



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Propiedades físico-químicas, adaptación interfacial, biocompatibilidad y citotoxicidad de algunos cementos endodóncicos

Piedad Soldado Cañadas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

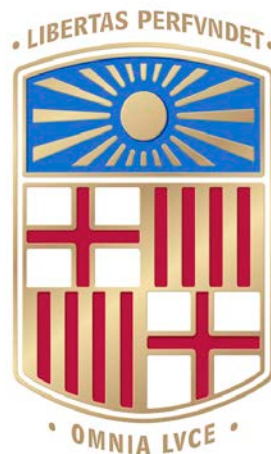
**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA  
SALUD-ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ODONTOESTOMATOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Propiedades físico-químicas, adaptación interfacial,  
biocompatibilidad y citotoxicidad de algunos cementos  
endodóncicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Piedad Soldado Cañadas

Directora

Dra. Esther María Berástegui Jimeno

Barcelona, 2018



Memoria presentada para optar al GRADO DE  
DOCTORA en ODONTOLOGÍA POR LA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA presentada por  
PIEDAD SOLDADO CAÑADAS

Directora Profesora

Dra. ESTHER MARÍA BERÁSTEGUI JIMENO

Profesora titular del departamento de Odontoestomatología de  
la Facultad de Medicina y ciencias de la salud-Odontología

UNIVERSITAT DE BARCELONA

La doctoranda Piedad Soldado Cañadas garantiza, al presentar esta Tesis Doctoral, titulada “Propiedades físico-químicas, adaptación interfacial, biocompatibilidad y citotoxicidad de algunos cementos endodóncicos”, que el trabajo ha sido realizado por la misma hasta donde su conocimiento alcanza. En la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados cuando se han utilizado sus resultados y publicaciones.

En Barcelona, a 19 de Junio de 2018

Fdo. Piedad Soldado Cañadas



De acuerdo con el programa de doctorado correspondiente al Real Decreto 778/1998, de 30 de abril, la abajo firmante afirma:

Que la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: "Propiedades físico-químicas, adaptación interfacial, biocompatibilidad y citotoxicidad de algunos cementos endodóncicos", presentada por Piedad Soldado Cañadas, ha sido realizada bajo mi dirección y la memoria reúne las condiciones académicas necesarias para optar al grado de Doctora, si así lo consideran las Comisiones del programa y la de Doctorado designadas por la Universitat de Barcelona.

En Barcelona, a 19 de Junio de 2018

Fdo. Profa. Dra. Esther María Berástegui Jimeno.

Departamento de Odontoestomatología. Universitat de Barcelona.



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, pilares fundamentales de mi vida, quienes han luchado y se han sacrificado desde siempre para que tuviera una educación y una formación que no pudieron tener ellos. Sin vosotros esto no hubiera sido posible. En especial a mi madre, por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue y que en esta vida nadie regala nada.

A la directora de esta tesis, la Profesora Dra. Esther Berástegui Jimeno, Profesora Titular de Endodoncia de la Universidad de Barcelona, gracias a quien he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio parecía tarea titánica e interminable. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda. Le estaré eternamente agradecida.

A todos mis compañeros de la Universidad de Sao Paulo en Brasil por sus contribuciones a esta tesis. En especial a la Dra. Lea Assed Bezerra Silva quien me ha apoyado, ayudado y aportado infinidad de recomendaciones y con quien he tenido el placer de compartir y aprender tantas cosas.

A las Dras. Patricia Gatón Hernández y Esther Ruiz de Castañeda por brindarme sus conocimientos, apoyo y amistad.

A mi gran amigo y compañero Dr. Jordi López Roura por ser mi “Padre Endodónico”, por aportarme tantas cosas tanto en el terreno laboral como en el personal, por creer en mi capacidad desde el primer día, por ser el mejor ejemplo de constancia, fortaleza y responsabilidad, por sus sabios consejos y por ser tan importante en mi vida.



A los compañeros profesores asociados de Endodoncia y de Operatoria dental de la Facultad de Odontología de la Universitat de Barcelona por su apoyo y solidaridad.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos últimos años han estado apoyándome y lograron que este sueño se hiciera realidad.

A mis hermanos, mis sobrinos y todos mis familiares, que de alguna manera u otra celebrarán mi éxito. En especial a mi abuela Maria a la que quiero tanto y con quien he compartido tantos grandes momentos.

Por último agradecerle a la persona más importante de mi vida, S. M. C., que haya estado siempre a mi lado, apoyándome y enseñándome el buen camino. Gracias por levantarme siempre que me he caído y por entenderme, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor. Gracias por entrar en mi vida porque contigo empezó todo. Gracias por existir.

# ÍNDICE



ÍNDICE .....	9
1. RESUMEN DE LA UNIDAD TEMÁTICA .....	13
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA / ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	17
2.1.    Propiedades físico-químicas y adaptación interfacial de los cementos endodóncicos .....	19
2.2.    Clasificación de los cementos endodóncicos .....	22
2.3.    Evolución del Sealapex .....	28
2.4.    Sistema de obturación Resilon .....	30
2.5.    Citotoxicidad de los materiales de obturación endodóncicos.....	46
2.6.    Otras propiedades del Sistema Resilon .....	57
2.7.    Prototipo cemento endodóncico RealSeal XT .....	62
3. HIPÓTESIS .....	67
4. OBJETIVOS .....	71
5. PUBLICACIONES .....	77
5.1.    Publicación núm. 1 .....	79
“ <i>Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers</i> ”	
Artículo publicado en <i>Brazilian Dental Journal</i> . 2014; 25: 435-41.	
5.2.    Publicación núm. 2 .....	89
“ <i>Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo</i> ”	
Artículo publicado en <i>Journal of Endodontics</i> . 2014; 40: 1424-8.	

5.3.	Publicación núm. 3 .....	97
	<b><i>“Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue”</i></b>	
	Artículo publicado en <i>Clinical Oral Investigations</i> . 2017; 21: 2851-6.	
6.	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
6.1.	Publicación núm. 1 .....	113
6.2.	Publicación núm. 2 .....	118
6.3.	Publicación núm. 3 .....	121
7.	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
7.1.	Publicación núm. 1 .....	133
7.2.	Publicación núm. 2 .....	133
7.3.	Publicación núm. 3 .....	134
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>135</b>

# **1. RESUMEN DE LA UNIDAD TEMÁTICA**



## 1. RESUMEN DE LA UNIDAD TEMÁTICA

**Introducción:** La unidad de Endodoncia del departamento de Odontología de la Universitat de Barcelona formó equipo de investigación en el 2014, con el departamento de Odontología Pediátrica de la Universidad de Sao Paulo (Ribeirao Preto, Brasil) gracias a un convenio interno. Los trabajos publicados que forman la parte experimental se han ido sucediendo en el tiempo desde la primera publicación en 2014 hasta la más reciente en 2017. Los 3 trabajos están publicados en revistas con factor de impacto del ámbito de la Odontología. Presentamos esta Tesis Doctoral en formato de compendio de publicaciones dentro de la misma unidad temática.

**Objetivos:** Evaluar las propiedades físico-químicas y la adaptación interfacial de los siguientes cementos endodóncicos: Endo CPM Sealer, Activ GP, Sealapex y AH Plus. Cuantificar in vivo la respuesta de los tejidos apicales y periapicales de dientes de perro con vitalidad pulpar después de la obturación del conducto radicular con RealSeal XT y Sealapex Xpress. Estudiar la citotoxicidad in vitro, en cultivos celulares de RealSeal XT y Sealapex Xpress. Considerar la biocompatibilidad in vivo, en tejido subcutáneo de ratones, de RealSeal XT y Sealapex Xpress.

**Material y métodos:** Para evaluar las propiedades físico-químicas y la adaptación interfacial se realizaron los siguientes análisis: radiopacidad, variación de pH y solubilidad usando muestras de cada material y microscopía electrónica de barrido en conductos de incisivos bovinos obturados para evaluar la adaptación interfacial. Los datos se analizaron mediante pruebas paramétricas y no paramétricas ( $\alpha=0,05$ ). Para evaluar la respuesta apical de Sealapex Xpress y RealSeal XT se utilizaron 38 conductos radiculares de premolares de perros con pulpa vital. Las secciones se evaluaron mediante inmunohistoquímica para la identificación de marcadores de mineralización (osteopontina, fosfatasa alcalina y RUNX2). Los datos se analizaron mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ). La citotoxicidad de Sealapex Xpress y RealSeal XT se evaluó mediante la viabilidad celular usando el ensayo MTT (one-way ANOVA), prueba de azul de tripano (Mann-Whitney) y apoptosis celular mediante citómetro de flujo. Para el estudio subcutáneo, se implantaron tubos de polietileno rellenos de cementos en 70 ratones BALB/c. Se evaluaron la proliferación y el edema angioblástico (prueba exacta de Fisher), además de la medición del espesor ( $\mu\text{m}$ ) del tejido granulomatoso reaccionario y se realizó recuento de neutrófilos (Kruskal-Wallis y Dunn's post test; Mann-Whitney) ( $\alpha=0,05$ ).

**Resultados:** La radiopacidad de todos los cementos endodóncicos evaluados estaban de acuerdo con los requisitos de ANSI / ADA. Endo-CPM Sealer presentó los valores más bajos de radiopacidad y AH Plus fue el cemento más radiopaco ( $p=0,0001$ ). A excepción de Activ GP, que mostró valor de pH ácido, todos los demás cementos tenían una naturaleza química básica y liberaban iones hidroxilo. Con respecto a la solubilidad, todos los materiales cumplieron con las recomendaciones ANSI / ADA, sin diferencias estadísticamente significativas entre los cementos endodóncicos ( $p=0,0834$ ). AH Plus presentó la mejor adaptación a las paredes del conducto en el tercio medio ( $p=0,0023$ ) y apical ( $p=0,0012$ ), mientras que los cementos Activ GP y Endo-CPM Sealer tuvieron una adaptación pobre a las paredes del conducto. Se observó un sellado biológico completo en el 50% y 22,7% de las muestras de los grupos Sealapex Xpress / gutapercha y RealSeal XT / Resilon, respectivamente. Se observó sellado biológico parcial en 25% y 54,6% y ausencia de sellado en 25% y 22,7% de las muestras de los grupos Sealapex Xpress / gutapercha y RealSeal XT / Resilon, respectivamente. El análisis de células apoptóticas mostró un efecto directo dependiente de la dosis. En cuanto a la proliferación angioblástica y el edema, se observaron diferencias entre los cementos a los 7 y a los 63 días ( $p<0,05$ ). Ambos cementos endodóncicos estimularon respuestas tisulares favorables.

**Conclusiones:** Todos los cementos endodóncicos, a excepción de Activ GP, fueron alcalinos y todos cumplían con los requisitos ANSI / ADA de radiopacidad y solubilidad. La adaptación interfacial a las paredes del conducto radicular bovino del AH Plus fue superior a los demás. Sealapex Xpress y RealSeal XT mostraron biocompatibilidad tisular in vivo y permitieron el sellado del foramen apical mediante la deposición de tejido mineralizado. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT mostraron un efecto tóxico dosis-dependiente. El cemento Sealapex Xpress fue menos citotóxico y más biocompatible que RealSeal XT.





## **2. REVISIÓN DE LA LITERATURA/ ESTADO DE LA CUESTIÓN**



## 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA / ESTADO DE LA CUESTIÓN

### 2.1 Propiedades físico-químicas y adaptación interfacial de los cementos endodóncicos

Podría definirse la obturación de conductos en endodoncia como el reemplazo del contenido del sistema del conductos radiculares y del espacio creado por la preparación químico-mecánica por un material que lo selle de forma permanente, tridimensionalmente y de forma estable, cerrando toda comunicación con el periodonto apical. El objetivo de la obturación es brindar una barrera hermética a la penetración microbiana y a los fluidos tisulares.

El uso de un cemento endodónico para sellar el sistema de conductos radiculares es esencial para el éxito del proceso de obturación. No solo ayuda a lograr el sellado tridimensional sino que también sirve para rellenar las irregularidades del conducto y las pequeñas discrepancias entre la pared dentinaria y el material sólido de obturación. También tiene cierto efecto lubricante y ayuda al asentamiento del material sólido de obturación durante la condensación. Un buen cemento endodónico debe ser biocompatible y bien tolerado por los tejidos perirradiculares. Todos los cementos endodónicos recién mezclados presentan cierto grado de toxicidad, que se reduce en gran medida durante el fraguado. Todos son más o menos reabsorbibles cuando se exponen a los tejidos y a los líquidos tisulares (1).

Los materiales utilizados para el sellado del sistema de conductos deberían mostrar ciertas características que permitieran una colocación predecible en el interior de los conductos radiculares además de prevenir y resolver patologías en endodoncia. Así, para

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

poder ser considerados materiales ideales de obturación en endodoncia, deberían cumplir los siguientes requisitos ya descritos por Grossman (2):

- Fácil manipulación y colocación en el sistema de conductos.
- Tiempo de fraguado adecuado: no demasiado corto ya que no permitiría modificar su colocación si fuese necesario durante la obturación de conductos y tampoco un tiempo demasiado prolongado ya que un cemento no fraguado tiene una acción irritante mayor.
- Buena estabilidad dimensional, impermeabilidad y adherencia para conseguir un buen sellado de todo el sistema de conductos: debe llenar de forma estable y permanente los espacios entre el material de relleno principal y las paredes dentinarias y ser resistente a la humedad. Además debe tener adherencia a las paredes del conducto y/o que se adapte a su forma.
- Adecuada fluidez para que pueda ocupar los espacios de la anatomía propia de los conductos.
- Radiopacidad adecuada para tener un control radiográfico de la obturación. Pero no demasiado intensa ya que podría enmascarar defectos de la obturación.
- No alterar el color del diente.
- Acción antibacteriana.
- Posibilidad de removerse en parte o por completo: en el caso de querer colocar algún elemento de retención intrarradicular o bien en el caso de necesidad de retratamiento.
- Biocompatibilidad: la relación del material con el tejido periodontal debe ser óptima y lo menos irritante posible.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Estos factores influirán directamente en la calidad de la obturación final por lo que será necesario analizar las propiedades de los cementos endodóncicos sometiéndolos a unos test físicos anticipándonos de esta forma al comportamiento clínico. Para poder comparar los resultados, también es necesario que estos test sean llevados a cabo siguiendo las recomendaciones de la American National Standards Institute / American Dental Association. Las especificaciones de la American National Standards Institute / American Dental Association (ANSA / ADA) para los cementos endodóncicos recomienda una solubilidad menor del 3% y una radiopacidad de al menos 3 mm Al (ANSI/ADA's specifications 57) (3).

Un pH alcalino conduce a unos efectos bioquímicos que culminan en la aceleración del proceso reparativo (4) además de tener un efecto antibacteriano. Es la presencia de los iones hidroxilo lo que hace que la solución se vuelva alcalina. Este incremento de pH es el motivo por el cual el material será bactericida consiguiendo además la inhibición de la actividad osteoclástica. De acuerdo con Tronstad et al. (5) el mecanismo de acción de los cementos a base de óxido de calcio o hidróxido de calcio tiene una asociación directa con su capacidad de disociación en iones calcio e hidroxilo, resultando en un aumento del pH local que produce un ambiente alcalino por la difusión de estos iones hidroxilo a través de los túbulos dentinarios.

Uno de los factores relacionados con el éxito a largo plazo del tratamiento endodóncico es el sellado tridimensional del sistema de conductos y la realización de una restauración apropiada que tendrá el objetivo de evitar la filtración coronal proporcionando función y estética al diente. Este sellado apico-coronal permitirá la reparación periapical y evitará la re-infección (6). Sería deseable que los cementos endodóncicos ayudaran a que

hubiera adhesión entre la gutapercha y las paredes del conducto radicular, evitando la aparición de huecos entre cemento y dentina además de proporcionar una adaptación de alta calidad entre las diferentes fases (7). De acuerdo con Balguerie et al. (8), la microscopía electrónica de barrido con secciones longitudinales se puede utilizar para evaluar la interfase cemento / dentina.

