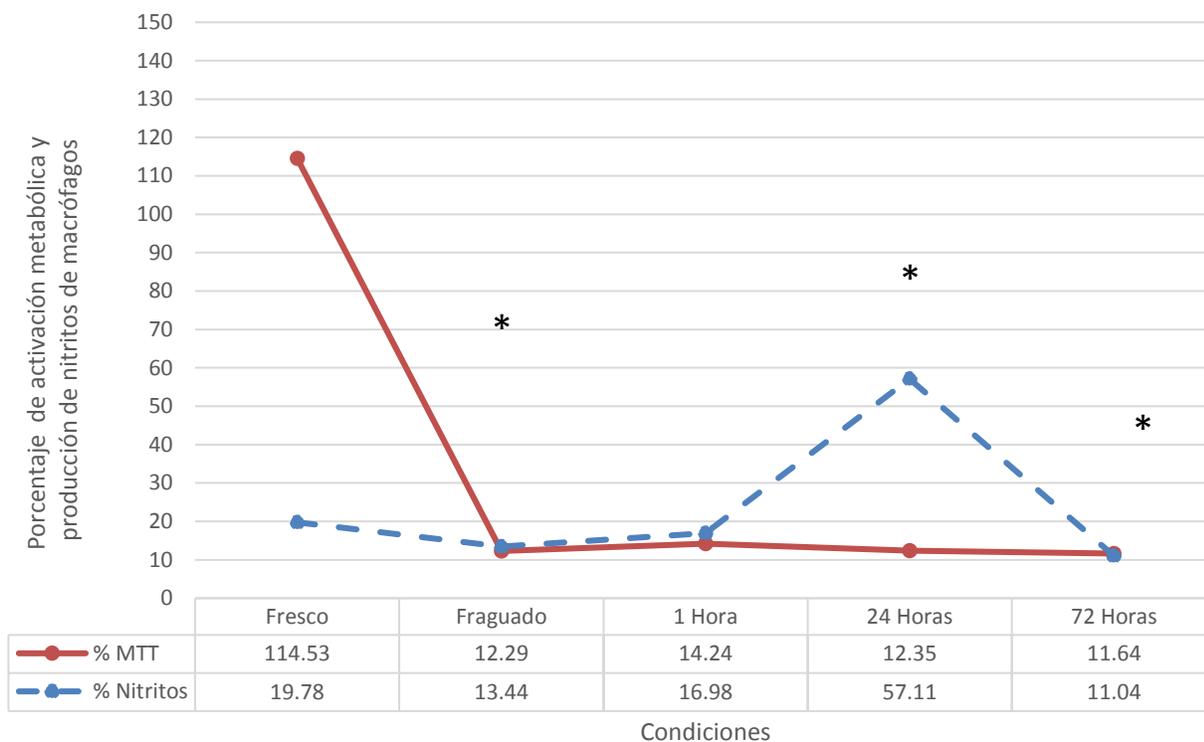


Figura 32. Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador AH-Plus™. Producción de nitritos y actividad metabólica de macrófagos de la línea celular RAW expuestos a medios condicionados de AH-Plus™ en fresco y a diferentes tiempos de fraguado. Se realizó un ANOVA, los asteriscos representan un valor de $P < 0.05$ comparando con las condiciones contiguas inmediatas anteriores. $n = 2$.

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento cementos sellador AH-Plus™

Los fibroblastos tanto de la línea celular L929 como cultivos primarios de FGH fueron incubados con medios condicionados de AH-Plus® en fresco, fraguado, a la 1, 24 y 72 horas de fraguado. El porcentaje de inhibición de la proliferación de estos fibroblastos; es decir, la capacidad para detener el crecimiento celular fue medida por el ensayo de sulforrodamina B.

Los fibroblastos de la línea celular L929, al ser expuestos a medio condicionado de AH-Plus™ en fresco, mostraron una inhibición del 5%. Sin embargo, cuando se les adicionó medio condicionado al tiempo de fraguado, esta inhibición aumentó al 48% ($p=0.0014$). Este mismo comportamiento se mantuvo en los tiempos de 1, 24 y 72 horas después de fraguado. **(Figura 33)**

En el caso de los FGH, al ser expuestos a medio condicionado de AH-Plus™ en fresco, no mostraron ninguna inhibición, de hecho, proliferaron discretamente con medio no condicionado. Al igual que con los fibroblastos L929, una inhibición del 45% ($p < 0.0001$) fue observada cuando fueron expuestos a medio condicionado al tiempo de fraguado. Este mismo comportamiento se mantuvo en la actividad metabólica a los tiempos de 1, 24 y 72 horas después de fraguado, llegando la inhibición hasta un 52%. **(Figura 33)**

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador AH-Plus™.

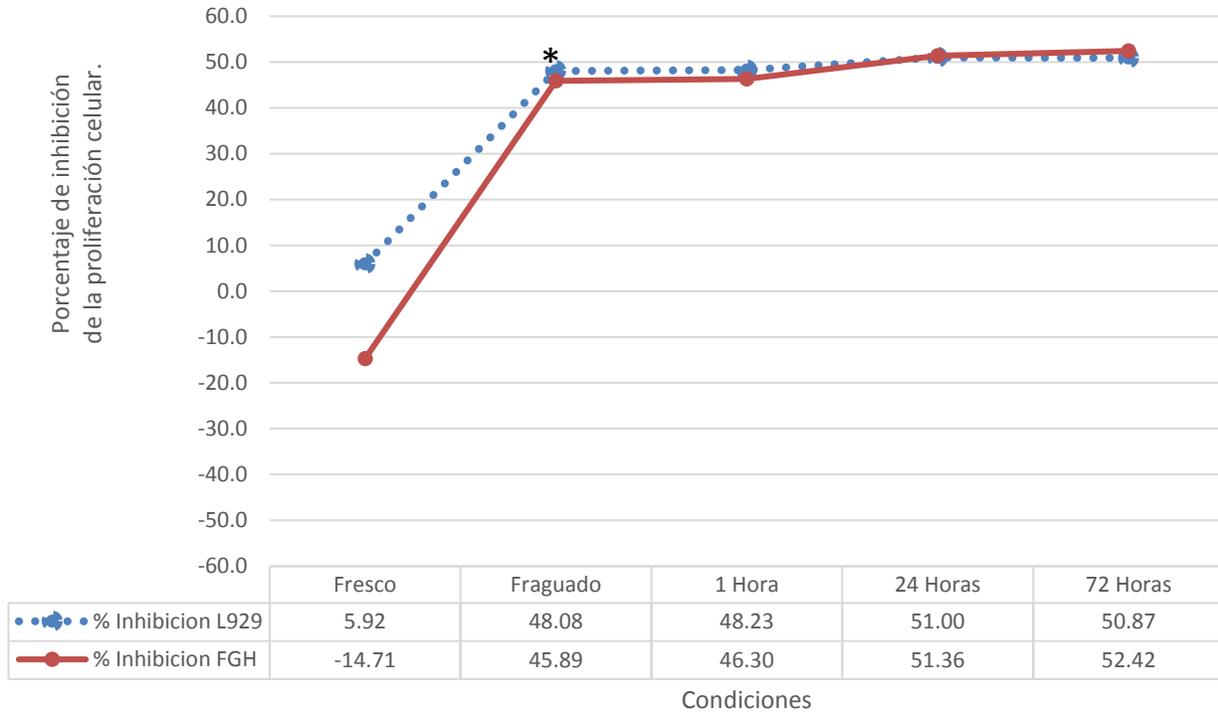


Figura 33. Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador AH-Plus™. La gráfica muestra los porcentajes de inhibición de la proliferación de fibroblastos de la línea celular L929 y gingivales humanos (FGH) expuestos a medios condicionados del cemento sellador AH-Plus™ en fresco, fraguado y a diferentes tiempos de fraguado. Se realizó un ANOVA, los asteriscos representan valores de $P < 0.05$ con respecto a la condición inmediata anterior. $n = 2$.