Así, el análisis mediante SEM (Scanning Electron Microscopic) parece ser un método eficiente y aceptable para examinar características como sería la adaptación de los materiales de obturación endodóncicos a la superficie dentinaria. Muchas publicaciones han discutido sobre la adaptación marginal de materiales usando el análisis SEM para poder observar la calidad de sellado del conducto (9-12), pudiendo ser la ausencia de este sellado la causa del fracaso endodóncico.

### **2.2 Clasificación de los cementos endodóncicos**

Los cementos endodóncicos pueden clasificarse según su composición química. Actualmente podemos encontrar cementos a base de hidróxido de calcio, cementos a base de óxido de zinc-eugenol, cementos a base de siliconas, cementos a base de resinas poliméricas, cementos a base de ionómero de vidrio (13) o cementos a base silicatos dicálcicos, estos últimos principalmente derivados del agregado trióxido mineral (MTA) (14). El MTA es un biomaterial actualmente muy utilizado en odontología que incluye minerales a base de calcio entre sus componentes principales. Después del fraguado, el óxido de calcio que contiene este material reacciona con los fluidos tisulares para formar hidróxido de calcio (15). Sin embargo, el MTA no tiene las características adecuadas para poder ser utilizado como cemento endodóncico ya que presenta una muy

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

baja fluidez, una consistencia inadecuada, un tiempo de trabajo corto y un tiempo de fraguado prolongado (16).

Endo-CPM Sealer (EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina) (Fig. 1) fue desarrollado con el objetivo de superar y solventar las limitaciones del MTA, tales como las inadecuadas características de manipulación y el tiempo de fraguado prolongado (16), permitiendo así su uso como cemento endodónico.

Este material tiene una composición química similar a la del MTA pero su diferencia más significativa es la presencia de una gran cantidad de carbonato de calcio, que tiende a aumentar la liberación de iones de calcio, y la presencia de cloruro de calcio que acelera el fraguado. Torabinejad et al. (17) demostraron que las principales moléculas presentes en el MTA son los iones de calcio y fósforo, los cuales proporcionan una



Fig. 1. Fotografía del cemento Endo CPM Sealer.

excelente biocompatibilidad cuando están en contacto con células y tejidos. Desde 1885 que en la construcción civil se está utilizando el cloruro de calcio como acelerador de fraguado en el cemento Pórtland; esta combinación proporciona mayor resistencia a este cemento de construcción y lo convierte en un cemento mejorado, proporcionándole al



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

mismo ventajas como la aceleración del tiempo de endurecimiento, mejora de la resistencia, reduce el coeficiente de permeabilidad y la formación de fracturas. La similitud del MTA con el cemento Pórtland se informó en el año 2000 por Estrela et al. (18) que compararon el MTA blanco con el cemento Pórtland blanco y mostraron que los dos tipos de cemento tenían elementos constitutivos similares, excepto el óxido de bismuto en el MTA. Otros estudios obtuvieron resultados similares al comparar MTA con cemento Pórtland (19,20). Tanto el MTA como el cemento Pórtland son biocompatibles (21) y alcalinos (22). En cambio, otros estudios recientes han demostrado que los irrigantes habitualmente utilizados en endodoncia podrían influir más en algunas propiedades como son la solubilidad o la rugosidad en el cemento Pórtland en comparación al MTA (23-25).

Endo-CPM Sealer también ofrece buenas propiedades de sellado, adhesión a las paredes dentinarias del conducto radicular, actividad antimicrobiana, fluidez adecuada y biocompatibilidad (26-28). La proporción exacta de sus componentes no está disponible; lo único que se sabe es que está compuesto por cemento Pórtland, carbonato de calcio, sulfato de bario y cloruro de calcio para reducir el tiempo de fraguado y mejorar las propiedades de manejo y sellado (27).

La recomendación de uso de cementos endodóncicos a base de ionómero de vidrio se basa en la capacidad de estos materiales de adherirse a la dentina, a su liberación de flúor, a su biocompatibilidad y a su actividad antimicrobiana.

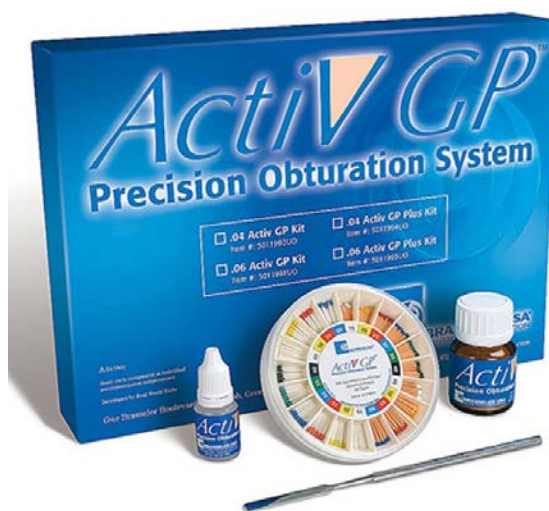


Fig. 2. Fotografía del sistema de obturación Activ GP.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

El sistema de obturación Activ GP (Brasseler EE. UU., Savannah, GA, EE. UU.) (Fig. 2) consta de un cemento a base de ionómero de vidrio y de conos de gutapercha recubiertos con ionómero de vidrio (29). Según el fabricante, Activ GP tiene características de manipulación, radiopacidad, tiempo de trabajo y capacidad de sellado mejores en comparación con otros cementos endodóncicos a base de ionómero de vidrio previos y esto es debido a su mayor fluidez y a su ligera expansión durante el fraguado (30). Se propone Activ GP como cemento endodóncico principalmente por su posible capacidad de proveer adhesión entre el material de relleno y las paredes del conducto radicular. Es un cemento que ya ha sido evaluado en términos de citotoxicidad (31), microfiltración (26,30) y algunas propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, la calidad de estas propiedades está aun en discusión y se requieren estudios adicionales para complementar la información disponible y para evaluar otras características aún no estudiadas.

Sealapex (SybronEndo, Orange, California, EE. UU.) (Fig. 3) es un cemento endodóncico a base de hidróxido de calcio que tiene buenas propiedades biológicas (32) y capacidad de sellado apical (26). El Sealapex es un cemento endodóncico con un tiempo de trabajo y endurecimiento muy prolongado que endurece en el conducto gracias a la



Fig. 3. Fotografía del cemento Sealapex.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

presencia de humedad (fragua en 2-3 semanas con una humedad relativa del 100% y no fragua en un ambiente seco) (33-35). Su plasticidad y fluidez son adecuadas mientras que su radiopacidad es escasa. Tiene alta solubilidad y, por lo tanto, poca estabilidad. Por contra, esta elevada solubilidad es la que le permite liberar el hidróxido de calcio en el medio en el que se encuentra. El fabricante ha modificado su formulación al agregar trióxido de bismuto para mejorar su radiopacidad y aumentar su vida útil, por lo que se requieren nuevos estudios para evaluar sus propiedades.

AH Plus (De Trey-Dentsply, Konstanz, Alemania) (Fig. 4) es un cemento endodóncico a base de resina epoxi que contiene hidróxido de calcio y que se caracteriza por presentar baja solubilidad y desintegración, radiopacidad adecuada, adhesión a la dentina radicular, actividad antimicrobiana y propiedades biológicas adecuadas (36,37).

Los cementos basados en resinas epóxicas fueron introducidos en endodoncia por Schroeder (38) y han ido evolucionando hasta que fue lanzado al mercado el AH Plus convirtiéndose éste en el cemento en endodoncia de referencia en la actualidad. En su composición destacan los siguientes componentes: resina epoxi bisfenol-A, resina epoxi bisfenol-F, tungstenato de calcio, óxido de zirconio, aerosil, óxido de hierro/amina



Fig. 4. Fotografía del cemento AH Plus.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

adamantada, NN-dibencil-5oxanonano-diamina-1,9, TDC-diamina y aceite de silicona, tratándose de una versión pasta / pasta mejorada del clásico cemento AH 26 (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany). Según la casa comercial, el AH Plus ofrece mejor biocompatibilidad, mejor radiopacidad, estabilidad de color y es más fácil de eliminar que el cemento AH 26. Su manipulación también es más fácil y rápida. Es químicamente inerte tras su fraguado. Posee una fluidez adecuada con baja contracción y solubilidad lo que asegura un buen sellado. Un factor importante es la radiopacidad, que supera incluso a la de su predecesor AH 26. Puede usarse con todas las técnicas conocidas de obturación, incluso con gutapercha caliente.

Así, este cemento muestra numerosas propiedades físico-químicas satisfactorias como son baja solubilidad y degradación (13,39-41), radiopacidad adecuada (13,42-44), adhesión a la dentina radicular (45) y expansión (13,46), además de acción antimicrobiana y propiedades biológicas adecuadas (37,47), destruyendo o neutralizando los microorganismos y sus subproductos e induciendo así la neoformación de cemento (48). El hecho de que sea un cemento endodóncico con una óptima fluidez y con una adecuada capacidad antimicrobiana ayudaría a la eliminación de los microorganismos situados en algunas áreas más localizadas del sistema radicular (49).

Puesto que es un tipo de cemento endodóncico que cumple con la mayoría de los postulados de Grossman (2), el AH Plus actualmente es el cemento más frecuentemente usado como material de referencia en investigación.

### 2.3 Evolución del Sealapex

Una respuesta biológica ideal se correspondería a un sellado apical completo del foramen apical mediante la aposición de tejido mineralizado (sellado biológico); la obtención de este sellado biológico tras el tratamiento endodóncico será crucial para lograr el éxito (15,50-52). Este proceso está condicionado por la ejecución correcta de todas las fases del tratamiento endodóncico, así como por factores relacionados con estas fases como serían el límite apical de la instrumentación, el límite apical de la obturación y las características del material de obturación, ya que este último estará en contacto directo con los tejidos conectivos apicales y periapicales (15,53). Se ha demostrado que muchos cementos endodóncicos son irritantes para los tejidos apicales y periapicales debido a su toxicidad y a menudo se observa una inflamación de magnitud variable en el área adyacente a estos materiales (54,55). El potencial irritante de los cementos añadido a la respuesta inflamatoria existente del proceso patológico y a la agresión causada por las fases operativas del tratamiento endodóncico podría incrementar el daño de los tejidos periapicales a diversos niveles. En este caso, en lugar de cumplir con su papel de defensa y ayudar en la reparación de tejidos, esta reacción inflamatoria adicional podría actuar inhibiendo o retrasando el proceso de curación, dificultando el sellado apical biológico.

A la luz de estas observaciones, en las últimas décadas se han estado estudiando cementos endodóncicos con diferentes formulaciones, destacándose aquellos a base de hidróxido de calcio (15) ya que presentan una serie de propiedades favorables como son: compatibilidad con los tejidos (56,57), efecto antibacteriano (58) y propiedades antiexudativas (59), capacidad de creación de condiciones favorables para la formación

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

de tejido mineralizado (53,60-62), capacidad de disolución de tejido necrótico (63) y acción hidrolítica contra endotoxinas bacterianas (64,65).

El cemento a base de hidróxido de calcio Sealapex Xpress lanzado al mercado por SybroEndo (Orange CA, EE.UU.) (Fig. 5) es una evolución del conocido cemento Sealapex ya mejorado en cuanto a su composición respecto a la versión original al agregar trióxido de bismuto para mejorar su radiopacidad y aumentar su vida útil. Esta versión mejorada ya fue testada en cuanto a algunas propiedades físico-químicas y en cuanto a su adaptación a las paredes del conducto en la publicación del Brazilian Dental Journal (66). Sealapex Xpress está disponible en un sistema de jeringa base / catalizador de auto-mezcla con el objetivo de simplificar la manipulación y ofrecer una proporción de 1:1 más exacta y sin necesidad de mezclar manualmente. Se caracteriza por ser un material sin eugenol y con un pH alto. Así como las propiedades biológicas de la formulación original del cemento endodóncico Sealapex han sido investigadas extensamente (50,53,67-70), ningún estudio ha evaluado aún la respuesta *in vivo* de los tejidos periapicales de su nueva formulación.



Fig. 5. Fotografía del cemento Sealapex Xpress.

### 2.4 Sistema de obturación Resilon

El gran desarrollo de los materiales de restauración a base de resinas compuestas hizo que se introdujeran en el sector dental a mediados de la década de los 60 como una gran alternativa viable a la amalgama y a otros materiales. Sin embargo, la dificultad de su manejo y otros inconvenientes que presentaban estos materiales dejaron en evidencia que faltarían algunos años para que los composites estuvieran presentes en la clínica diaria. Con el tiempo, el nivel de entrenamiento de los dentistas y el conocimiento de las propiedades del material fueron en aumento, lo que hizo de ellos los materiales de uso más frecuente en Odontología hoy en día. De hecho, su uso no se limita al de materiales de restauración, sino que se utilizan también como bases cavitarias, selladores de fosas y fisuras, material de reconstrucción de muñones, incrustaciones, coronas, restauraciones provisionales, cementos de prótesis fija, postes intrarradiculares y de dispositivos de ortodoncia y como cementos endodóncicos (71). Muchos de los inconvenientes iniciales se han ido solventando (72), pero otros, como la contracción de polimerización, permanecen vigentes.

El sistema de obturación Resilon (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT, USA) (Fig. 6) se incorporó al mercado con el objetivo de reemplazar a las diferentes combinaciones gutapercha / cemento. Este sistema está compuesto por puntas Resilon, material obturador a base de un polímero sintético termoplástico con relleno radiopaco (vidrio bioactivo, oxychloride de bismuto y sulfato de bario), y por un cemento endodóncico de fraguado dual, dispensado con una jeringa de automezcla y compuesto por hidróxido de calcio entre otros componentes (UDMA, PEGDMA, EBPADMA y resinas

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

BISGMA; vidrio barioborosilicato silanado; sulfato de bario; sílice; hidróxido de calcio; oxyclo de bismuto con aminos; peróxido; iniciador de fotopolimerización; pigmento y estabilizadores).

Durante décadas, la gutapercha ha sido el material de elección para la obturación definitiva del sistema de conductos radiculares. Sin embargo, podría no producirse un sellado real del conducto, teniendo lugar solo una adaptación a las paredes del mismo, creándose de esta forma una interfase entre ambos y facilitando la filtración bacteriana por la falta de hermeticidad.



Fig. 6. Fotografía del sistema de obturación RealSeal.

Lo ideal sería que la obturación del sistema de conductos radiculares no presentara interfases para evitar la filtración de microorganismos. Por ello, se propuso la idea de utilizar un material en el interior del conducto capaz de penetrar a través de los túbulos dentinarios, produciendo el completo sellado de los mismos. Se planteó la posibilidad de adherir el cemento endodóncico a la dentina intrarradicular, aplicando adhesivo sobre la superficie intraconducto, previo grabado de las paredes radiculares, para la posterior adición del cemento sellador. De esta manera se pensó que podría ser eliminada la interfase entre cemento endodóncico y pared del conducto, quedando sellados los túbulos



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

dentinarios gracias al acondicionamiento de la superficie dentinaria, cosa que no ocurría entre gutapercha y cemento endodóncico, ya que la gutapercha no tiene capacidad de adhesión sino de compactación (73).