Nota. Los valores negativos denotan valores mayores que los del grupo tratado solo con medio de cultivo.

Actividad metabólica y generación de nitritos en macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador MTA-FILLAPEX®

Los macrófagos de la línea celular RAW fueron incubados con medios condicionados del cemento sellador MTA- Fillapex (MTA) en condiciones de fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas de fraguado. Usando cemento sellador MTA-FILLAPEX® en fresco, los macrófagos presentaron un 85% de actividad metabólica. **(Figura 34)** Sin embargo, usando MTA al tiempo de fraguado, la actividad metabólica disminuyó al 48%. **(Figura 34)** Consecutivamente al exponer los macrófagos al cemento sellador a la hora del tiempo de fraguado, la actividad metabólica aumento hasta 90%, misma que se redujo nuevamente al 40% en el tiempo de 24 h de actividad del cemento sellador y se mantuvo (55%) al tiempo de 72 h. **(Figura 34)**

En el caso de la producción de nitritos, se puede observar que los macrófagos se activaron ligeramente y esta activación se mantuvo entre el 20 y 30% en todas las condiciones evaluadas. Siendo estas, en fresco 21%, al tiempo de fraguado 30%, a la hora del tiempo de fraguado 33%, a las 24 h 31% y finalmente a las 72 h 20%. **(Figura 34)**

Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador MTA FILLAPEX®

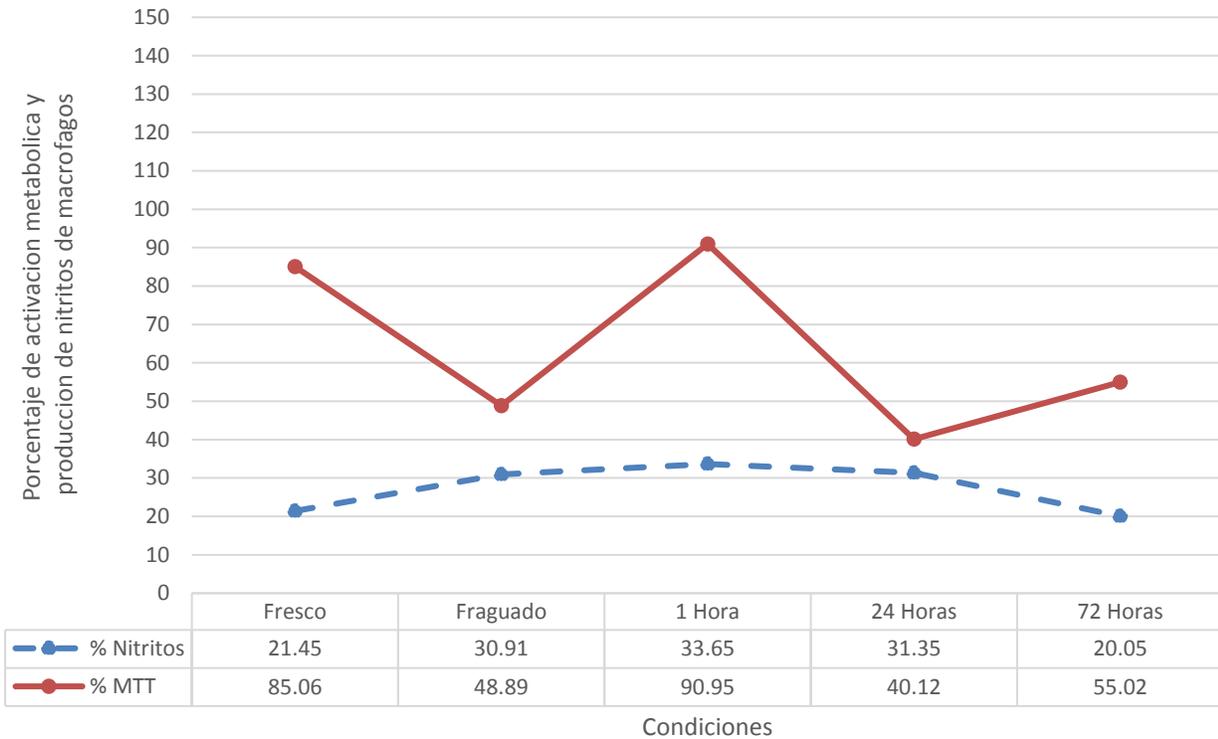


Figura 34. Actividad metabólica y generación de nitritos en macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador MTA-FILLAPEX®. Producción de nitritos y actividad metabólica de macrófagos de la línea celular RAW expuestos a medios condicionados de MTA-FILLAPEX® en fresco y a diferentes tiempos de fraguado.

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador MTA FILLAPEX®

Como en el caso del sellador AH-Plus™, los fibroblastos tanto de la línea celular L929 como los FGH fueron incubados con medios condicionados de MTA FILLAPEX® en fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas de fraguado y la inhibición de su crecimiento fue medida mediante el ensayo sulforrodamina B.

Los fibroblastos L929, al ser expuestos al medio condicionado fresco de MTA FILLAPEX® presentaron un porcentaje de inhibición del 1%. Este comportamiento continuó al tiempo de fraguado (4%) y a la hora del fraguado (1%). Sin embargo, utilizando los medios condicionados de 24 h ($p < 0.0001$) y 72 h la inhibición aumentó a 24% y 25%, respectivamente. **(Figura 35).**

Un comportamiento muy similar fue observado en los FGH en las primeras tres condiciones. En fresco el porcentaje de inhibición fue de 4%, que disminuyó al 2% al tiempo de fraguado y para la hora de fraguado no existe inhibición. En concordancia con las observaciones de los otros fibroblastos, utilizando los medios condicionados de 24 y 72 h la inhibición aumentó a 25% y 21%, respectivamente. **(Figura 35).**

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador MTA-FILLAPEX®.