Con EndoREZ (Ultradent, South Jordan, UT), cemento endodóncico a base de metacrilato de resina, se vio que los túbulos dentinarios quedaban sellados a la entrada de microorganismos. Sin embargo, los microorganismos seguían teniendo una interfase para proliferar entre la gutapercha y el cemento endodóncico por la falta de adhesión entre estos dos últimos (73). Para suplir este defecto y conseguir un verdadero hermetismo del conducto, la gutapercha debía ser sustituida. Fue entonces cuando se propuso la sustitución de la misma por un material a base de resina.

Trope formuló el sustituto a base de metacrilato de resina (Sistema de obturación Resilon) con el objetivo de mejorar las propiedades de la gutapercha gracias a la eliminación de la interfase entre material núcleo de obturación, cemento endodóncico y pared dentinaria, creando así un bloque sólido (efecto “monoblock”) y reforzando el diente (74). De esta manera, se pretendía superar dos importantes causas de fracaso en endodoncia como son: la fractura radicular y la re-contaminación del conducto (75). La polimerización del sistema de obturación Resilon es dual; por un lado se logra pasados 40 segundos de luz LED aplicados coronalmente y el resto fragua por autopolimerización en 30-40 minutos. La versión dual de los cementos de resina produce un mayor estrés de contracción cuando son polimerizados mediante la aplicación de luz que si polimerizan químicamente (76). A cambio, las fuerzas de resistencia adhesiva se hacen efectivas antes en los cementos de polimerización dual que en los autopolimerizables, con lo que

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

son los materiales de elección hoy en día debido a que resisten mejor el estrés de contracción y presentan un mayor grado de conversión (77).

Con este material, el clínico no tiene la necesidad de modificar la secuencia del tratamiento de conductos, exceptuando la adición del adhesivo autograbante. Además, las puntas Resilon son termoplásticas y se pueden utilizar con la técnica de la onda continua a 180°C. Se presenta en forma de puntas estandarizadas de conicidad 2%, 4% y 6%, puntas accesorias desde XF a L, puntas Autofit de conicidades del 4%, 6%, 8%, 10% y 12%, puntas Autofit para *back-fill* y cartuchos para Obtura II y para Elements (SybronEndo) (con agujas de calibres 25, 23 y 20 que se calientan respectivamente, a 180°C, 160°C y 140°C) (78). Por lo tanto, se puede emplear con cualquier método de compactación, ya sea vertical caliente o lateral fría (75).

En la primera versión del sistema Resilon se debía utilizar un Primer que consiguiera la unión entre el cemento y las paredes del conducto radicular. Este sistema de obturación se lanzó al mercado como Epiphany por la compañía Pentron Corporation (Wallingford, CT, EUA), se incorporó en Latinoamérica en el 2005 con el nombre de RealSeal por la compañía SybronEndo (West Collins Avenue Orange, CA, EUA y COA Internacional para México), como ObturaSpartan para su uso en forma fluida con Obtura II System y como SimpleFill por la compañía LightSpeed (San Antonio, TX, EUA); todas son presentaciones muy similares del mismo material.

El sistema Resilon estaba compuesto por: Primer autograbante (RealSeal Primer / Epiphany Primer), diluyente (RealSeal Thinning Resin / Epiphany Thinning Resin), cemento sellador (RealSeal / Epiphany) y Puntas de Resilon.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

La única diferencia entre Epiphany y RealSeal se encuentra en la composición del Primer (Tabla 1).

**Tabla 1. Descripción de la composición de Epiphany y RealSeal.**

<b>Epiphany</b>	<b>RealSeal</b>
<p><b>Epiphany Primer</b></p> <p>Champhorquinone, water, AMPS, HEMA</p>	<p><b>RealSeal Primer</b></p> <p>AMPS and hydrophilic monomers solution</p>
<p><b>Epiphany Thinning resin</b></p> <p>EBPADMA resins with photo initiator, amines, stabilizer and Red #40</p>	<p><b>RealSeal Thinning resin</b></p> <p>EBPADMA resins with photo initiator, amines, stabilizer and Red #40</p>
<p><b>Epiphany Sealant</b></p> <p>UDMA, PEGDMA, EBPADMA &amp; BIS GMA resins, silane-treated bariumborosilicate glasses*, barium sulphate, silica, calcium hydroxide, bismuth oxychloride with amines, peroxide, photo initiator, stabilizers and pigment</p>	<p><b>RealSeal Root Canal Sealant</b></p> <p>UDMA, PEGDMA, EBPADMA &amp; BIS GMA resins, silane-treated bariumborosilicate glasses*, barium sulphate, silica, calcium hydroxide, bismuth oxychloride with amines, peroxide, photo initiator, stabilizers and pigment</p>
<p>*Contains a small amount of aluminium oxide</p>	<p>*Contains a small amount of aluminium oxide</p>

El primer monómero que se utilizó en la fabricación de resinas y que aún se usa hoy en día es el bis-GMA (bisfenol A-glicidil metacrilato) desarrollado por Bowen en 1965 (79). Su cadena es muy larga siendo, por tanto, de alto peso molecular (512 g/mol) (80) y junto al anillo rígido de bisfenol A presente en su composición, hace que sea un monómero muy viscoso (entre 500.000 y 800.000 MPa) (81).

La fabricación de resinas con este tipo de monómero exclusivamente es inviable, ya que resultan demasiado viscosos para su uso clínico. Para solventarlo, los fabricantes añaden otros monómeros de cadenas más cortas y bajo peso molecular que funcionan

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

como diluyentes en proporciones entre el 20 y el 50% (82). El más habitual es el TEGDMA (trietilén glicol dimetacrilato), que debido a su baja viscosidad (100 MPa) y peso molecular (286 g/mol) compensa la rigidez del bis-GMA (80). Por contra, también aumenta la sorción acuosa del material (83).

El UDMA (uretil dimetacrilato) es otro de los monómeros también presente en la composición de RealSeal SE utilizándose en combinación con el TEGDMA y asociado al bis-GMA. Aunque el peso molecular del UDMA es muy similar al del bis-GMA (470 g/mol), las principales ventajas frente a éste son su menor viscosidad (entre 5.000 y 10.000 MPa) (81) y que la flexibilidad del enlace uretano hace que sea más resistente a la fractura (82).

A la matriz de monómeros se le añaden partículas de relleno inorgánico para aumentar su fuerza y resistencia mecánica (84). Los fabricantes han utilizado diferentes tipos, formas, tamaños, fracciones de volumen y distribuciones de estas partículas que determinan tanto las propiedades mecánicas de las resinas compuestas como el proceso de polimerización (85). La cantidad de relleno en volumen del material varía mucho dependiendo de las aplicaciones clínicas, el procesado del fabricante y la viscosidad de la matriz resinosa. Generalmente puede tratarse de partículas de cuarzo, tantalato, sílice, circonio, estroncio y bario entre otros (86).

Estos cementos a base de resina metacrilato, desarrollados como una alternativa al uso de los cementos endodóncicos convencionales, muestran una buena adaptación a las paredes del conducto radicular y consiguen un sellado hermético duradero, siendo ambos requisitos fundamentales para el pronóstico favorable después de la terapia endodóncica (87). Además de proporcionar una adaptación íntima a las paredes

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

dentinarias y un sellado más eficaz del sistema de conductos radiculares, se demostró que estos materiales podrían aumentar la dureza de la estructura radicular (88,89).

Desafortunadamente, las resinas se contraen cuando se polimerizan y pierden la adhesión con la dentina. El problema del fraguado o la contracción por polimerización se agudiza particularmente cuando los cementos tienen una gran área de unión superficial en proporción al área de superficie libre no adherida disponible para la relajación del estrés, es decir, un alto factor C de contracción (88,90). Además, los materiales resinosos de poco relleno o con pocas uniones entrecruzadas podrían absorber cantidades excesivas de agua que conducirían a la expansión o desintegración.

La matriz orgánica de las resinas compuestas es la parte químicamente activa del material, responsable de su transformación de una masa plástica a un sólido rígido. El sistema acelerador-iniciador del proceso más frecuente es la cánforoquinona, una amina terciaria aromática (71). Este componente genera radicales libres que rompen los enlaces dobles carbono-carbono entre las moléculas individuales de monómeros. A continuación se generan más radicales libres que forman enlaces sencillos carbono-carbono entre los monómeros para crear largas cadenas de polímeros (91).

Idealmente, al final de la reacción debería no haber monómeros residuales, aunque su presencia es prácticamente inevitable. Cuando avanza la reacción, una vez que las cadenas poliméricas se vuelven cada vez más rígidas, se dificulta el movimiento y la reposición de las moléculas necesarias para formar nuevos enlaces. El porcentaje de monómeros que consigue romper sus enlaces dobles carbono-carbono para formar cadenas de polímeros se conoce con el nombre de grado de conversión (92).

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Al comienzo de la reacción de polimerización, los monómeros se encuentran unos de otros a una distancia intermolecular de unos 4 Å y unidos entre sí mediante enlaces de van der Waals. Cuando los monómeros polimerizan, resultan unidos por enlaces interatómicos covalentes que representan un tercio de la distancia inicial (alrededor de 1,5 Å) (85,92). Por tanto, la contracción de polimerización es la consecuencia de la reorganización de las moléculas para crear una red rígida de polímeros en menos espacio del que ocupaban en el estado viscoso del material (93). Esta reacción supone una reducción en volumen y genera una cierta cantidad de calor (91).

La magnitud de la contracción de polimerización estará determinada por el grado de conversión (92,93) y varía en función del tipo de matriz (85,94) y de la cantidad de relleno (85,95).

Muchos son los estudios que sugieren que los materiales resinosos modernos que contienen monómeros activos de superficie, oligómeros de baja viscosidad y carga inorgánica podrían reducir sustancialmente las filtraciones dentinarias a pesar de los desafíos geométricos inherentes a los que se enfrentan los cementos endodóncicos (96-98).

La obturación de conductos laterales con el sistema Resilon parecía ser mejor en comparación a la combinación gutapercha / cemento debido a la fluidez del Primer y al cemento utilizado para adherir el material al conducto (RealSeal / Epiphany). Si a esto se suma la posibilidad de la aplicación de un diluyente (Thinning Resin), aumenta aún más dicha penetración en conductos laterales.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Pese a esta facilidad de penetración en los conductos laterales, radiográficamente no se conseguía ver la obturación de los mismos. Ello es debido a la radiolucidez del Primer autograbante, siendo éste el que obtura las terminaciones más finas del sistema de conductos (73). De la misma manera, con este material se observa al microscopio la obturación de los túbulos dentinarios por medio de los TAGs de resina introducidos en ellos (75). De ahí la importancia de disolver el barrillo dentinario utilizando algún quelante para exponer la entrada a dichos túbulos.

Los dientes tratados endodóncicamente se consideran más susceptibles a la fractura (99) y una ventaja señalada de los sistemas de obturación adhesiva, como es el sistema Resilon, es reducir esta consecuencia creando un efecto "monoblock" (100). Los defensores del sistema afirman que se forma una unidad mecánicamente homogénea entre la dentina radicular y el material de obturación, reforzando la raíz (74,101). Sin embargo, la naturaleza impredecible de la unión dentinaria intraradicular ha llevado a la incertidumbre sobre el efecto "monoblock" del sistema Resilon / RealSeal o Epiphany (7). La unión exitosa de RealSeal o Epiphany a la dentina ha demostrado ser difícil de lograr incluso en sistemas de conductos radiculares simples donde la formación de GAPs es común en la interfase entre el cemento y la pared del conducto radicular (7). La relación impredecible entre RealSeal / Epiphany y la dentina del conducto radicular se ha atribuido a la contracción de polimerización (90), a la incompleta polimerización del cemento como resultado del monómero residual no fraguado (45) o como resultado del complejo reto mecánico y anatómico que supone la unión al conducto radicular (102-104). Por lo tanto, la realidad clínica del efecto "monoblok" es cuestionable (88,105,106).

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Los primeros estudios que evaluaron la resistencia a la fractura compararon raíces obturadas con Resilon y RealSeal / Epiphany y raíces obturadas con gutapercha y cemento a base de resina epoxi (101,107). Estos estudios llegaron a la conclusión de que el sistema Resilon aumenta la resistencia a la fractura. Esto fue corroborado por un estudio posterior (108). En cambio, otros estudios han encontrado lo contrario al utilizar el sistema Resilon en raíces inmaduras; quizás esto se deba al estrés de contracción durante la polimerización (109-111). Existen inquietudes acerca del efecto fortalecedor del sistema Resilon / RealSeal o Epiphany ya que el módulo de elasticidad entre la dentina y el sistema Resilon es diferente (112,113). Es probable que esto conduzca a la ruptura del enlace adhesivo. Otros estudios han demostrado que el sistema Resilon no es mecánicamente lo suficientemente rígido como para dar soporte mecánico a la dentina después del tratamiento del conducto radicular (114-117).

Así, aunque el sistema Resilon en un principio parecía un buen candidato para sustituir el sistema gutapercha / cemento endodóncico, la mayoría de estudios que se realizaron con este material no demostraron que fuera un material mejor. Uno de los inconvenientes es el ya nombrado proceso de contracción de polimerización, lo que puede facilitar la aparición de GAPs en la unión entre obturación y pared radicular, por lo que la reducción de la filtración bacteriana queda en entredicho (74,90).

Además, la contracción de polimerización que sufre el sistema Resilon puede conllevar un estrés intraconducto por la teórica adhesión del material a la superficie dentinaria. La fuerza que provoca este estrés puede ser mayor a la fuerza de adhesión del material a la dentina, produciéndose por tanto una des-adhesión del material para aliviar dicho estrés, dando lugar a GAPs (90,112). Tay et al. (105) observaron excelentes



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

resultados utilizando de forma conjunta Resilon / Epiphany, a pesar de la presencia de GAPs producidos probablemente por la rápida contracción de polimerización del cemento a base de resina metacrilato. En este estudio también se observaron GAPs y áreas sin GAPs en los dientes obturados con gutapercha, además de observarse una separación entre la gutapercha y el cemento endodóncico AH plus.

Por otro lado, otros autores han observado que, aunque exista una des-adaptación o GAPs originados por la contracción de polimerización, es posible la creación de un espacio estanco sobre la dentina impidiendo así la contaminación corono-radicular (73).

Se han publicado una plétora de estudios sobre filtración que comparan la capacidad de sellado del sistema Resilon y gutapercha; estos estudios forman la mayor parte de la investigación científica sobre el sistema Resilon. Toda esta literatura es de naturaleza *in vitro* y comparan gutapercha y otros cementos con Resilon y RealSeal o Epiphany. Aunque la relevancia clínica de estos estudios ha sido cuestionada (118,119), las conclusiones son dignas de discusión debido a la escasez de datos clínicos sobre el sistema Resilon. Varios estudios sugieren que el sistema Resilon reduce la filtración en comparación con la gutapercha y otros cementos (74,98,120-134). Otros sugieren que no hay diferencia (30,105,135-150). Están también los que demuestran mayor filtración con Resilon en comparación con gutapercha (151-161). No están claros los motivos que explican esta variabilidad, sin embargo podría deberse a la falta de estandarización y fiabilidad de los estudios de filtración, lo que dificulta la comparación (162). Otras posibles causas de la variación experimental incluyen la fijación impredecible de materiales de resina en conductos húmedos (163), agentes quelantes que puedan afectar a la calidad del enlace (164), el uso de ciertos irrigantes que puedan afectar a la polimerización (165-

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

167) o el tipo de luz de polimerización que podría afectar a la contracción de polimerización y a la filtración subsiguiente (168). Todos estos estudios de filtración *in vitro* se evalúan en un número de días o semanas y se ha sugerido que esto puede dar una falsa perspectiva del comportamiento de los cementos a base de resina, ya que podrían degradarse (159) o sufrir hidrólisis con el tiempo (88,129). Por lo tanto, antes de llegar a cualquier conclusión definitiva se deberían hacer evaluaciones a largo plazo además de ser necesarios estudios clínicos.