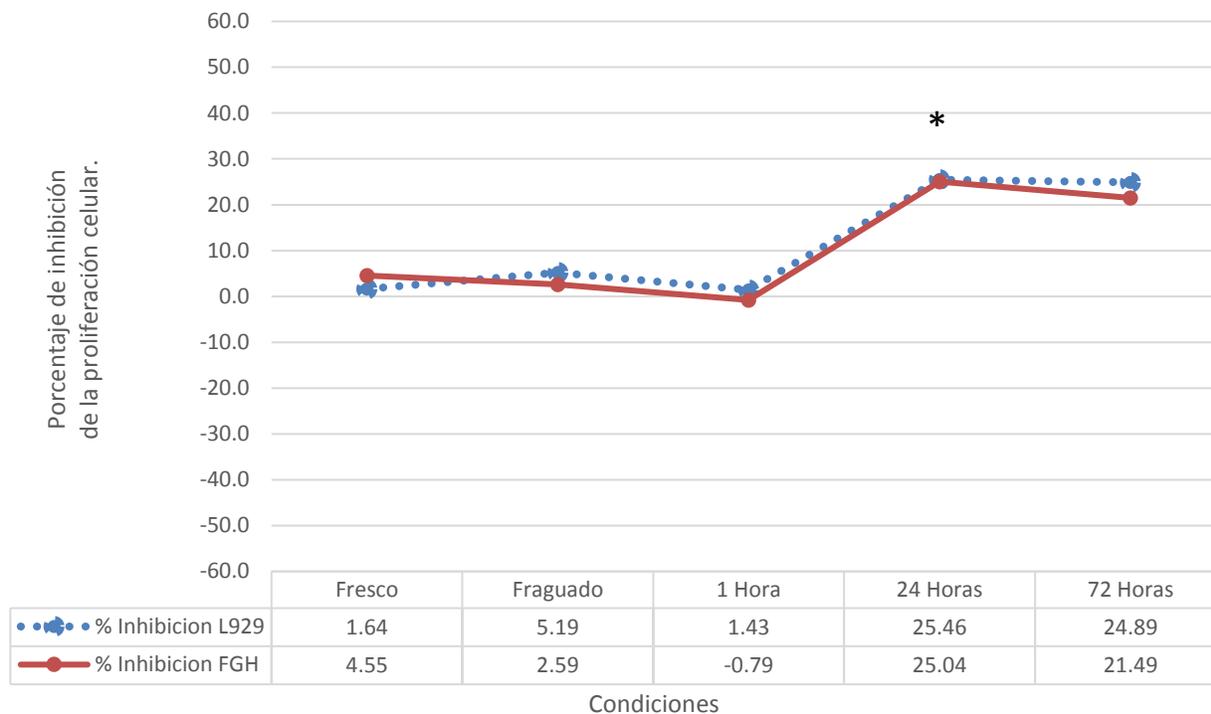


Figura 35. Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador MTA-FILLAPEX®. La gráfica muestra los porcentajes de inhibición de la proliferación de fibroblastos de la línea celular L929 y gingivales humanos (FGH) expuestos a medios condicionados del cemento sellador MTA-FILLAPEX® en fresco, fraguado y a diferentes tiempos de fraguado. Se realizó un ANOVA, los asteriscos representan valores de $P < 0.05$ con respecto a la condición inmediata anterior. $n = 2$.

Nota. Los valores negativos denotan valores mayores que los del grupo tratado solo con medio de cultivo.

Actividad metabólica y generación de nitritos en macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador Roeko-Seal Automix®.

Como con los cementos selladores anteriores, macrófagos de la línea celular RAW fueron incubados con medios condicionados de Roeko-Seal Automix® (RSA) en fresco, fraguado, a la 1, 24 y 72 horas de fraguado. Adicionado medio condicionado en fresco, los macrófagos presentaron un 54% de actividad metabólica. Esta actividad aumentó al 98% para el tiempo de fraguado. Sin embargo, para la hora de fraguado, la actividad metabólica disminuyó al 73% y se mantuvo para las 24 h después del fraguado (72%). En el tiempo de 72 h la actividad nuevamente aumentó al 101%. **(Figura 36).**

En el caso de la producción de nitritos, se puede observar que la activación de los macrófagos fue de un 25% en fresco a un 38% a las 72 h. La activación inicial fue de 25% aumentado a 40% al tiempo de fraguado y hasta 68% a la hora de fraguado, siendo este tiempo el momento máximo de activación de macrófagos. La actividad disminuye a 21% para las 24 h ($p=0.0585$) y sube ligeramente a 38% para las 72 h. **(Figura 36).**

Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador RSA®

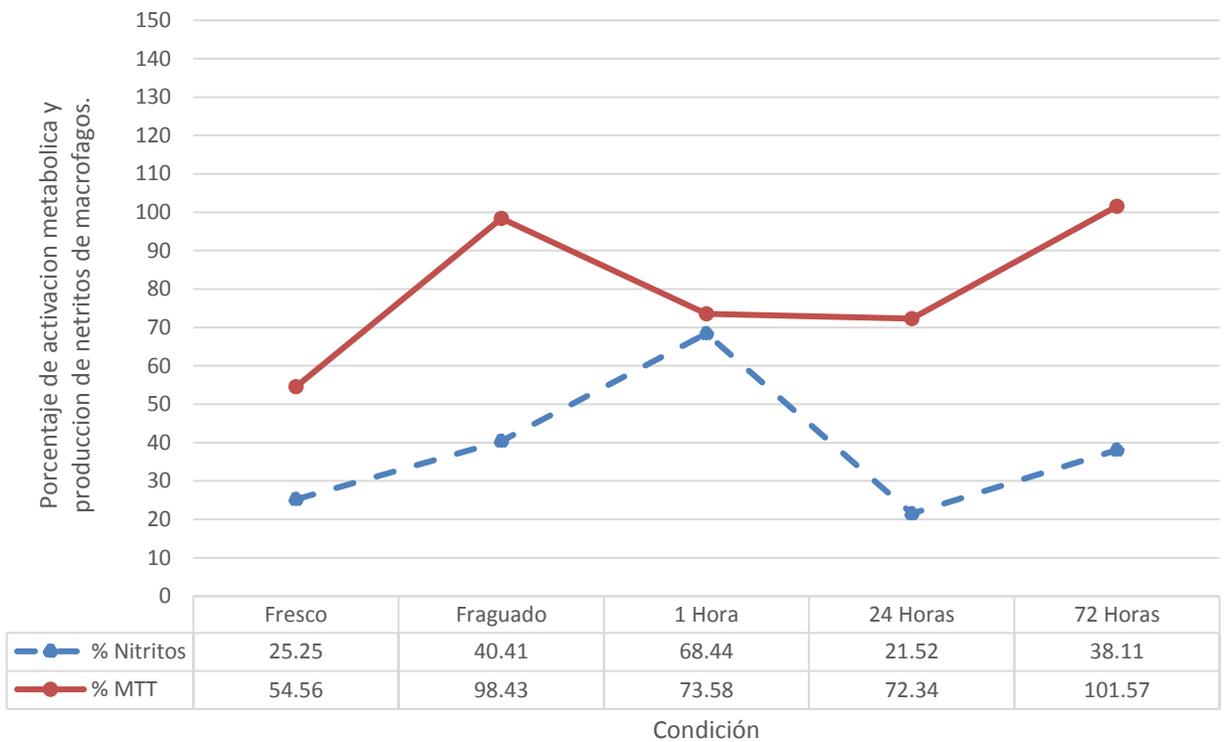


Figura 36. Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador RoekoSealAutomix®. Producción de nitritos y actividad metabólica de macrófagos de la línea celular RAW expuestos a medios condicionados de RoekoSealAutomix® en fresco y a diferentes tiempos de fraguado.

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador RoekoSealAutomix®.

Al igual que con los macrófagos RAW, fibroblastos L929 y FGH fueron incubados con medios condicionados de RSA en fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas de fraguado.

Los medios condicionados de RSA en todas las condiciones no mostraron ninguna inhibición del crecimiento en la línea celular de fibroblastos L929. Por el contrario, estos medios condicionados favorecen el crecimiento celular. Los porcentajes fueron en fresco de -1%, al tiempo de fraguado y a la hora del fraguado de -6%, a las 24 h de -0.2% y finalmente en el medio de 72 horas fue de -1.5%. **(Figura 37).**

En concordancia, los medios condicionados de RSA en todas las condiciones no mostraron ninguna inhibición del crecimiento de FGH. En el caso de los FGH se vieron favorecidos mejor en su crecimiento que los L929. Los porcentajes fueron en fresco de -14%, al tiempo de fraguado -16%, a la hora del fraguado de -17%, a las 24 h de -14% y finalmente en el medio de 72 horas fue de -13%. **(Figura 37).**

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador RSA®.

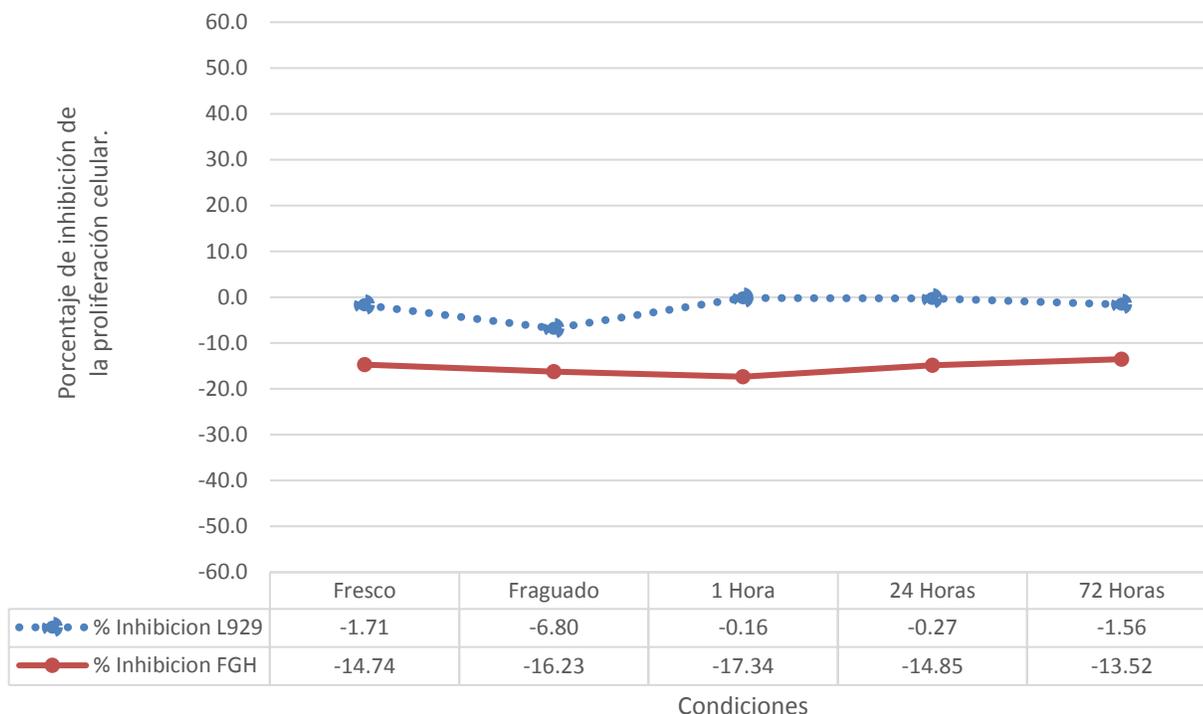


Figura 37. Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador RoekoSealAutomix®. La gráfica muestra los porcentajes de inhibición de la proliferación de fibroblastos de la línea celular L929 y gingivales humanos (FGH) expuestos a medios condicionados del cemento sellador RoekoSealAutomix® en fresco, fraguado y a diferentes tiempos de fraguado.

Nota. Los valores negativos denotan valores mayores que los del grupo tratado solo con medio de cultivo.

Actividad metabólica y generación de nitritos en macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador Sealapex™

Al igual que con los tres cementos selladores antes mencionados, macrófagos de la línea celular RAW fueron incubados con medios condicionados de Sealapex™ en fresco, fraguado, a la 1, 24 y 72 horas de fraguado. Al ser expuestos al medio fresco, los macrófagos presentaron un 86% de actividad metabólica, misma que se mantuvo al tiempo de fraguado (81%). Sin embargo, la actividad metabólica fue disminuyendo conforme al tiempo de fraguado. Para la hora de fraguado la actividad metabólica disminuyó hasta el 63%, luego a un 31% para las 24 h de fraguado y finalmente a un 17% para las 72 h de fraguado. **(Figura 38).**

El decremento entre un punto contiguo y el siguiente no fue significativo, pero si comparamos el primer punto con el ultimo es diferente $p=0.0079$.

La activación de los macrófagos comenzó en 21% al ser expuestos a medio condicionado fresco, la activación se mantuvo entre 5% y 8% en las condiciones subsecuentes. Siendo estas, en fresco, 21%; al tiempo de fraguado, 8%; a la hora del tiempo de fraguado, 6%; a las 24 h, 8% y finalmente a las 72 h, 5%. **(Figura 38).**

Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador Sealapex™

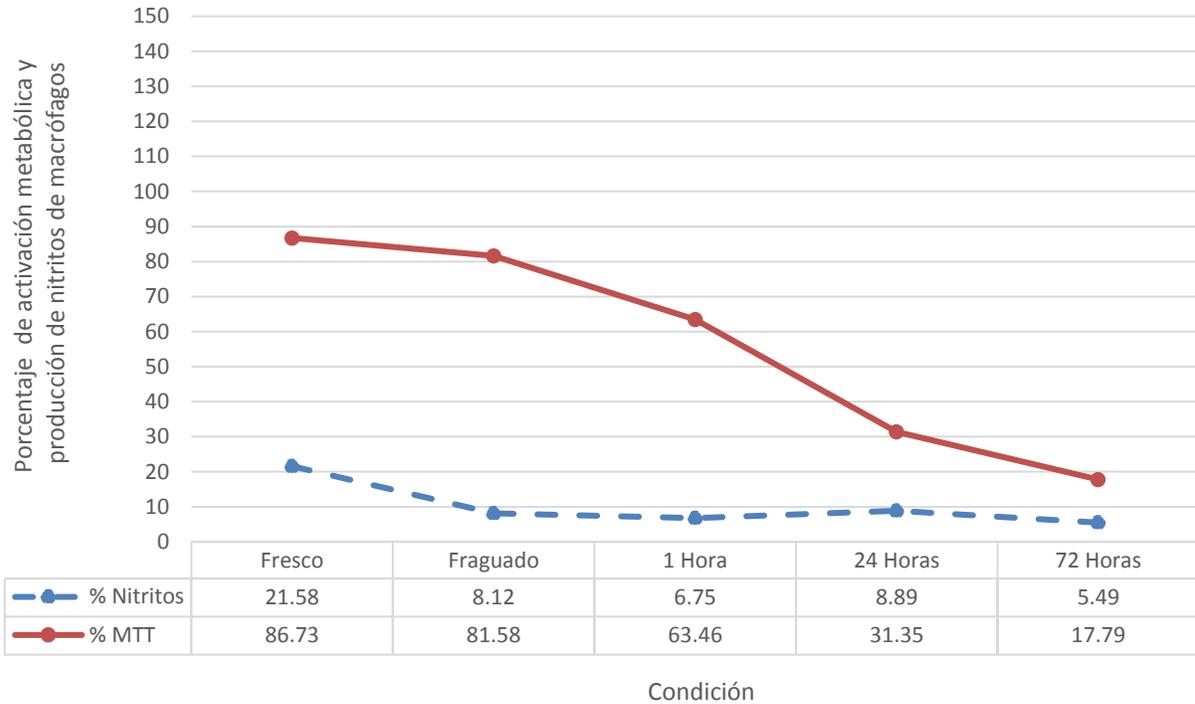


Figura 38. Actividad metabólica y activación de macrófagos RAW incubados con medios condicionados del cemento sellador Sealapex™. Producción de nitritos y actividad metabólica de macrófagos de la línea celular RAW expuestos a medios condicionados de Sealapex™ en fresco y a diferentes tiempos de fraguado. Se realizó un ANOVA, los asteriscos representan un valor de $P < 0.05$ comparando con las condiciones contiguas inmediatas anteriores. $n = 2$.