En el estudio de Shipper et al. (98), realizado en animales, se estudió la resistencia a la filtración de Resilon / Epiphany en comparación con gutapercha / AH-26. Se evaluó la resolución de la periodontitis apical inducida. El estudio se llevó a cabo en siete perros Beagle durante un periodo de seis meses. Transcurrido este periodo de tiempo vieron que el 82% de la inflamación periapical producida por filtración era en dientes obturados con gutapercha; sin embargo, esta incidencia era mucho menor en dientes obturados con Resilon / Epiphany. Esto podría ser atribuible al efecto “monoblock” producido por el sistema Resilon, reduciendo la interfase entre material y pared dentinaria (74). A diferencia de lo que ocurría con el sistema Resilon, la interfase existente al obturar los conductos con gutapercha podría servir a los microorganismos como camino para proliferar en el interior del conducto. La conclusión fue que hubo una reducción comparativa de la periodontitis apical en los casos tratados con Resilon / Epiphany en comparación con los casos tratados con gutapercha / AH-26.

Con el lanzamiento al mercado del cemento autograbante RealSeal SE se eliminó el paso del Primer sin alterar el rendimiento del cemento. Según el fabricante, RealSeal

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

SE ofrecía todas las ventajas de las características y beneficios del cemento de resina RealSeal original ofreciendo un sellado superior.

Esta nueva generación de cementos a base de resina de metacrilato eliminó el uso de imprimadores de autograbado independientes al incorporar monómeros de resina ácida en los cementos para volverlos autoadhesivos a la dentina. En el estudio de Babb et al. (169) se evaluaron las fuerzas adhesivas, la microestructura interfacial y la penetración de EndoREZ y dos cementos autoadhesivos basados en resina de metacrilato (MetaSEAL, Parkell, Farmington, NY; y RealSeal SE) después de una irrigación final con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los dos selladores autoadhesivos MetaSEAL y RealSeal SE exhibieron mejor adhesión que EndoREZ, cemento endodóncico no autograbante, cuando se usó EDTA como irrigante final. Los tres cementos mostraron una zona de dentina parcialmente desmineralizada de 1 a 1,5 micras de espesor. Como consecuencia del efecto de desmineralización de la dentina con EDTA, quedó enmascarado el verdadero potencial de autograbado de MetaSEAL y RealSeal SE.

El estudio de Kim et al. (170) evaluó el verdadero potencial de autograbado de RealSeal SE y lo comparó con RealSeal. ¿Este autograbado era suficiente como para garantizar el grabado a través de la capa de smear layer creada durante la conformación pudiendo desmineralizar así la dentina radicular intacta sin el uso del EDTA?. Según lo mostrado por Kim et al. (170), RealSeal SE podría no tener el potencial suficiente como para lograr una unión dentinaria óptima a las paredes del conducto radicular en zonas no tratadas con quelantes. Por el contrario, RealSeal sí que posee una suave capacidad de grabado en dentina radicular cubierta con smear layer.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Otros quelantes podrían mejorar o no la unión de este tipo de cementos a la dentina radicular. El objetivo de Ballal et al. (171) fue evaluar el efecto del ácido maleico al 7% y del EDTA al 17% en la fuerza de unión de RealSeal SE a la dentina del conducto radicular. No hubieron diferencias significativas en la fuerza de unión entre el ácido maleico al 7% y el EDTA al 17% en el tercio coronal y medio. Sin embargo, en el tercio apical, el ácido maleico al 7% mostró una mayor fuerza de unión. La menor fuerza de unión se observó con solución salina.

En otro estudio del 2014, Christopher et al. (172) evaluaron el efecto de los siguientes antioxidantes: ácido ascórbico al 10%, ácido tánico al 10% y ácido gálico al 10% en la penetración tubular dentinaria de Resilon y RealSeal SE en la dentina radicular tratada con hipoclorito de sodio. Las muestras del Grupo I se irrigaron con solución salina y EDTA al 17%. Las muestras de los grupos II, III, IV y V se irrigaron con hipoclorito de sodio al 5,25% y EDTA al 17%. Las muestras de los grupos III, IV y V se sometieron a irrigación adicional con antioxidantes: ácido ascórbico al 10%, ácido tánico al 10% y ácido gálico al 10%, respectivamente. Después de la obturación con Resilon y RealSeal SE, se realizó un análisis con microscopio electrónico de barrido (SEM) para observar la penetración tubular máxima en los tercios cervical, medio y apical de cada espécimen. La máxima penetración tubular dentinaria de Resilon y RealSeal SE se obtuvo después de la irrigación con 10% de ácido gálico. Así, el ácido gálico al 10% podría favorecer el aumento de la penetración tubular en dentina radicular del cemento RealSeal SE.

El tratamiento de la superficie dentinaria con diferentes sustancias podría causar alteraciones en la composición química y estructural de la dentina humana. El objetivo del estudio de Assis et al. (173) fue investigar la humectabilidad de los cementos

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

endodóncicos en contacto con la dentina tratada con hipoclorito de sodio al 5,25% y clorhexidina al 2% en presencia o ausencia de smear layer. Este estudio reveló que la eliminación del smear layer y el lavado final con clorhexidina al 2% podría favorecer la humectabilidad de los cementos endodóncicos AH Plus y RealSeal SE.

Stelzer et al. (174) también evaluaron la influencia de diferentes irrigantes endodóncicos (hipoclorito de sodio, clorhexidina y EDTA) en la fuerza de adhesión de los materiales de obturación RealSeal SE y AH Plus comprobando también que la fuerza de unión de RealSeal SE está muy influenciada por el irrigante utilizado. De la misma forma que el uso de irrigantes puede influir en la unión cemento-dentina, los irrigantes utilizados para desinfectar los conos de gutapercha y Resilon podrían influir de forma favorable en la unión gutapercha-cemento endodóncico y/o unión Resilon-RealSeal SE o Epiphany (175).

Tanto la penetración tubular como la adaptación del cemento a las paredes radiculares son factores que influyen en el sellado tridimensional del sistema de conductos y, por tanto, son factores importantes para el éxito del tratamiento endodóncico. Chen et al. (176) evaluarán la profundidad de penetración tubular de cuatro cementos endodóncicos diferentes (Cortisol, Pierre Roland, Merignac Cedex, France; iRoot SP, Innovative BioCeramix, Vancouver, BC, Canada; AH Plus y RealSeal SE) en el tercio coronal, medio y apical de los conductos radiculares, así como la adaptación de estos cementos a las paredes del conducto radicular. Se utilizó microscopía electrónica de barrido para evaluar la penetración tubular y la adaptación de los cementos. Los resultados de este estudio demostraron que la penetración máxima fue exhibida por RealSeal SE, seguida de AH Plus, iRootSP y Cortisol. En cuanto a la adaptación a las

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

paredes dentinarias, AH Plus tuvo la mejor capacidad de adaptación seguida de iRoot SP, RealSeal SE y Cortisomol. Así, RealSeal SE mostró la mejor penetración tubular mientras que AH Plus presentó la mejor adaptación a las paredes del conducto radicular.

En otros estudios como el de Stoll et al. (177) se evaluó la resistencia de adhesión de diferentes cementos endodóncicos de tipo adhesivo con Resilon y gutapercha. Se demostró que con los cementos endodóncicos autoadhesivos de un solo componente como es RealSeal SE, se puede formar una conexión adhesiva incluso a la gutapercha, además de al Resilon. Se evaluaron RealSeal, RealSeal SE, HybridRoot Seal (también conocido como MetaSEAL; Parkell, USA = HybridRoot Seal by Sun Medical en Europa) y AH Plus. AH Plus como cemento endodóncico no adhesivo sirvió como grupo de control. La resistencia a las fuerzas de cizallamiento fue relativamente baja (0,1-3 MPa) y significativamente mayor en los grupos con un cemento endodóncico adhesivo de un solo componente. No se encontró una fuerza de unión sustancial en el grupo de control.

A pesar de esta probable unión de RealSeal SE también a gutapercha (177), hay que tener en cuenta que estudios como el de Senges et al. (178) que se centraron en la adhesión microbiana inicial a diferentes materiales de obturación endodóncicos (TubliSeal, SybronEndo, Kerr Corporation, Romulus, MI; Apexit Plus, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein; GuttaFlow, Coltene/Whaledent, Altstätten, Switzerland; EndoREZ; RealSeal SE; AH Plus; gutapercha; y dentina) observaron que los microorganismos endodóncicos tienen una gran afinidad por los materiales de obturación de los conductos radiculares como son los cementos selladores, observando una afinidad especial de estos microorganismos por la gutapercha.

El sellado del conducto radicular es un paso clave en el tratamiento endodóncico no quirúrgico. La mayoría de los estudios recientes se han centrado en la capacidad relativa del sistema de obturación Resilon para resistir a la filtración; sin embargo, los resultados han sido poco concluyentes con un grupo de estudios que sugieren que Resilon es superior a la gutapercha y otro grupo que sugieren lo contrario. La heterogeneidad de los métodos empleados en estos estudios dificulta la comparación y hace que sea dudosa la relevancia clínica de estos estudios *in vitro*. Sin embargo, la conclusión es que, aunque hay evidencias que sugieren que el sistema Resilon podría tener un mejor o peor comportamiento que la gutapercha en estudios de filtración, es difícil extrapolar conclusiones clínicas significativas a partir de toda esta literatura. Quizás una forma más relevante de evaluar la eficacia del sistema Resilon sería evaluar el resultado *in vivo*; desafortunadamente, estos estudios consumen mucho tiempo y son raros en el campo de la endodoncia.

### **2.5 Citotoxicidad de los materiales de obturación endodóncicos**

Así, siendo cierto que el sistema Resilon presenta ventajas, no son suficientes como para descartar el uso de gutapercha / cemento endodóncico dado los buenos resultados que ofrece ésta combinación. Además, algunas investigaciones muestran cierto efecto citotóxico de alguno de los componentes que forman parte de la composición del sistema Resilon.

La toxicidad de un cemento endodóncico se determina en general, utilizando un sistema de tres pasos. Primero se evalúa el material utilizando una serie de ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Luego, si se encuentra que el material no es citotóxico *in vitro*, se procede al segundo paso que es la implantación subcutánea o intraósea del material para

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

observar la reacción tisular local. El tercer paso consiste en evaluar la reacción *in vivo* del tejido ante el material estudiado sobre sujetos humanos o animales (179,180).

La evaluación citotóxica es uno de los estudios *in vitro* usados más comúnmente para determinar la biocompatibilidad de un material. Es un estudio simple, rápido y económico que proporciona una valiosa información de los materiales que deben ser descartados o aquellos que deben ser sometidos a más estudios (179).

El término "alternativa a la experimentación animal" puede llevar a confusión y sugerir que se refiere sólo a aquellos métodos que los sustituyen en la investigación, como, por ejemplo, los métodos *in vitro*. En realidad, se consideran bajo este concepto todos aquellos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R (181). Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro "*The Principles of Humane Experimental Technique*". Las tres R se refieren a *reemplazar* los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, *reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento. Según dichos autores, lo ideal es reemplazar los animales por otros métodos, aunque, en muchos casos, por la necesidad de experimentar con ellos, sólo se pueda aspirar a la reducción y al refinamiento (182). La justificación de usar estos estudios de biocompatibilidad *in vitro* es el alto costo de los estudios *in vivo* y la presión de las sociedades de protección del uso de los animales de experimentación (183).

Se han empleado muchos métodos para determinar la citotoxicidad de los materiales dentales. Estos métodos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño o muerte celular. Para Toledo et al. (184) la toxicidad de un cemento o sus componentes puede evaluarse observando alteraciones morfológicas en



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

cultivos celulares y analizando estos cultivos bajo el microscopio electrónico o el microscopio electrónico de barrido. Las alteraciones morfológicas evidencian toxicidad intra o extracelular debido a la exposición de las células al material.

Dentro del abanico de ensayos *in vitro* como métodos de estudios de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada, los ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (185).

El Instituto Americano Nacional de Estandarización, La Asociación Dental Americana, La Organización Internacional de Estandarización y La Federación Dental Internacional han publicado lineamientos para la evaluación de materiales que fomentan el uso de métodos *in vitro*. Estos lineamientos pueden ser utilizados como pruebas filtro, minimizando así la necesidad de pruebas *in vivo* (179).

Las líneas celulares establecidas más comúnmente utilizadas son: macrófagos RAW 264.7, fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos L929 de ratón, células epiteliales de carcinoma cervical humano HeLa, fibroblastos de riñón de hámster BHK 21, células de riñón de mono VERO y células epiteliales cutáneas humanas NCTC254 (186). Estas células son escogidas para realizar los estudios *in vitro* sobre la citotoxicidad de cementos endodóncicos debido a que son fáciles de conseguir, se cultivan con facilidad y son consistentes en cuanto a su calidad (187).

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva que se produzca un daño que pueda ser detectado (185). A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado diferentes pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (188).

Los estudios en cultivos celulares demostraron que los monómeros de metacrilato y trietilenglicoldimetacrilato (presentes en los materiales de restauración) pueden afectar en la captación de leucocitos en la inflamación local, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión intercelular e induciendo la actividad enzimática y la expresión de factores de crecimiento y citocinas (189,190). Además, los monómeros de resina podrían suprimir la actividad mitocondrial de los macrófagos y podrían alterar la respuesta inflamatoria (191,192).

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden no correlacionarse con datos *in vivo*. Sin embargo, si un material de estudio induce de forma consistente reacciones citotóxicas fuertes en pruebas de cultivos celulares, es muy probable que también ejerza efectos citotóxicos sobre tejidos vivos. La reducción en el número de pruebas sobre animales y su costo consiste en un beneficio adicional de esta manera de abordar las pruebas de citotoxicidad (179).

Para Vajrabhaya y Sithisam (180) la evaluación citotóxica tiene la ventaja de ser una manera rápida y económica de filtrar un gran número de materiales antes de su

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

evaluación *in vivo*. Estas pruebas proporcionan una evaluación inicial de los componentes del material estudiado que pueden causar efectos adversos en las pruebas clínicas. Subsecuentemente, de cada tipo de prueba *in vivo* se obtiene información valiosa sobre la biocompatibilidad de los materiales sobre las células y tejidos. Por lo tanto las pruebas *in vitro* deben realizarse antes que cualquier prueba *in vivo* (180).

Las pruebas para evaluar el efecto tóxico *in vivo* de los cementos endodóncicos sobre el tejido periapical son costosas y carecen de una estandarización completa de las variables clínicas pero son pruebas que pueden proporcionar información relacionada con las propiedades biológicas y las características de manipulación de los materiales bajo circunstancias clínicas (193).

No hay duda de que el método ideal para poner a prueba un material es el ensayo *in vivo* en un sujeto humano. La experimentación humana a menudo es peligrosa, costosa y carece de ética por lo que en su mayor parte, se sustituye con pruebas en animales.

Para examinar la respuesta periapical ante los cementos endodóncicos, los conductos radiculares de animales de experimentación se limpian y conforman, para luego ser obturados con los materiales estudiados. Los animales son luego sacrificados y sus tejidos periapicales son examinados histológicamente para determinar la biocompatibilidad de los cementos endodóncicos a diferentes intervalos de tiempo (193).

Para la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales dentales se recomiendan también otros estudios *in vivo* como son las técnicas de implantación subcutánea. Estos estudios se realizan mediante la implantación del material en tejido subcutáneo de animales; el efecto de los cementos endodóncicos se evalúa por medio del

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

examen histopatológico de la respuesta tisular alrededor del material. Las técnicas de implantación proporcionan información importante sobre la respuesta tisular a los materiales dentales. Por lo tanto, los resultados obtenidos de estas pruebas podrían ser utilizados como indicadores de biocompatibilidad de los materiales en estudio.