*

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador Sealapex™

Como en el caso de los otros cementos selladores, fibroblastos L929 y FGH fueron incubados con medios condicionados de Sealapex™ en fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas de fraguado.

Los fibroblastos L929 inhibieron de manera progresiva su crecimiento. El cemento sellador fresco al tiempo de fraguado disminuyó el crecimiento de los fibroblastos en un 5%. Sin embargo, este porcentaje aumentó a la hora del tiempo de fraguado a un 12% ($p=0.0014$) que se duplicó para las 24 h (24%) ($p< 0.0001$) y se mantuvo para las 72h (26%). **(Figura 39)**

En el caso de los FGH, no se observó disminución en el crecimiento al ser expuestos al medio condicionado del cemento sellador en fresco (-3%), ni al tiempo de fraguado (-9%). Sin embargo, para la hora de fraguado el crecimiento se empezó a inhibir en un 4%, que gradualmente empezó a aumentar en los siguientes tiempos, para las 24 horas, la inhibición fue del 46% ($p=0.0006$) y para las 72 horas desciende ligeramente a 43%. **(Figura 39)**

Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador Sealapex™

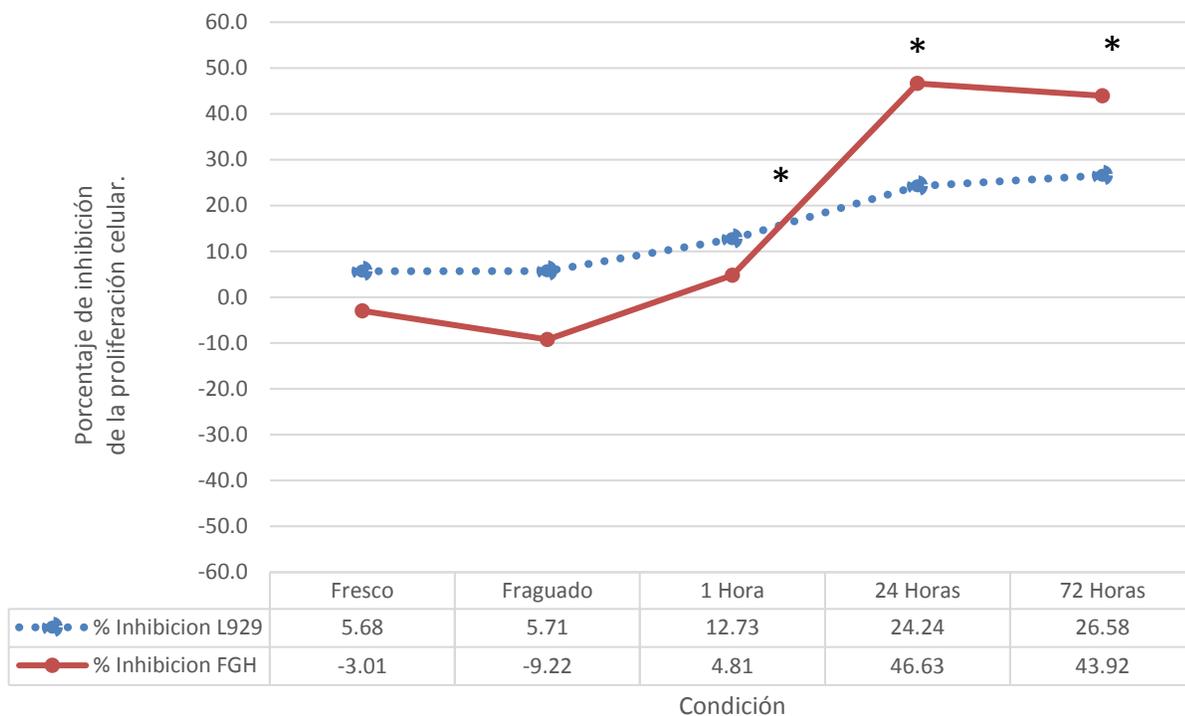


Figura 39. Actividad citotóxica de fibroblastos de la línea celular L929 y de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos incubados con medios condicionados de cemento sellador Sealapex™. La gráfica muestra los porcentajes de inhibición de la proliferación de fibroblastos de la línea celular L929 y gingivales humanos (FGH) expuestos a medios condicionados del cemento sellador Sealapex™ en fresco, fraguado y a diferentes tiempos de fraguado. Se realizó un ANOVA, los asteriscos representan valores de $P < 0.05$ con respecto a las condiciones inmediatas anteriores. $n = 2$.

Nota. Los valores negativos denotan valores mayores que los del grupo tratado solo con medio de cultivo.

16. DISCUSIÓN

En este estudio se realizaron pruebas *in vitro* para medir la respuesta de cuatro cementos selladores AH Plus™, MTA-FILLAPEX®, RSA RoekoSealAutomix® y Sealapex™ y en cinco diferentes condiciones: materiales en fresco, al tiempo de fraguado, a la hora, 24 y 72 horas después del fraguado. Las pruebas realizadas fueron: el ensayo de MTT, para medir la actividad metabólica mitocondrial, el ensayo de Griess, para cuantificar nitritos y para observar la citotoxicidad por el método de sulforrodamina B.

La reacción de Griess es un ensayo que permite cuantificar nitritos generados en sobrenadante de cultivos de la línea de macrófagos murinos que pueden inducir a la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa. Los nitritos son indicadores indirectos de un proceso inflamatorio, de citotoxicidad o de procesos de comunicación celular. En la reacción de MTT, se puede comprobar el grado de actividad metabólica que indica tanto la viabilidad celular o un aumento en el metabolismo de la célula cuando son expuestos a condiciones experimentales extrañas. En el ensayo de sulforrodamina B, la citotoxicidad se fundamenta por la capacidad que tiene el colorante de unirse a los aminoácidos de las proteínas presentes en la membrana de las células que se fijaron en el sustrato del pozo y proliferaron o no en presencia de medios condicionados. Sin embargo, los resultados con valores negativos reflejan que algunos medios condicionados, son capaces de favorecer la proliferación.

Los cementos selladores están en contacto directo a través del periápice del diente con los tejidos periapicales. En estos tejidos, al presentarse un material extraño existe una respuesta inmunológica en la que participan los macrófagos. Por esto, se decidió usar macrófagos de la línea celular RAW para conocer su activación ante los medios condicionados de los cementos selladores endodónticos. Además, la inhibición del crecimiento se realizó en dos tipos de fibroblastos, en una línea celular de fibroblastos gingivales de ratón L929 que es la línea utilizada para realizar este tipo de ensayos, y en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos que son un modelo más cercano a las condiciones reales de los cementos selladores.