Los resultados de implantación muestran en general que los materiales de obturación causan inicialmente inflamación, como resultado del trauma y la liberación de sustancias nocivas de estos materiales, y con el tiempo se vuelven más biocompatibles (194).

Varios estudios *in vitro* han investigado sobre la biocompatibilidad del Resilon sin cemento y han mostrado que se podría comparar favorablemente con la gutapercha (195-197). Esto se corroboró en un estudio en animales (198). Otros estudios han comparado Resilon con gutapercha concluyendo que Resilon era más biocompatible (199). Sin embargo, otro estudio demostró lo contrario (200). Se sugirió que una de las razones que explicaría la citotoxicidad potencial de Resilon podría ser la biodegradabilidad de este material por enzimas e hidrólisis alcalina, lo que expondría la matriz polimérica más tóxica (201).

El cemento RealSeal / Epiphany podría ser citotóxico en comparación con cementos a base de óxido de zinc-eugenol o a base de resina epoxi (196,202-207). Un estudio mostró que se volvió más citotóxico con un mayor tiempo de exposición (208). Sin embargo, también se observó que aunque RealSeal / Epiphany sean citotóxicos, no afecta la viabilidad de los leucocitos humanos (209). La citotoxicidad informada puede deberse a la filtración de monómero no fraguado de la capa de inhibición del oxígeno (196,197,210,211) o debido a la degradación del cemento en un medio acuoso

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

(40,41,212). El Bis-GMA y el UDMA presentes en el cemento RealSeal son otra posible fuente potencial de citotoxicidad (195,197,202,213). Sin embargo, varios estudios *in vivo* han demostrado que la biocompatibilidad de RealSeal / Epiphany es aceptable (37,214-218).

Baraba et al. (209) evaluaron la genotoxicidad y la citotoxicidad *in vitro* de cada uno de los componentes de Epiphany y RealSeal (Epiphany Primer, Epiphany Thinning Resin, Epiphany Sealant, RealSeal Primer, RealSeal Thinning Resin y RealSeal Root Canal Sealant). Epiphany Primer, Epiphany Thinning Resin, RealSeal Primer y RealSeal Thinning Resin y sus combinaciones fueron citotóxicas e indujeron apoptosis. Ni el sellador Epiphany ni el sellador RealSeal (igual composición) tuvieron un efecto significativo en la viabilidad de los leucocitos humanos.

Así, todos los componentes de Epiphany / RealSeal, excepto los selladores polimerizados, indujeron un alto efecto citotóxico (209). La posible explicación de la citotoxicidad de los Primer podría ser por el HEMA presente en el Primer Epiphany el cual podría inhibir el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular (219) o por los monómeros ácidos extraíbles en el Primer RealSeal que son tóxicos (220) debido a su solubilidad en agua (221). La posibilidad de que dicho componente se escape de los confines del conducto radicular durante su aplicación significa un inconveniente para la reparación apical por la baja biocompatibilidad con el tejido. El sellador polimerizado, sin embargo, parece no ser citotóxico (209), lo que coincide con los hallazgos en los que la citotoxicidad de los materiales basados en resina varía dependiendo de la cantidad de componentes lixiviables, que se reducen con una polimerización adecuada (221). La lixiviación es el proceso por el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido que pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

componentes originales del sólido. Esto también explica la citotoxicidad del cemento no polimerizado que contiene UDMA, PEGDMA, EBPADMA y Bis-GMA, que han demostrado ser citotóxicos (220,221). Además, Resende et al. (36) revelaron que la solubilidad de Epiphany era mayor que los valores considerados aceptables, permitiendo la liberación de sustancias tóxicas. La alta citotoxicidad de ambos cementos a base de resina no polimerizada podría deberse a la lixiviación de partículas de relleno (40) o a la liberación de monómeros sin reaccionar (222). Sin embargo, las células expuestas al sellador no polimerizado se recuperaron después de 24 horas, lo que puede explicarse por la eliminación de los componentes activos y sugiere que el posible efecto genotóxico (209) podría ser reversible.

La resina diluyente también es citotóxica (209) y, según la información de los fabricantes, este componente de Epiphany y RealSeal contiene resinas EBPADMA. También se ha encontrado que estos monómeros inducen una respuesta citotóxica (223), lo que explica los resultados obtenidos por Baraba et al. (209). Los datos de citotoxicidad presentados en el estudio de Baraba et al. (209) coinciden con estudios previos (195, 203, 211). En un estudio de Key et al. (195) se analizó Epiphany en busca de un posible efecto citotóxico sobre fibroblastos humanos; los resultados fueron que Epiphany presentaba un fuerte efecto citotóxico sobre estas células. Eldeniz et al. (211) encontraron Epiphany altamente citotóxico tanto para fibroblastos gingivales humanos como para células L929, con menos del 30% de células viables al cabo de cuatro horas de la exposición. Brackett et al. (203) informaron que tanto Epiphany como RealSeal se mantuvieron severamente citotóxicos durante el período de 6 semanas en células L929.

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

RealSeal SE ofrecía todas las ventajas de las características y beneficios del cemento de resina RealSeal original ofreciendo un sellado superior y eliminando el efecto citotóxico del Primer. La matriz de RealSeal SE es una mezcla de bisfenol A epoxi (Bis-GMA), dimetacrilato de uretano (UDMA) y metacrilatos hidrofílicos disfuncionales, mientras que el relleno está compuesto de hidróxido de calcio, sulfato de bario, vidrio de bario y sílice (224).

Scelza et al. (70) evaluaron la citotoxicidad de seis cementos endodóncicos: RealSeal SE, Sealapex, AH Plus, GuttaFlow (Coltène-Whaledent, Langenau, Germany), Roth 801 (Roth International, Chicago, USA) y ThermaSeal Plus (Dentsply/Maillefer, Konstanz, Germany), utilizando fibroblastos gingivales humanos. Los materiales se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se incubaron en un medio de cultivo (DMEM) a 37°C durante 1, 7, 14, 21 y 28 días. Los resultados indicaron que GuttaFlow fue significativamente menos citotóxico en comparación al resto de cementos ( $p < 0,05$ ). La citotoxicidad de Sealapex a los 14 días fue significativamente más alta que los otros cementos estudiados ( $p < 0,05$ ). En los días 21 y 28, no se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad entre los grupos de cementos. Todos los materiales presentaron algún efecto citotóxico en los fibroblastos, mientras que GuttaFlow fue el cemento menos citotóxico probado. Sin embargo, la citotoxicidad de todos los materiales pareció disminuir de manera similar a medida que fue pasando el tiempo.

Ames et al. (225) también evaluaron la citotoxicidad de cuatro cementos endodóncicos a base de resina de metacrilato (EndoREZ, RealSeal, MetaSEAL y RealSeal SE junto con controles positivos y negativos) mediante un ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazolio, que mide la viabilidad celular mediante la

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

evaluación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa que es un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. Se dejó que los cementos polimerizaran mediante autofraguado para simular la condición de fraguado tras su extrusión a los tejidos perirradiculares. Todos los selladores exhibieron toxicidad severa inicialmente (semana 0). EndoREZ y RealSeal permanecieron severamente tóxicos después de cinco ciclos de inmersión en una simulación de fluido corporal. La toxicidad de los dos cementos a base de resina de autograbado MetaSEAL y RealSeal SE disminuyó gradualmente con el tiempo. La microscopía electrónica de transmisión de las células expuestas a RealSeal SE mostró grados variables de lesión celular que reflejaban una situación de toxicidad. Al cabo de 5 semanas este cemento se volvió no citotóxico y se identificaron células con mitocondrias intactas.

Yamanaka et al. (226) investigaron las reacciones del tejido subcutáneo ante cementos endodóncicos a base de resina de metacrilato mediante la evaluación inmunohistoquímica de infiltrado celular inflamatorio / inmunocompetente. Se implantaron tubos de silicona que contenían cementos recién mezclados de Epiphany SE, MetaSEAL, Super-Bond RC (Sun Medical, Moriyama, Japan) o un cemento a base de óxido de zinc-eugenol (Canals; Showa Yakuhin Kako, Tokyo, Japan) en tejido subcutáneo de ratas Wistar. Se implantaron varillas de silicona sólidas en los casos control. Todos los selladores basados en resina de metacrilato evaluados mostraron un nivel similar de infiltrado celular inflamatorio / inmunocompetente. MetaSEAL indujo una infiltración de neutrófilos menos intensa que Canals. Los controles mostraron un infiltrado de células inflamatorias / inmunocompetentes más leve en comparación a todos los materiales evaluados.



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

Los fabricantes de Resilon afirman que se puede producir un sellado coronal inmediato mediante su fotopolimerización durante 40 segundos, mientras que el fraguado del sellador restante se establece a partir de 25 minutos (instrucciones RealSeal / Epiphany, SybronEndo 2010). Sin embargo, la realidad de esto ha sido cuestionada. Se ha encontrado que en condiciones anaeróbicas, el fraguado podría establecerse en 30 minutos, pero en condiciones aeróbicas podría tardar hasta tres semanas, lo que sugiere que el sistema Resilon no fraguaría completamente si se extruye hacia los tejidos periradiculares (210).

Las extrusiones de cemento endodóncico, ya sean intencionales o no, son comunes durante los procedimientos de obturación. Estas situaciones se han correlacionado con una mayor molestia postoperatoria y con estados persistentes de dolor. Sin embargo, los mecanismos que explican este fenómeno son en gran parte desconocidos. Ruparel et al. (227) evaluaron el efecto de algunos cementos endodóncicos de uso común en los nociceptores periféricos. La hipótesis de estos autores era que los cementos endodóncicos podrían activar directamente los nociceptores trigeminales de una manera dependiente a la concentración, lo que daría como resultado la liberación del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), un potente modulador de la inflamación neurogénica. Se expusieron neuronas sensoriales del trigémino de ratas *in vitro* a un cemento a base de óxido de zinc-eugenol, AH Plus, EndoSequence BC Sealer o RealSeal SE. La activación neuronal se midió mediante la cuantificación de la liberación de neuropéptido (CGRP). La concentración de CGRP liberada se cuantificó mediante el uso de un radioinmunoensayo. Tanto el cemento a base de óxido de zinc-eugenol como el AH Plus en su forma fresca evocaron una mayor liberación de CGRP en comparación a los grupos control. Por el contrario, el

EndoSequence BC Sealer y RealSeal SE redujeron la liberación basal de CGRP en todas las concentraciones probadas. La evaluación de los cementos endodóncicos establecidos reveló que solo el cemento a base de óxido de zinc-eugenol evocaba una liberación significativa de CGRP en comparación al grupo control. En general, estos resultados sugieren que los cementos endodóncicos podrían activar directamente los nociceptores del trigémino, lo que lleva a una liberación robusta de CGRP y, por lo tanto, puede provocar dolor e inflamación neurogénica. Esta activación directa junto con la respuesta inmunológica puede ser la base de los síntomas y la presencia de brotes que a menudo se observan con la extrusión de cementos.

### **2.6 Otras propiedades del Sistema Resilon**

Resilon / RealSeal o Epiphany, tanto cuando se investigaron individualmente como en combinación, no han demostrado ningún efecto antibacteriano o antifúngico significativo (228-231). Un estudio concluyó que RealSeal en realidad incluso podría mejorar el crecimiento bacteriano (232) y en otro que el *Enterococcus faecalis* era resistente a RealSeal (231). Curiosamente, en este último estudio en el que utilizaron un método de difusión en agar se demostró que RealSeal podría inhibir el crecimiento microbiano; sin embargo, es poco probable que esto sea clínicamente relevante (231).

El pH de Epiphany / RealSeal es superior a 11,5 y se vuelve neutro al polimerizar. Si penetran fluidos, el pH vuelve a aumentar lo que puede prevenir la contaminación bacteriana (78).

Schäfer et al. (233) evaluaron la solubilidad, el tiempo de fraguado y la radiopacidad de AH Plus, EndoREZ y RealSeal SE. La solubilidad se determinó por la

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

pérdida de peso de las muestras en agua durante un período de 28 días. El tiempo de fraguado y la radiopacidad se evaluaron de acuerdo con las especificaciones ANSI / ADA e ISO. AH Plus fue significativamente menos soluble, mostró la radiopacidad significativamente más alta y mostró el tiempo de fraguado más largo respecto al resto de los cementos ( $p < 0,01$ ). En todos los tiempos de exposición, EndoREZ fue significativamente más soluble que el resto de cementos ( $p < 0,01$ ) y mostró los valores significativamente más bajos con respecto a la radiopacidad ( $p < 0,01$ ). El estudio mostró que el tiempo de fraguado y la radiopacidad para todos los cementos cumplía con los estándares ANSI / ADA e ISO. La solubilidad de AH Plus y RealSeal SE confirmó la especificación ANSI / ADA e ISO, mientras que EndoREZ excedió claramente el valor de solubilidad propuesto. De todos los cementos probados, AH Plus obtuvo los mejores valores para todas las propiedades. Coincidiendo con otros estudios, la combinación Resilon / RealSeal SE demostró una radiopacidad aceptable, que supera la radiopacidad mínima equivalente a 3 mm Al, según lo recomendado por el American National Standards Institute (ANSI) y la American Dental Association (ADA) (36,43,234).

Otro requisito ideal de un material de sellado radicular es que sea fácil de desobturar para facilitar una preparación posterior o el retratamiento del conducto. Aunque la gutapercha se considera relativamente fácil de eliminar, se ha descubierto que, independientemente de la técnica empleada, es difícil su eliminación completa durante el retratamiento (235-237). Una ventaja del sistema Resilon es que se puede eliminar de manera similar a como se hace con la combinación gutapercha / cemento endodónico (238-251). Una serie de estudios han comparado la remoción del sistema Resilon con la remoción de gutapercha teniendo en cuenta como principales variables investigadas el tiempo de remoción y el material residual que permanece en el interior del conducto. La

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

mayoría de los estudios han concluido que el sistema Resilon se puede eliminar fácilmente usando una variedad de técnicas. Al igual que con los estudios de sellado, los resultados han sido contradictorios con algunos estudios que demuestran que la cantidad de restos de material del sistema Resilon es menor que la de los depósitos de gutapercha y cemento endodónico en el interior del conducto (238-241,243), mientras que otros han encontrado lo contrario (242,246,249). La variación entre estos estudios quizás sea atribuible a que Resilon / RealSeal o Epiphany no estuvieron adheridos por completo antes del retratamiento y, por lo tanto, fueron más fáciles de eliminar (210,231), o a que los conductos se ensancharon hasta dos calibres más que el tamaño apical previo a la eliminación, lo que aumentaría la eficacia del retratamiento (252-254). Ezzie et al. (238) encontraron que el sistema Resilon dejó menos restos de material en el tercio apical del conducto radicular; esto puede deberse al hecho de que la remoción efectiva del smear layer y la posterior adhesión es difícil de lograr en esta área (255,256). La gran mayoría de los estudios han comparado Resilon / RealSeal o Epiphany con gutapercha / cemento a base de resina epoxi, sin embargo, esto podría dificultar una extrapolación precisa a otros cementos endodónicos que se pueden utilizar con gutapercha, ya que las resinas epoxi están asociadas a la presencia de una mayor cantidad de residuos en comparación a otros cementos (257).

En el estudio de Bayram et al. (258) se evaluó la solubilidad de cinco cementos endodónicos diferentes (AH Plus Jet; RealSeal SE; MTA Fillapex, Angelus Industria de Produtos Odontologicos S/A, Londrina-PR.Brasil; Tubli-Seal, Kerr, USA; y Acroseal, Septodont, Saint-Maur-des-Fosses Cedex, France) en solventes de cloroformo, eucalyptol y Endosolv-E. El cloroformo fue el solvente más efectivo en comparación con eucalyptol o Endosolv E para todos los cementos endodónicos, excepto para RealSeal SE ( $p < 0.003$ ).

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

RealSeal SE fue el cemento endodóncico menos soluble en todos los solventes y en todos los periodos de tiempo evaluados.

El Cloroformo ha sido recomendado por los fabricantes como una ayuda en la eliminación de Resilon (instrucciones RealSeal / Epiphany, SybronEndo 2010). Sin embargo, los cementos de resina no se disuelven con cloroformo además de que este producto tiene un efecto adverso sobre la resistencia a la adhesión de Resilon / RealSeal o Epiphany cuando se realiza la posterior re-obturación (259, 260).

Otra posible desventaja del sistema de obturación Resilon es que podría tener potencial para causar manchas en los dientes, ya que es susceptible a la hidrólisis enzimática y alcalina (105,201). Esta biodegradación puede dar como resultado que los colorantes que forman parte de la composición del material filtren a través de las estructuras dentinarias. La formación de un precipitado y el cambio de color asociado también se observó cuando se intentó desinfectar Resilon con clorhexidina al 2% (261). Sin embargo, un estudio clínico de un año de duración mostró que no había tinción asociada con el sistema Resilon (262).

Los estudios prospectivos clínicos aleatorios que comparan dos tratamientos diferentes son el estándar de oro en investigación médica. Estos estudios son infrecuentes en endodoncia y los publicados a menudo son de baja calidad (263). Hasta la fecha, pocos estudios clínicos han comparado Resilon / RealSeal o Epiphany con gutapercha / otro cemento endodóncico. Uno de ellos concluyó no encontrando diferencias significativas entre ambos materiales (264). Sin embargo, este fue un estudio retrospectivo con un seguimiento que varió de un mes a dos años; Además, solo había un número limitado en cada grupo. Otros estudios de seguimiento de casos han mostrado

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

resultados de dientes obturados solamente con Resilon / RealSeal o Epiphany sin comparar con casos obturados con gutapercha (262,265). En un estudio retrospectivo en el que se examinaron radiografías, después de un año de seguimiento del tratamiento se concluyó con que las tasas de curación de los conductos obturados con sistema Resilon fueron similares a la tasa de curación de los conductos obturados con gutapercha (265). Sin embargo, el período de revisión fue corto, el número de dientes relativamente pequeño y no hubo examen clínico. La eficacia clínica a corto plazo de Resilon / Epiphany se corroboró en un estudio prospectivo en el cual se llevaron a cabo evaluaciones clínicas y radiográficas para valorar el resultado (262). Este estudio fue de naturaleza preliminar y se trabajó con un número pequeño de dientes tratados que se revisaron después de un año.

Recientemente Barborka et al. (266) publicaron un estudio retrospectivo de casos y controles y compararon los resultados clínicos a largo plazo de tratamientos endodóncicos obturados con Resilon / RealSeal SE (RS) y gutapercha / AH Plus (GP). Se hizo el seguimiento de cien dientes tratados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Texas A & M entre 2007 y 2012; 50 dientes fueron obturados con RS y 50 con GP. Todos los casos eran dientes sin lesiones radiolúcidas radiográficas pre-operatorias. El cincuenta y seis por ciento de los dientes obturados con RS se clasificaron como exitosos cuando se revisaron en comparación con el 88% de los dientes obturados por GP. RS tuvo 5,7 veces más probabilidades de fracaso en comparación con GP ( $p < 0,001$ ). Cuando se detectaron lesiones radiolúcidas periapicales, tendían a ser más grandes e implicar a más raíces en el grupo RS en comparación con el grupo GP. Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio, se llegó a la conclusión de que los dientes obturados con RS tenían 5,7 veces más probabilidades de fracaso en comparación con los dientes obturados con GP.

### 2.7 Prototipo cemento endodóncico RealSeal XT

La cuarta generación de cementos de resina a base de metacrilato (por ejemplo, MetaSeal, Parkell Inc, Farmington, NY; RealSeal SE, SybronEndo, Orange, CA) tienen propiedades de autograbado inherentes, son hidrofílicos y promueven la formación de una capa híbrida después de la polimerización. Estos cementos contienen iniciadores de radicales libres que permiten que el material fragüe químicamente al mezclarse o mediante luz visible (doble fraguado) y están sujetos a la inhibición de la reacción de polimerización por radicales libres mediante oxígeno molecular. En cambio, los cementos a base de resina epoxi polimerizan mediante reacción de apertura del anillo aniónico en presencia de amina primaria, mientras que la polimerización de la apertura del anillo epoxídico no es inhibida por el oxígeno. Los inconvenientes de los sistemas epoxi-amina son la velocidad de reacción más lenta y menor adherencia (119).

En otro intento de dar con un cemento endodóncico mejor que siguiera esta línea de materiales a base de resinas y con capacidad de adherirse a la dentina y al material núcleo de obturación, consiguiendo así un efecto “monoblock”, el fabricante desarrolló un prototipo de cemento endodóncico llamado RealSeal XT (Sybron, Glendora, CA, USA).

El nuevo cemento endodóncico autoadhesivo experimental (RealSeal XT) con propiedades de fraguado dual podría ser un cemento endodóncico híbrido con características prometedoras. Según el fabricante (SybronEndo), consta de resinas epoxi cicloalifáticas y resinas de metacrilato alifático. Debido al monómero adhesivo ácido, anhídrido del trimelitato de 4-metacriloxietilo (4-META), el material tiene mejores propiedades de autograbado. También 4-META participa en la polimerización catiónica de

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

apertura de anillo del monómero di-epoxi, formando finalmente una red tridimensional más densa, que reduce la formación de la capa de inhibición.

Se necesitaban más estudios *in vivo* e *in vitro* para saber como se comportaría esta nueva formulación RealSeal XT. Siendo la posible microfiliación producida por la contracción de polimerización uno de los problemas más importantes de los cementos endodóncicos predecesores al RealSeal XT, en el 2013 Wong et al. (267) publicaron un estudio donde compararon la resistencia a la microfiliación *in vitro* de materiales a base de resina adhesiva con cementos a base de óxido de zinc-eugenol y cementos a base de resina epoxi. Este fue uno de los primeros estudios donde se evaluó el prototipo RealSeal XT y se comparó con cementos a partir de los cuales se había desarrollado (RealSeal y AH Plus). Se evaluaron siete materiales: cinco cementos a probar (RealSeal; RealSeal XT; Panavia F 2.0, Kurraray, Okayama, Japan; Infinity Syringeable, Den-Mat, Santa Maria, CA, USA; GCEM, GC, Tokyo, Japan) y dos cementos que fueron controles (Tubliseal, AH Plus). Todos los materiales resinosos adhesivos modernos filtraron significativamente menos que los cementos a base de óxido de zinc-eugenol y que los cementos a base de resina epoxi ( $p < 0.05$ ). Los valores medios de filtración y sus desviaciones asociadas (desviaciones estándar) en mm fueron: Infinity Syringeable 2,5 (1,5), Real Seal XT 3,2 (1,4), Real Seal 3,4 (1,6), Panavia F 2.0 3,8 (2,7), GCEM 4,2 (1,8), Tubliseal 5,4 (2,8), AH Plus 6,3 (2,3). En general, fueron más frecuentes las filtraciones a nivel apical que a nivel coronal. Así, se demostró que con el prototipo RealSeal XT hubo menor filtración que con cementos a base de óxido de zinc-eugenol y que con cementos endodóncicos que forman parte de su composición como son RealSeal y AH Plus. Esta investigación midió principalmente la resistencia a la filtración, pero este es solo uno de los muchos factores que influyen en la elección de un cemento endodóncico.



## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

En otro estudio de Cotti et al. (268) publicado poco tiempo después del estudio de Wong et al. (267) se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de este nuevo cemento RealSeal XT autoadhesivo comparándolo con AH Plus usando la línea celular de fibroblastos L929 de ratón en crecimiento y confluentes. Ambos cementos indujeron muerte celular del fibroblasto de ratón L929 de una forma tiempo-dependiente; sin embargo, los análisis morfológicos y de viabilidad mostraron que RealSeal XT fue menos citotóxico que AH Plus y su citotoxicidad inicial disminuyó progresivamente con el tiempo. Estos datos podrían respaldar el posible uso de RealSeal XT como cemento endodónico. En el estudio de Cotti et al. (268) la citotoxicidad del RealSeal XT se comparó con la de un cemento endodónico de uso común basado en resina epoxi y se eligieron las células L929 debido a su alta sensibilidad a los productos tóxicos (31,269). Se eligieron células en crecimiento, para imitar la respuesta proliferativa *in vivo* al daño celular inducido en el tejido periapical después de la obturación endodónica, y se eligieron también células confluentes, caracterizadas por una tasa proliferativa muy baja, que se utilizaron para reproducir la condición *in vivo* de los tejidos en ausencia de daño celular. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene y por ello la tasa proliferativa es muy baja. La toxicidad exhibida por AH Plus en el estudio de Cotti et al. (268) es consistente con las conclusiones de estudios previos que establecieron el grado de citotoxicidad de AH Plus de una forma tiempo-dependiente con diferentes líneas celulares. Se ha formulado la hipótesis de que esta citotoxicidad se deriva del componente de resina epoxi del sellador liberado después del fraguado (119,202,270-274), aunque un artículo reciente ha demostrado que puede disminuir hasta desaparecer completamente después de 2 semanas (275). La toxicidad de RealSeal XT

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

observada en el estudio de Cotti et al. (268) fue menor a la exhibida por sus versiones anteriores RealSeal SE / Epiphany SE o RealSeal / Epiphany (119,270,276).

Las opciones clínicas deben basarse en una amplia gama de pruebas y evidencia clínica. Por lo que se debía seguir evaluando este prototipo de cemento endodóncico y ese fue el objetivo de nuestro equipo.

Según un documento de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (277), el cemento RealSeal XT, que aún no está disponible comercialmente, es un cemento endodóncico a base de resina de autograbado que se presenta en una formulación de pastas catalizador / base que combina químicamente metacrilato de 2-hidroxietilo y resinas epoxi. Debido a su naturaleza de autograbado y a sus propiedades adhesivas, RealSeal XT no requiere el uso de un agente grabador, primer o adhesivo y se utiliza con conos Resilon (Pentron Clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT, EE.UU.). Las resinas autograbantes han sido desarrolladas para mejorar la adhesión a la dentina (278). Contienen ácidos débiles relativos. Sus monómeros pueden penetrar en la dentina subyacente, formando una capa híbrida gracias a la penetración de TAGs de resina dentro de los túbulos dentinarios (279). De esta forma, estos materiales resinosos pueden sellar el diente en la interfase dentina / material evitando la microfiltración y por tanto minimizando la colonización microbiana de los tejidos periapicales (280). También hay evidencia mediante estudios *in vitro* de que las resinas autograbantes pueden ejercer un efecto bactericida por contacto a corto plazo e incluso proporcionar acción bacteriostática a largo plazo (281). Además, los sistemas adhesivos dentinarios son capaces de distribuir tensiones funcionales aplicadas dentalmente o en los materiales de restauración reforzando de esta forma la estructura del diente debilitado (282). RealSeal XT se

## Revisión de la literatura / Estado de la cuestión

---

presenta en una jeringa con doble salida para cada una de las partes (catalizador y base) y se puede mezclar usando una punta de mezcla automática que se une a la jeringa o también se puede mezclar manualmente sobre papel de mezcla. Ya hemos visto que un estudio reciente *in vitro* ha demostrado que el uso de este material reduce la microfiltración marginal en incisivos de bovino si se compara con cementos que se han estado utilizando durante mucho tiempo como son los cementos a base de óxido de zinc-eugenol y/o los cementos a base de resinas epoxi (267). También hemos visto que la toxicidad de RealSeal XT es menor que la exhibida por sus versiones anteriores y que incluso AH Plus (268). Sin embargo, son necesarios más estudios *in vivo* que evalúen la respuesta tisular cuando se usa este material.

Otros estudios han intentado evaluar la respuesta del tejido subcutáneo de algunos cementos endodóncicos (283-285). Sin embargo, la mayoría de estos estudios solo evaluaron la respuesta tisular después del uso de las versiones anteriores de RealSeal XT y Sealapex Xpress (226,273,286).

### **3. HIPÓTESIS**



## 3. HIPÓTESIS

Las hipótesis de la publicación N° 1 “*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*” fueron:

- I. Tanto el cemento Activ GP, el cemento Sealapex, el cemento Endo-CPM Sealer, como el cemento AH Plus pueden ser cementos que cumplan los requisitos ANSI/ADA de una solubilidad inferior al 3%.
- II. Tanto el cemento Activ GP, el cemento Sealapex, el cemento Endo-CPM Sealer, como el cemento AH Plus pueden ser cementos que cumplan los requisitos ANSI/ADA de radiopacidad superior a 3 mm Al.
- III. Tanto el cemento Sealapex como el cemento Endo-CPM Sealer pueden ser cementos que generen un pH básico cuando se dispersan en agua en comparación con el AH Plus.
- IV. El cemento Activ GP puede ser un cemento que genere un pH ácido cuando se dispersa en agua en comparación con el AH Plus.
- V. Tanto el cemento Activ GP, el cemento Sealapex como el cemento Endo-CPM Sealer pueden ser cementos con una adaptación interfacial al conducto radicular bovino similar en comparación al cemento AH Plus.

Las hipótesis de la publicación N° 2 “*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*” fueron:

- I. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT pueden ser cementos endodóncicos biocompatibles con los tejidos *in vivo*, en perros.

- II. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT pueden promover un sellado apical biológico en dientes vitales de perros.

Las hipótesis de la publicación N° 3 “*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*” fueron:

- I. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT pueden ser cementos endodóncicos con un efecto tóxico dosis-dependiente en cultivos celulares.
- II. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT pueden ser cementos endodóncicos no citotóxicos.
- III. Tanto Sealapex Xpress como RealSeal XT pueden ser cementos endodóncicos biocompatibles en tejido subcutáneo de ratones.

## **4. OBJETIVOS**





## 4. OBJETIVOS

El objetivo de la publicación N° 1 “*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*” fue comparar las propiedades fisicoquímicas y la adaptación interfacial a las paredes de conductos en dientes bovinos de los siguientes cementos endodóncicos: Endo-CPM Sealer (a base de silicato dicálcico), Sealapex (a base de hidróxido de calcio), Activ GP Sealer (a base de ionomero de vidrio) y AH-Plus (a base de resina epoxi), realizando pruebas de solubilidad, radiopacidad y pH de acuerdo con los requisitos del American National Standards Institute / American Dental Association - ANSI / ADA - Especificación 57 (3) y el escaneado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para valorar la adaptación interfacial.

El objetivo de la publicación N° 2 “*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*” fue evaluar la respuesta de los tejidos apicales y periapicales de dientes vitales de perro después de obturar el conducto radicular con los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y Real Seal XT.

El objetivo de la publicación N° 3 “*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*” fue evaluar la citotoxicidad *in vitro*, en cultivos celulares, y la biocompatibilidad *in vivo*, en tejido conectivo de ratones, de los cementos endodóncicos RealSeal XT y Sealapex Xpress.



Según la normativa del Programa de Doctorado de Medicina de la Universitat de Barcelona, la presentación de la tesis como compendio de artículos debe incluir una introducción general sobre el tema seguida de una hipótesis, de los objetivos globales, de una discusión conjunta y por último de las conclusiones. Se sobreentiende que material y métodos y resultados quedan reflejados en los artículos publicados.