La naturaleza química de cada cemento sellador promueve una reacción diferente en los tejidos periapicales después de un tratamiento de conductos radiculares (70). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se propone que cada uno de los cementos selladores, provoca distinto grado de liberación de subproductos, lo que podría causar los cambios en la actividad metabólica y activación de macrófagos, así como en la proliferación de fibroblastos. Cabe destacar que este estudio complementa estudios previos de estos cementos selladores en las mismas condiciones de fresco, fraguado, a la hora, 24 y 72 horas del tiempo de fraguado. (68, 69)

AH-Plus™

El cemento AH Plus™ se compone principalmente de resina, fue el más citotóxico de todos los cementos probados. Esto concuerda con reportes previos. (71-73) Aunque se ha reportado que después de dos semanas y no presenta toxicidad. (74) La toxicidad de este cemento se debe que este tipo de cementos a base de resina liberan formaldehído durante la polimerización.(75) (76) Dado que la resina se encuentra en fase acuosa el monómero pueden difundirse a través de los túbulos dentinarios y afectar estos tejidos. (77)

En otro estudio de Ramos (69) con modelo *in vivo*, de edema en orejas de ratón, donde se midió el grado de inflamación y la producción de mieloperóxidasa, se demostró que el cemento sellador AH-Plus™ fue el único cemento sellador que indujo inflamación cutánea. (69)

En el presente trabajo se observó que el cemento sellador AH-Plus™, activa macrófagos y disminuye la actividad metabólica mitocondrial, esto se infiere por los resultados obtenidos en los experimentos realizados. Se pudo observar que, aunque en un inicio no se afectó la actividad metabólica celular, esta descendió de forma abrupta cuando el cemento sellador fragua y a los diferentes tiempos después de fraguado. Además, en el ensayo de Griess se pudo observar que la producción de nitritos era baja, hasta llegar al medio condicionado de 24 h, donde se elevó de forma brusca y volvió a descender para las 72 h. El aumento en la producción de

nitritos a las 24 h podría deberse a que el medio condicionado acumuló elementos citotóxicos desde la primera hora, y en cuanto entró en contacto con las células, estas detectaron un elemento externo agresivo. Estos resultados sugieren que el cemento sellador AH-Plus™ genera productos citotóxicos (2) o bien que el cemento sellador provoca una reacción exotérmica que induce muerte celular.

En un estudio previo, se evaluó la citotoxicidad de los mismos cementos selladores, revisando la morfología y la reducción de MTT en L929 y FGH. Se demostró que el cemento sellador AH-Plus™ resultó ser el más tóxico. (68)

En el presente trabajo, en las células de la línea L929 y FGH, en un principio el AH-Plus™ no resultó ser citotóxico. Sin embargo, en cuanto el cemento había fraguado, se incrementó la citotoxicidad y se mantuvo así en el resto de los medios condicionados. Este hecho requiere de mayor estudio, se podrían buscar cambios físicos y químicos que sufre el cemento sellador después de mezclado y hasta varias horas después de su fraguado.

MTA-FILLAPEX®

El Mineral Trióxido Agregado (MTA) es un polvo que contiene partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico y óxido de bismuto, además de otros minerales. Cuando el MTA es hidratado se obtiene un gel coloidal con un pH alcalino aproximado de 12.5, que solidifica en menos de 4 horas (78). El cemento MTA Fillapex® contiene un 13.2% de MTA, cantidad suficiente para inducir la biomineralización (72). El MTA Fillapex® muestra citotoxicidad en fresco (79) y a diferentes tiempos (80).

Con respecto al cemento sellador MTA FILLAPEX®, los resultados obtenidos por Ramos(69) indicaron que el reclutamiento de neutrófilos se presentó en el medio de cemento fraguado, desciende a la 1 hora y va en aumento hasta las 72 horas. (69)

El MTA FILLAPEX® tiene un comportamiento en las celular RAW que un inicio, se presenta una buena actividad metabólica, la cual desciende cuando el cemento ha fraguado, y vuelve a incrementarse a la hora. Sin embargo, desciende en los medios

de 24 y 72 horas. Por otra parte, la producción de nitritos prácticamente fue constante en todos los medios condicionados. Estos resultados pueden deberse a que el cemento después de fraguar provoca un cambio del pH del medio condicionado como lo ha referido, lo que explicaría tal respuesta.(3, 16, 24, 49)

Otro estudio mostró que en las líneas L929 y FGH, expuestos a medios condicionados de MTA FILLAPEX® la respuesta de viabilidad fue dependiente del tiempo de fraguado, es decir en un inicio la viabilidad fue de un 50% la cual fue decayendo hasta las 72 horas después de fraguado. (68)

Con respecto a resultados obtenidos en el presente estudio con las células L929 y FGH el comportamiento fue un poco más estable, siendo un porcentaje muy bajo los primeros tres medios y aumentando la citotoxicidad de forma discreta en los medios de 24 y 72 horas. Estos resultados son congruentes con lo obtenidos anteriormente (68), que indica que el cemento de MTA FILLAPEX® podría generar componentes que favorecen la citotoxicidad conforme el cemento fragua. (68)

RoekoSealAutomix®

El cemento Roeko Seal Automix® (RSA) tiene como base el polidimetilxiloxano, una silicona. Este cemento fue el único que no mostró efecto citotóxico alguno. Al contrario, parece proteger a las células. Nuestros resultados coinciden con otros autores donde se muestra que el RSA® sólo fue poco citotóxico o completamente no citotóxico. (81) (82) (83)

En otro estudio con modelo *in vivo*, el cemento sellador RSA solo promueve el reclutamiento de neutrófilos cuando el sellador fragua. (69)

En la actividad de macrófagos RAW al ser expuestos con RSA en condiciones basales se observó que la actividad metabólica era baja y después de estar en

contacto con el cemento fraguado aumentó, inmediatamente volvió a descender ligeramente en el medio de 1 hora y 24 horas, y finalmente volvió a aumentar a las 72 horas. La actividad de nitritos también tuvo ligeros cambios no significativos, teniendo inicialmente un porcentaje bajo de nitritos, que fue en aumento hasta la 1 hora después de fraguado, donde llegó a su pico máximo, después a las 24 horas descendió y volvió a aumentar en las 72 horas de manera discreta. Esto sugiere que la respuesta bifásica se explique por cambios químicos y/o físicos de los cementos selladores en el medio de cultivo.