## **5. PUBLICACIONES**



# Publicación núm. 1

Autores: **Piedad S. Cañadas**, Ester Berástegui, Patricia Gatón-Hernández, Léa A. B. Silva, Giselle A. Leite, Roberto S. Silva.

Título: “**Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers**”

Publicado en *Brazilian Dental Journal*. 2014; 25: 435-41.

**SJR: 0.555 (Q2)**

58	Dental Clinics of North America	journal	0.586 Q2	53	51	162	2767	297	146	1.86	54.25	
59	BMC Oral Health 	journal	0.581 Q2	33	170	173	6082	290	169	1.61	35.78	
60	Pediatric Dentistry	journal	0.579 Q2	55	93	330	1492	358	297	1.11	16.04	
61	Brazilian Dental Journal  	journal	0.555 Q2	39	101	322	2370	423	320	1.08	23.47	
62	Journal of Orofacial Orthopedics	journal	0.551 Q2	36	47	146	1167	121	116	0.92	24.83	
63	International Journal of Dental Hygiene	journal	0.549 Q2	28	53	153	1607	180	136	1.29	30.32	
64	Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry 	journal	0.547 Q2	10	13	29	502	36	28	1.41	38.62	





# Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers

Piedad S. Cañadas<sup>1</sup>, Ester Berástegui<sup>1,2</sup>, Patricia Gatón-Hernández<sup>3</sup>, Léa A. B. Silva<sup>4</sup>, Giselle A. Leite<sup>4</sup>, Roberto S. Silva<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Researcher, IDIBELL Institute, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Integrated Pediatric Dentistry, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Physics and Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Avenida do Café s/n, Monte Alegre, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Tel: +55-16-3315-3965. e-mail: lea@forp.usp.br

Key Words: physicochemical properties, root canal sealers, scanning electron microscopy, radiopacity, solubility.

This study compared the physicochemical properties and interfacial adaptation to canal walls of Endo-CPM-Sealer, Sealapex and Activ GP with the well-established AH Plus sealer. The following analyses were performed: radiopacity, pH variation and solubility using samples of each material and scanning electron microscopy of root-filled bovine incisors to evaluate the interfacial adaptation. Data were analyzed by the parametric and no-parametric tests ( $\alpha=0.05$ ). All materials were in accordance with the ANSI/ADA requirements for radiopacity. Endo-CPM-Sealer presented the lowest radiopacity values and AH Plus was the most radiopaque sealer ( $p=0.0001$ ). Except for Activ GP, which was acidic, all other sealers had basic chemical nature and released hydroxyl ions. Regarding solubility, all materials met the ANSI/ADA recommendations, with no statistically significant difference between the sealers ( $p=0.0834$ ). AH Plus presented the best adaptation to canal walls in the middle ( $p=0.0023$ ) and apical ( $p=0.0012$ ) thirds, while the sealers Activ GP and Endo-CPM-Sealer had poor adaptation to the canal walls. All sealers, except for Activ GP, were alkaline and all of them fulfilled the ANSI/ADA requirements for radiopacity and solubility. Regarding the interfacial adaptation, AH Plus was superior to the others considering the adaptation to the bovine root canal walls.

## Introduction

Root canal sealers can be organized according to their chemical composition. Current materials are based on calcium hydroxide, zinc oxide-eugenol, silicone, polymer resins, glass ionomer (1) and dicalcium silicate, mainly mineral trioxide aggregate (MTA)-derived cements (2). MTA is a widely used biomaterial that includes calcium-based minerals among its main phases. After setting, the material contains calcium oxide that reacts with tissue fluids to form calcium hydroxide (3). However, MTA has not been developed for use as a root canal sealer because of its low flow, reduced workability (short working time and long setting time) and poor consistency (4).

Endo-CPM-Sealer (EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina) has been developed to overcome the limitations of MTA, such as poor handling characteristic and lengthy setting time (4), and allow its use as a root canal sealer. This material has similar chemical composition to MTA, but its most significant difference is the presence of a large amount of calcium carbonate, which tends to increase the release of calcium ions, also offering good sealing properties, adhesion to the dentinal canal walls, antimicrobial activity, adequate flow rate and biocompatibility (5-7). The exact proportion of its components is not yet available; however, it is known that it is composed by Portland cement, calcium carbonate, barium sulfate and calcium chloride, to reduce the setting

time and improve the handling and sealing properties (6).

The use of glass ionomer sealers is advised based on their adhesion to dentine, fluoride release, biocompatibility and antimicrobial activity. The Activ GP (Brasseler USA, Savannah, GA, USA) filling system consists of glass ionomer-based cement and glass ionomer-coated gutta-percha cones (8). According to the manufacturer, Activ GP has longer handling characteristics, radiopacity, working time and sealing ability compared to previous glass ionomer-based sealers because of its higher flow and slight expansion on setting (9). Activ GP has been proposed mainly for providing adhesion between the filling material and the root canal walls. It has been evaluated in terms of cytotoxicity (10), microleakage (5,9) and some physicochemical properties. However, the quality of these properties is still in discussion, requiring additional studies in order to complement the available information and to evaluate other not yet studied features.

Sealapex (SybronEndo, Orange, CA, USA) is a calcium hydroxide-based sealer that has good biological properties (11) and apical sealing capacity (5). The manufacturer has recently modified its formulation by adding bismuth trioxide to improve its radiopacity and increase its shelf life, which requires new studies to assess its properties.

AH Plus (De Trey-Dentsply, Konstanz, Germany) is an epoxy resin-based endodontic sealer containing calcium

hydroxide, with low solubility and disintegration, adequate radiopacity, adhesion to the root dentine, antimicrobial activity and adequate biological properties (12,13).

One of the factors related to long-term success of endodontic treatment is tridimensional filling and an appropriate coronal restoration, allowing periapical repair and preventing reinfection (14). It is desirable that root canal sealers provide an adherence between gutta-percha (GP) and root canal walls, avoiding the occurrence of gaps at the sealer/dentin interface and providing high level interface adaptability (15). According to Balguerie et al. (16), scanning electron microscopy with longitudinal sections can be used to evaluate the sealer/dentin interface.

The purpose of this laboratory study was to compare the physicochemical properties and interfacial adaptation to canal walls of Endo-CPM-Sealer (based on dicalcium silicate), Sealapex (based on calcium hydroxide - new formulation) and Activ GP Sealer (based on glass-ionomer) with the well-established AH-Plus sealer (based on epoxy resin), using radiopacity, pH and solubility tests according to the American National Standards Institute/American Dental Association - ANSI/ADA - Specification 57 (17) requirements, and scanning electron microscopy (SEM).

## Material and Methods

The root canal sealers used in the present study were: Endo-CPM-Sealer (EGEO SRL, Argentina) in powder/liquid ratio 3:1, Activ GP (Brasseler USA, USA) in a 1:3 powder/liquid ratio, Sealapex (SybronEndo, USA) and AH Plus (De Trey-Dentsply, Germany) both in paste/paste ratio. After preparation, the samples were subjected to the analyses described below.

### Radiopacity

Polytetrafluoroethylene ring molds (15 mm internal diameter and 1.0 mm high) were used for sample preparation. Five samples per sealer were produced, stored in closed receptacles in an incubator at 37 °C until complete setting. Considering the variations in the setting time of the sealers informed by the manufacturers, the longest setting time of all materials (8 h - AH Plus) was used. Thereafter, the specimens were placed onto 5 occlusal radiographic films (Insight; Kodak Comp., Rochester, NY, USA) alongside a graduated aluminum stepwedge with thickness ranging from 2 to 16 mm, in uniform steps of 2 mm. The x-ray exposures were made using a Spectro II x-ray unit (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with a 2.5 mm aluminum filter added. The tube voltage was 70 kV and the current 10 mA. The exposure time was 6.3 s with a constant source-to-film distance of 30 cm. The exposed films were processed manually by the time/temperature method.

The radiographs were digitized using a desktop

scanner (Expression 636®; Epson) controlled by software (Epson scanner II 32, version 2.10E®), and then saved in TIFF format. Adobe Photoshop CS3, version 7.0.1. (Adobe System Corporation Inc., San Jose, CA, USA), was used to analyze each image by the intensity histogram of tone scales in the "light channel" to obtain an average value of brightness intensity for each specimen. Contrast and brightness of each image were standardized at 40 and 30, respectively. The radiographic density of the sealers was compared with the radiopacity of different thicknesses of the aluminum stepwedge.

Five repetitions were carried out to determine the radiopacity of the sealers. Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey's test at 5% significance level.

### pH

For the pH test, 10 polyethylene tubes measuring 10 mm in diameter and 1.5 mm deep were filled with freshly prepared samples of each material, sealed in flasks containing 10 mL of distilled water, and stored at 37 °C for 30 min. Manual agitation with a glass rod was made to obtain a more homogeneous medium and 2 more minutes were allowed for sedimentation of particles. Next, the pH of solutions was measured with the glass electrode of a digital pH meter (Model DM-20 Digimed; Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, SP, Brazil) previously calibrated with buffer solutions with pHs 7.0 and 4.0 at preset times. The pH was measured at the moment of immersion of the material in water and at 1-hour intervals in the first 6 h, and then after 23, 25, 27, 48, 168, 336, 528 and 750 h. The electrode was copiously washed with distilled water and vigorously dried with absorbent paper between readings. The experiment was performed in triplicate and the pH values were recorded for comparison over time.

### Solubility

A 1.5-mm-thick cylindrical polytetrafluoroethylene (Teflon; DuPont, HABIA, Knivsta, Sweden) mold with a 7.75 mm inner diameter was filled to a slight excess with freshly mixed sealer (18). The mould was supported by a larger glass plate and covered with a cellophane sheet. A nylon thread was placed inside the material, in order to suspend the samples in water, and another glass plate also covered with cellophane film was positioned on the mould and pressed manually in such a way that the plates touched the entire mould in a uniform manner. The assembly was placed in an incubator (37 °C, 95% RH) for a period 50% longer than the setting time recommended by the manufacturer. As soon as the samples were removed from the mould, they were weighed three times each with 0.0001 g accuracy (HM-200; A&D Engineering, Inc., Bradford, MA, USA) and the mean reading recorded.

The samples were placed in glass flasks containing 7.5 mL of distilled water, taking care to avoid any contact between them and the inner surface of the container, and then kept at 37 °C for 24 h to allow sealer dissolution. After this period, the flasks were centrifuged and the water was poured. After sedimentation of residues of the materials at the bottom of the flasks, they were left at room temperature for several minutes for evaporation of the residual water and then placed in an oven at 110 °C for 30 min to allow complete drying. Then the flasks were reweighed to calculate the sealer mass that was not solubilized in water. The water solubilized mass was calculated based on the initial mass and the final mass. The mass loss of each sample (initial mass minus final mass), expressed as percentage of the original mass was considered as the solubility of the material. The experiment was performed in triplicate. Data were analyzed statistically by the non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test at 5% significance level.

### *SEM Analysis of Interfacial Adaptation to Root Canal Dentin*

Fifty freshly extracted bovine incisors with fully formed straight roots were disinfected with 2% sodium hypochlorite and stored in saline for 48 h before use. The teeth were randomly assigned to 5 groups (n=10 teeth/group) and crowns were removed at the cemento-enamel junction with water-cooled diamond disc at high speed. Each canal was measured by introducing a size 15 K-file (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) until its tip was visible at the apical foramen and the working length established at 1 mm short of this point.

Root canal preparation was carried out using a step-back technique. The root canal preparation was performed to the working length up to a size 80 K-file and the root canals were copiously irrigated with 1 mL of 1% sodium hypochlorite at each change of file. After completion of biomechanical preparation, the canals were filled with 1 mL of 17% EDTA for 3 min under agitation, for smear layer removal. Then, the canals received a final flush with 1 mL of 1% sodium hypochlorite, followed by drying with sterile absorbent paper points (Dentsply Ind. and Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil). Sealers were mixed for 15-20 s on a clean glass slab using the ratios recommended by the manufacturers.

Obturation techniques with AH Plus, Sealapex and Endo-CPM sealers were performed by introduction into the root canal with a size 80 gutta-percha cone (Tanari Industrial Ltda., Manacapuru, AM, Brazil) up to the working length. Lateral condensation was then completed with the use of finger spreader and accessory points (F and MF gutta-percha points). Regarding the Activ-GP sealer, after placement of the sealer, the Activ GP cone was coated with

sealer and slowly inserted into the canal to its working length in order to create a monoblock filling. Radiographs were taken to evaluate the quality of root filling regarding homogeneity and apical extension. Root canal filling was improved if any void was detected radiographically. After filling, the teeth were stored in individual containers and kept at 37 °C (100%) until complete setting, as described before.

Thereafter, the roots were grooved longitudinally with a carborundum disc at low speed and split in the buccolingual plane with a surgical chisel and mallet, taking care not to contaminate the canal with debris. Longitudinal sections were performed according to former studies (16). The buccal and lingual halves were then processed for SEM analysis. The specimens were dried and mounted on aluminum stubs, sputter-coated with a 30- $\mu$ m-thick gold layer in a fine-coat ion sputter (Denton Desk II, Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ, USA) and examined with a scanning electron microscope (JSM-5410; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at 20 kV. The areas of interest in each specimen were selected and images were captured at 15x and 50x magnifications. One calibrated and blinded evaluator examined the SEM micrographs, using a 3-point system to score the interfacial adaptation of the materials to root canal dentin: 0: good adaptation, if well-compacted and tightly adapted filling material was observed, without interface gaps; 1: regular adaptation, if only few interface gaps were found; 2: poor adaptation, if several gaps were found between the sealer and the canal walls or if the filling material was not in contact with the dentin in most parts of the root canal. This analysis was performed after measuring the real root canal length and the value was divided into three thirds. In each third, the median portion was marked to obtain the score.

Data were analyzed statistically by the Kruskal-Wallis test and Dwass, Steel, Critchlow & Fligner post test at 5% significance level.

## **Results**

### *Radiopacity*

The radiopacity values for each root canal sealer are displayed in Figure 1. Endo-CPM-Sealer presented the lowest radiopacity values, followed by Activ GP, Sealapex and AH Plus, which was the most radiopaque sealer. Differences were found between all groups ( $p < 0.0001$ ), except between Sealapex and AH Plus ( $p = 0.5022$ ).

AH Plus presented the highest radiopacity value and was slightly superior to the last step of the reference stepwedge (16 mm aluminum), while the radiopacity of Endo-CPM-Sealer corresponded to the second step of the scale (4 mm aluminum). According to the ANSI/ADA's Specification Number 57 (17), the radiopacity of a root

canal sealer material must be equivalent to at least 3 mm of the aluminum stepwedge.

### pH Variation

Figure 2 presents the pH variation of the root canal sealers over time.

AH Plus started with a basic pH (8.82), reached its peak of OH<sup>-</sup> ion release after 3 h (mean pH=9.82), and then the pH dropped gradually to 8.57 (23 h) with small variations, remaining around 7.90 until the last reading (31 days) (Fig. 2A).

Sealapex started with a basic pH (7.18), reached its peak of OH<sup>-</sup> ion release after 17 h (11.93) and then reduced slightly to around 11.00. From 168 h (7 days), the pH dropped gradually to 8.29 (31 days) (Fig. 2B).

Endo-CPM-Sealer started with a basic pH (9.57) and reached its peak of hydroxyl ion release after 23 h (11.40) and then reduced slightly to around 11.00. From 168 h, the pH dropped gradually to 8.51 (31 days) (Fig. 2C).

Activ-GP was the only material with an acidic pH, starting at 4.48, dropping to 3.83 after 1 h, and remaining without significant changes up to 30 h. Thereafter, the pH increased gradually until reaching a mean value of 5.12 (31 days) (Fig. 2D).