En lo que respecta a las células de las líneas L929 y FGH ninguna condición fue toxica. Estos resultados podrían indicarnos que los medios condicionados del cemento no inhiben el crecimiento celular. Lo cual coincide con los resultados obtenidos anteriormente donde se reportó que en el cemento de RSA no modificó la respuesta de viabilidad celular. (68)

Sealapex™

El cemento Sealapex™ se compone principalmente de hidróxido de calcio. El hidróxido de calcio se difunde a través de los túbulos dentinarios y puede comunicarse con el ligamento periodontal. (84) Esto puede detener la reabsorción radicular externa y acelerar la curación. (85) El cemento Sealapex™ fue citotóxico a las 24h como se ha reportado anteriormente. (86)

El Sealapex™, aunque no produce una inflamación elevada, su pico de mayor reclutamiento de neutrófilos es en el medio condicionado de cemento fraguado, teniendo después un comportamiento fluctuante, donde desciende 1 hora después y vuelve a aumentar discretamente en las 24 y 72 hrs. (69)

Con el cemento sellador Sealapex™, los resultados obtenidos con la línea celular RAW, mostraron que la actividad metabólica va decayendo en función del tiempo de fraguado. Sin embargo, la concentración de nitritos permaneció prácticamente sin cambios a partir del tiempo de fraguado. Esto sugiere que este componente no

es capaz de estimular los macrófagos para producir nitritos de manera importante.(2)

Así mismo, en trabajos anteriores se observó que, el comportamiento de las líneas celulares L929 y FGH en contacto con Sealapex™, mostraron que el porcentaje de actividad metabólica es bajo con el primer medio condicionado y con el resto de los medios empieza a aumentar discretamente el porcentaje de actividad metabólica, sin llegar a ser mayor que el promedio basal, en ese trabajo se concluyó que el cemento Sealapex era medianamente citotóxico. (68)

En la línea FGH se observó un comportamiento donde en los primeros dos medios no presento citotoxicidad, a la hora presentó un porcentaje discreto y en los medios de 24 y 72 horas se incrementó de manera importante (mayor al 40%). Para el caso del L929 la citotoxicidad en fresco y fraguado fue aproximadamente del 5%, sin embargo, conforme transcurrió el tiempo de fraguado la citotoxicidad fue aumentando solo hasta un 25%.

Estos resultados sugieren que el cemento no presenta citotoxicidad mientras este fresco o apenas empieza a fraguar, probablemente, después de que empieza su reacción en las primeras horas, desprende algún tipo de subproducto, reacción exotérmica o es tóxico para las células en contacto con el mismo. Resultados que no fueron congruentes con los obtenidos anteriormente. (68)

17. CONCLUSIONES

1. Los cementos selladores utilizados en el presente estudio poseen diferente capacidad de activar macrófagos y afectan diferencialmente la proliferación celular.
2. El cemento sellador AH-Plus™ es el más citotóxico a partir del tiempo de fraguado.
3. El cemento sellador MTA FILLAPEX® es tóxico 24 horas después de fraguar.
4. El cemento sellador RSA parece ser el más biocompatible, pues no indujo ninguna actividad citotóxica, pero si activó la funcionalidad de los macrófagos.
5. El Sealapex™ no presenta citotoxicidad mientras esté fresco o apenas empiece a fraguar. Sin embargo, la citotoxicidad se inicia de manera discreta a partir de la primera hora de fraguado.

18. PERSPECTIVAS

Estos resultados plantean la necesidad de hacer otro tipo de experimentos para esclarecer si la muerte celular observada con algunos selladores se da por apoptosis o necrosis.

19. BIBLIOGRAFIA

1. Villegas A, Naranjo E, Gómez D. Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura. *Revista Estomatología*. 2008;16(2):38-44.
2. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod*. 2000;26(8):462-5.
3. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *Aust Endod J*. 2001;27(1):12-21.
4. Yildirim A, Lübbers HT, Yildirim V. Endodontic filling with gutta-percha-requirements, formation and characteristics. *Swiss Dent J*. 2016;126(2):150-1.
5. Friedman CE, Sandrik JL, Heuer MA, Rapp GW. Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials. *J Endod*. 1977;3(8):304-8.
6. Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas. 3ra ed. España: Masson; 2014. 400 p.
7. Corporation K. Gutta Percha 2017 [Available from: <https://www.kerrdental.com/kerr-endodontics/gutta-percha-fill-obturation>].
8. Gómez Montoya PA. Cementos selladores en endodoncia. *Ustasalud Odontología*. 2004;3:100-7.
9. Tunga U, Bodrumlu E. Assessment of the sealing ability of a new root canal obturation material. *J Endod*. 2006;32(9):876-8.
10. Curson I, Kirk EE. An assessment of root canal-sealing cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968;26(2):229-36.
11. Grossman LI. An improved root canal cement. *J Am Dent Assoc*. 1958;56(3):381-5.
12. AZ D. Material de Relleno del Conducto Radicular 2007 [Available from: <http://dentala2z.co.uk/PRE10365/es>].
13. Anusavice KP. Ciencia de los materiales dentales. 11 ed. Madrid, España: Elsevier; 2004.
14. Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers--histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod*. 1997;23(7):428-32.
15. Lopreite GH, Basilaki JM. Endodoncia Criterios técnicos y terapéuticos. 1ra edición ed2016. 396 p.
16. Gunnar Bergenholtz, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Endodoncia. 2da Edicion ed. Mexico, D.F.: El Manual Moderno; 2011. 384 p.
17. Machado MEdL. Endodoncia de la Biología a la Técnica. Colombia2009.
18. Ilson JS, Goldberg F. Endodoncia: Técnica y fundamentos: Editorial Médica Panamericana; 2002.
19. Rao RN. Endodoncia Avanzada. 1ra ed: AMOLCA; 2011. 186-95 p.
20. Cisneros Cabello R, Segura Egea JJ. Reparación postendodoncia con el cemento de Grossman: Presentación de dos casos clínicos. *Endodoncia*. 2004;22(1):9.
21. Farmadental. Medicamentos: Cemento de Grossman: Ultra D SRL; 2017 [Available from: <http://farmadental.com.ar/index.php/productos/404/cemento-de-grossman-detail>].

22. Inc E. Kerr Pulp Canal Sealer, EWT Std: Endo Tech Everything Endo; 2017 [Available from: <http://endo-tech.com/products/kerr-pulp-canal-sealer-ewt-std>.
23. Ação F. Cimento N-Rickert Liquido - 10ml Brasil: Fórmula & Ação; [Available from: <http://www.formulaeacao.com.br/2010/loja-produtos.asp?iID=66>.
24. Hargreaves KM, Berman LH, Rotstein I. Cohen Vías de la pulpa. Undécima Edición ed. España: Elsevier; 2016. 290-6 p.
25. Healthcare S. Eugenol Zinc Oxide Powder U.S.P. U.S.A.: Sultan Healthcar; 2014 [Available from: http://www.sultanhealthcare.com/sw/swchannel/productcatalogcf_v2/internet/model.asp?ProductMasterID=285472&ParentID=213542&SWID=1.
26. Kerr. Tubli-Seal™ Fill / Obturation Zinc Oxide Eugenol Root Canal Sealer U.S.A.: Kerr Corporation; 2017 [Available from: <https://www.kerrdental.com/kerr-endodontics/tubli-seal-zinc-oxide-eugenol-root-canal-sealer>.
27. Septodont. Endomethasone C Cemento endodóntico con eugenol. Francia: SEPTODONT SAS; 2017 [Available from: <http://www.septodont.es/productos/endomethasone-c>.
28. Sleder FS, Ludlow MO, Bohacek JR. Long-term sealing ability of a calcium hydroxide sealer. J Endod. 1991;17(11):541-3.
29. Lioni CB. Agentes selladores. Relación entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad. Electronic Journal of Endodontics Rosario. 2010;02(1):1-24.
30. Cost D. Sealapex Cemento Sellador Radicular 24g. Gandia, Valencia: Dental Cost Deposito Dental; 2010-2017 [Available from: <https://www.dentalcost.es/cementos/2018-sealapex-cemento-sellador-radicular-24gr-kerr-hawe.html>.
31. Dentaltix.com. Apexit Plus Selladores de canales (2x6gr.) Obturación Francia: Dentaltix.com; 2017 [Available from: <https://www.dentaltix.com/ivoclar-vivadent/apexit-plus-selladores-de-canales-2x6gr-obturacion>.
32. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. Br Dent J. 1972;132(4):133-5.
33. Torabinejad M, Walton RE. Endodoncia, Principios y Practica. 4ta ed. España: Elsevier; 2010.
34. Dentaltix. Ketac Cem Aplicap Reposición Cementos Ionómero Vidrio (1x50u.) Obturación Francia: Dentaltix.com; 2017 [Available from: <https://www.dentaltix.com/3mespe/ketac-cem-aplicap-reposicion-cementos-ionomero-vidrio-1x50u-obturacion>.
35. Li Rodríguez JK. Evaluación "in vitro" de la discrepancia marginal y microfiltración de cuatro cementos de resina usados en cementado de coronas de óxido de circonio. Departamento de Estomatología I (Prótesis bucofacial). 2013; Máster de ciencias odontológicas:1-99.
36. Racciatti G. Agentes selladores en endodoncia. 2000;1(3):1-19.
37. Cost D. AH-26 Sellador Sin Plata Kit 8Gr.+10Gr: Dental Cost Deposito Dental; 2010-2017 [
38. Sky D. AH Plus U.S.A: Dental Sky Wholesaler Ltd; 2017 [Available from: <https://www.dentalsky.com/ah-plus-dentsply.html>.
39. Zielinski TM, Baumgartner JC, Marshall JG. An evaluation of Guttaflow and gutta-percha in the filling of lateral grooves and depressions. J Endod. 2008;34(3):295-8.

40. MedTechService. Endofil.Switzerland. PD Rusia: MEDTECHSERVICE We Help You Treat Better; 2017 [Available from: <http://stomshop.am/product/endofil-switzerland-pd/>].
41. GmbH DV. RoekoSeal Automix Standardset Alemania: Dental VERSENDER GmbH; 2017 [Available from: <https://www.dentalversender.de/Praxis/Medikamente/Wurzelbehandlung-Wurzelfuellung/RoekoSeal-Automix-Standardset.html>].
42. Accesia. Gutta Flow 2 Refill 5ml Suecia: Accesia; 2017 [Available from: <https://webshop.accessia.se/en/product/gutta-flow-2-refill-5ml-2>].
43. Urgilés Rojas LA. Materiales Bioceramicos en endodoncia. Ecuador: Universidad Cuenca Facultad de Odontología; 2016.
44. Lima Machado MEd. Endodoncia Ciencia y tecnología. Venezuela: Amolca; 2016. 388 p.
45. iQ D. 5 tips for using bioceramics in the general dental practice U.S.A.: Dentistry iQ; 2013 [Available from: <http://www.dentistryiq.com/articles/2013/03/5-tips-for-bioceramics-in-general-practice.html>].
46. Sciences RRJoD. SmartPasteBio U.S.A.: Research & Reviews: Journal of Dental Sciences; 2017 [Available from: <https://www.rroj.com/open-access/water-expandable-endodontic-obturation-pointa-review-.php?aid=86076>].
47. Schein H. Iroot SP China: Henry Schein; 2014 [Available from: <http://www.henryschein.com.cn/page.aspx?s=cn&cid=310&id=1>].
48. Septodont. Biodentine Bruselas: SEPTODONT NV-SA; 2015 [Available from: <http://www.septodont-nl.be/>].
49. Chaple Gil AM, Herrero Herrera L. Generalidades del agregado de trióxido mineral (MTA) y su aplicación en odontología: Revisión de la literatura. Acta Odontológica Venezolana. 2007;45(3):1-8.
50. DIBATEB. MTA Fillapex Teherán, Iran: DIBATEB; 2017 [Available from: http://www.dibateb.com/media_category/product/page/10/].
51. S.A. JN. Endo - Sellador endodontico C.P.M. -SEALER Buenos Aires, Argentina: Juan Novacek S.A; 2017 [Available from: <http://www.novacekdental.com.ar/producto/endo-sellador-endodontico-cpm-sealer/96>].
52. Centelles JJ. Óxido nítrico Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. 2004;23(11):96-102.
53. Gorocica Rosete P. , Chávez Sánchez R. , Lascurain Ledesma R. , Espinosa Mancilla B. , E. ZG. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 1999;12(4):300 - 4.
54. Alfieri AB. Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Vitae: Academia Biomédica Digital. 2003;16:1 - 57.
55. International, Standardization Of. UNE-EN ISO 10993-1:2010. 2010.
56. DBpedia-Latinoamérica. Prueba de Griess [
57. Herráez A. Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT Biomodel2016 [
58. Castro de Pardo Cd. Practica IV.2 Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos fracciones o sustancias, utilizando la prueba de

MTT. Bogotá, Colombia. : Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín.; 2006.

59. Escobar M. L. , Rivera A. , A. AGF. Estudio comparativo de los metodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*. 2010;17(1):67 - 74.

60. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107-12.

61. González Mañas JM. Introducción al cultivo celular Primer curso del grado de bioquímica y biología molecular 2015 [

62. Cultivos celulares [Internet]. www.cultek.com. 2007.

63. García Cebrero SN. Efecto proliferativo y citotóxico de la Ciclosporina A sobre fibroblastos gingivales humanos. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.

64. ATCC. NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™): The essentials of life science research; 2017 [Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-1.aspx>].

65. Científica CCdl. Ficha de Lineas Celular L929 Granda, España: Universidad de Granda; 2017 [Available from: <http://cic.ugr.es/servicios-y-unidades/ficha-Lineas-Celulares.php?codigo=45>].

66. ATCC. RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) ATCC Reference Material™ ATCC, The Essential of life science research; 2017 [Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-1.aspx>].

67. Científica Cdl. Ficha de Linea Celular RAW 264.7 CIC. Centro de Instrumentación Científica: Universidad de Granada; 2017 [Available from: <http://cic.ugr.es/servicios-y-unidades/ficha-Lineas-Celulares.php?codigo=82>].

68. Martínez Vaquero R, Uribe-Querol E, Chávez Bolado E, Rosales C. Tesis "Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de cuatro cementos endodóncicos sobre fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos de ratón de la línea celular L929". Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.

69. Ramos Tapia M. Tesis "Efectos inflamatorios de cuatro selladores endodóncicos en un modelo *In vivo*". Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.

70. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2003;36(8):527-32.

71. Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J*. 2012;45(1):49-56.

72. Esra Pamukçu G, Mehmet Emir Y, Mehmet Baybora K, Hakkı S, Fikrettin Ş, Gündüz B. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *Journal of Applied Oral Science*. 2013;21(4).

73. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *J Endod*. 2006;32(7):656-62.

74. Silva EJ, Santos CC, Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(1):43-7.
75. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(2):221-5.
76. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod.* 2000;26(4):228-9.
77. Donnelly A, Sword J, Nishitani Y, Yoshiyama M, Agee K, Tay FR, et al. Water sorption and solubility of methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod.* 2007;33(8):990-4.
78. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21(7):349-53.
79. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013;39(2):274-7.
80. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013;24(2):111-6.
81. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007;40(5):329-37.
82. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2011;44(7):626-34.
83. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2008;41(1):72-7.
84. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* 2009;35(4):475-80.
85. Tronstad L. Root resorption--etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol.* 1988;4(6):241-52.
86. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012;45(1):12-8.