Data interpretation shows that all sealers are basic materials and release OH<sup>-</sup> ions to the environment, except for ActiV GP, which had an acidic pH from the start of the study (around 4.00). The graphs show a greater release of hydroxyl ions from Sealapex (pH=11.93) followed by AH Plus (pH=9.82) and Endo-CPM-Sealer (pH=11.4), which also presented ion release peaks.

P.S. Cañadas et al.

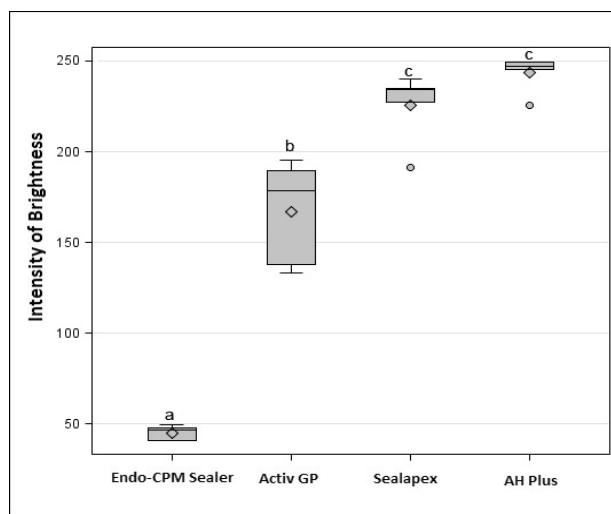


Figure 1. Statistical box plot expressing radiopacity values (intensity of brightness) of Endo-CPM-Sealer, ActiV GP, Sealapex and AH-Plus sealers. Different letters indicate statistically significant difference.

### Solubility

Table 1 presents the solubility values (%) for all sealers after the triplicate test. No statistically significant difference (p=0.0834) was found among the sealers. All materials were in accordance with the ANSI/ADA Specification Number 57 (2000) (17) - Guideline for Root Canal Sealers, which requires the solubility to be less than 3 percent in weight.

### Interfacial Adaptation to Root Canal Dentin by SEM

Based on the examination of SEM micrographs and statistical analysis of the scores assigned to each material, no statistically significant difference was found among the sealers in the coronal third (p=0.1595), which presented regular adaptation (score 1) to the canal walls. However, in the middle (p=0.0023) and apical (p=0.0012) thirds, there was a statistically significant difference between AH Plus, which had good adaptation (score 0), and sealers Activ GP and Endo-CPM-Sealer, which had poor adaptation (score 2) to the canal walls. Sealapex also presented good adaptation. Figure 3 presents a representative specimen of each root canal sealer.

### Discussion

Root filling should ideally have some degree of radiopacity in order to detect its placement (12). In the present work, all sealers fulfilled the ANSI/ADA requirements for radiopacity. Guerreiro-Tanomaru et al. (19) showed that Endo-CPM-Sealer presented radiopacity values above the recommended minimum, equivalent to 6 mm aluminum. However, AH Plus was significantly more radiopaque than

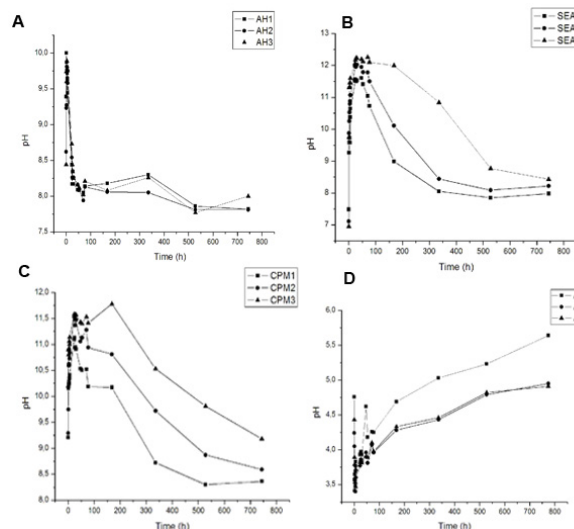


Figure 2. pH variation of sealers AH Plus (A), Sealapex (B), Endo-CPM-Sealer (C) and Activ GP sealer (D) during the experimental period (0 to 750 h).

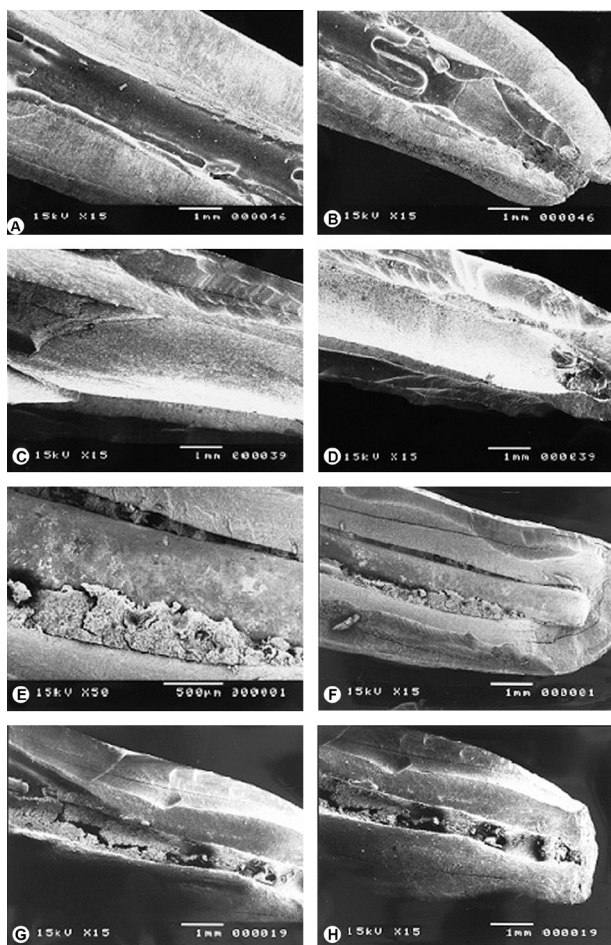


Figure 3. SEM micrographs of representative specimens of AH Plus (A, B), Sealapex (C, D), Activ GP (E, F) e Endo-CPM-Sealer (G, H).

Table 1. Solubility values (%) of the tested sealers.

Sealer	Glass mass	Glass mass + sealer mass (initial mass)	Glass mass + sealer mass (final mass)	Final minus initial mass	Solubility
AH-Plus 1	6.9968	7.0497	7.0008	0.0489	0.69%
AH-Plus 2	6.9238	7.1039	7.0371	0.0668	0.94%
AH-Plus 3	6.9248	7.1810	7.1808	0.0002	0.002%
Sealapex 1	6.9011	7.0321	7.0288	0.0033	0.04%
Sealapex 2	6.8921	7.0216	7.0128	0.0088	0.12%
Sealapex 3	6.8141	7.1162	7.1218	0.0056	0.07%
ActiV GP 1	6.9308	7.0252	6.9941	0.0311	0.44%
ActiV GP 2	6.9084	7.0622	7.0218	0.0404	0.57%
ActiV GP 3	8.4347	8.7374	8.6100	0.1274	1.46%
Endo-CPM Sealer 1	6.9210	7.0305	6.9770	0.0535	0.76%
Endo-CPM Sealer 2	8.1998	8.3230	8.2531	0.0699	0.84%
Endo-CPM Sealer 3	6.7989	6.9651	6.8922	0.0729	1.05%

the other materials, which agrees with previous studies that also compared the radiopacity of root canal sealers (12, 20).

In an experiment to compare the radiopacity of various root canal sealers, Tanomaru et al. (21) showed Sealapex to be the least radiopaque, equivalent to 2 mm aluminum, while AH Plus was equivalent to 16 mm aluminum. In the present study, similar results were found for AH Plus (slightly superior to 16 mm), while Sealapex presented significantly higher radiopacity value (14 mm). The difference in the radiopacity of Sealapex is explained by the addition of bismuth trioxide in the recent formulation, which led to a marked improvement in radiopacity. In a more recent study using similar methods and materials, Tanomaru et al. (7) found the radiopacity of Sealapex (new formulation) to be equivalent to 6 mm aluminum, whereas Activ GP sealer glass-ionomer material was equivalent to 2 mm aluminum. Similar result was found by Flores et al. (1), in whose study Activ GP did not fulfill the ANSI/ADA protocols regarding radiopacity. However, in the present study, Activ GP presented high radiopacity, equivalent to 12 mm aluminum.

Periapical healing after root canal therapy should feature bone tissue regeneration, deposition of cementum in the periapex region, and normal periodontal ligament space. Upon contact with water, calcium hydroxide releases calcium ions during ionic dissociation, and the amount of free calcium ions determines the potential of this material to induce formation of mineralized tissue. Moreover, the efficacy of calcium hydroxide is based on its

capacity to release hydroxyl ions and cause local increase of pH, which is essential for its clinical antimicrobial action (3).

Root canal filling materials usually contain calcium hydroxide, which is responsible for increasing the pH, although other oxides are also present (3). The composition of these sealers alters the pH according to the reactivity in aqueous medium and/or the pharmacotechnical characteristics of the polymer that composes the material.

Calcium hydroxide may release hydroxyl ions and maintain the pH alkaline and stabilized for a relatively long time. In the present study, the pH measurements revealed that AH Plus, Sealapex and Endo-CPM-Sealer are alkaline materials that

release hydroxyl ions to the medium, which is in accordance with previous studies (11). However, what is seen on Figures 2A–2C is a rapid increase in pH values followed by a decrease tending to stabilization. This may be explained by the fact that calcium hydroxide solubility decreases as the sealer sets and the already released hydroxyl ions are consumed by other substances present in the solution or on sealer surface.

ActiV GP was the only sealer that was acidic from the start, with pH values close to 4.0. This was an expected result because this material derives from glass ionomer cement, which is composed by polyacrylic and itaconic acids that release  $H^+$  ions, increasing the acidity. The analysis of pH variation of this sealer (Fig. 2D) shows an initial decrease followed by increase, indicating that as observed for alkaline sealers, the  $H^+$  ions are consumed by other components in the solution.

Solubility is the capacity of a substance to dissolve into another, and is expressed as the concentration of the saturated solution of the former in the latter (22). All sealers tested in this experiment were in accordance with the ANSI/ADA requirements, as they presented solubility less than 3%. Sealapex presented mean solubility of only 0.055% while AH Plus was the most soluble (0.82% mean value). These results do not agree with those of a recent study (2) in which Sealapex was shown to have solubility values above the limit established by ANSI/ADA, whereas AH Plus was in accordance with this ANSI/ADA requirement for solubility. According to Eldeniz et al. (11), Sealapex was also considered to present high solubility, however this statement was assigned due to its high pH and high calcium ion release. However, the low solubility of Sealapex in the present study is justified by its composition, which was formulated with the purpose of providing greater radiopacity and low solubility, without losing the good biological properties.

Correlation of the solubility profile with pH variation over time revealed that the most soluble sealer, AH Plus, also had a faster consumption of hydroxyl ions (Fig. 2A). Therefore, it could be inferred that there is a secondary reaction between the release of hydroxyl ions and the subsequent reaction with the sealer byproducts dissolved in aqueous medium.

High solubility is beneficial both from physicochemical and biologic viewpoint, because the release of more calcium ions into the tissue, as well as the higher pH may lead this sealer to exhibit a more powerful antibacterial effect (10).

In spite of having low solubility and diffusibility, calcium hydroxide will not promote the expected healing effects on surrounding tissues, unless calcium and hydroxyl ions dissociate from the sealer. This is why the long-term sealing ability of calcium hydroxide sealers and their therapeutic

effects are subject to great discussion (3).

Good adaptation to root dentin is an important property of endodontic sealers for providing a tight seal and preventing bacterial leakage and failure of treatment (23). In the present study, in the middle and apical thirds, AH Plus and Sealapex had good adaptation, while Activ GP and Endo-CPM-Sealer presented poor adaptation to the canal walls. The result of the present study can be correlated with the findings of Balguerie et al. (16), who showed that AH Plus presented optimal tubular penetration and adaptation to the root canal wall, after SEM evaluation. There are no studies in the literature regarding root canal adaptation after SEM evaluation of Activ GP, Endo-CPM and Selapex sealers.

It is noteworthy that bovine teeth were selected for this study, as they are readily available and share basic microscope morphologic qualities (24), being a good substitute for human dentin. Also, according to Schilke et al. (25), there are no significant differences in dentinal tubule diameters in human and bovine dentin observed by SEM.

In conclusion, all sealers met the ANSI/ADA requirements for low solubility and radiopacity greater than 3 mm of equivalent aluminum. Except for the glass-ionomer sealer (Activ GP), all materials were neutral and became basic when dispersed in water, although the effect reduced over time. Additionally, in SEM examination, the AH Plus material was superior to the others for adaptation to the bovine root canal walls.

## Resumo

Este estudo comparou as propriedades físico-químicas e a adaptação interfacial às paredes do canal dos cimentos Endo-CPM-Sealer, Sealapex e Activ GP com o bem estabelecido cimento AH Plus. As seguintes análises foram realizadas: radiopacidade, variação de pH e de solubilidade utilizando amostras de cada material, e microscopia eletrônica de varredura utilizando incisivos bovinos obturados para avaliar a adaptação interfacial. Os dados foram analisados utilizando testes paramétricos e não-paramétricos ( $\alpha=0,05$ ). Todos os materiais estavam de acordo com os requerimentos da ANSI/ADA para radiopacidade, sendo que o Endo-CPM-Sealer apresentou os menores valores de radiopacidade e o AH Plus foi o cimento mais radiopaco ( $p=0,0001$ ). Exceto o Activ GP, que foi ácido, todos os outros cimentos apresentaram natureza química básica e liberaram íons hidroxila. Com relação à solubilidade, todos os materiais estavam de acordo com as recomendações da ANSI/ADA, sem diferença significativa entre os cimentos ( $p=0,0834$ ). O AH Plus apresentou a melhor adaptação às paredes do canal nos terços médio ( $p=0,0023$ ) e apical ( $p=0,0012$ ), enquanto que os cimentos Activ GP e Endo-CPM-Sealer apresentaram uma pobre adaptação às paredes do canal. Em conclusão, todos os cimentos, exceto o Activ GP, foram alcalinos e todos preencheram os requerimentos da ANSI/ADA para radiopacidade e solubilidade. Com relação à adaptação interfacial, o AH Plus foi superior aos demais para adaptação às paredes do canal radicular de incisivos bovinos.

## References

1. Flores DS, Rached FJ Jr, Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:126-135.
2. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus

- G, Miranda CE et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J* 2012;45:419-428.
3. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers: A Review. *J Endod* 2009;35:475-480.
  4. Santos AD, Moraes JCS, Araújo EB, Yukimitu K, Valério Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experiment cement. *Int Endod J* 2005;38:443-447.
  5. Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J* 2011;44:370-375.
  6. Assmann E, Scarparo RK, Böttcher DE, Grecca FS. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *J Endod* 2012;38:219-221.
  7. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21:147-151.
  8. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013; 46:755-762.
  9. Fransen JN, He J, Glickman GN, Rios A, Shulman JD, Honeyman A. Comparative assessment of ActiV GP/Glass Ionomer sealer, Resilon/Epiphany, and Gutta-Percha/AH Plus obturation: a bacterial leakage study. *J Endod* 2008;34:725-727.
  10. Donadio M, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of ActiV GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e74-e78.
  11. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e86-e91.
  12. Resende LM, Rached-Junior FJ, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CE, Silva-Sousa YT et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J* 2009; 42:785-793.
  13. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the Intraosseous Biocompatibility of AH Plus, Endo REZ, and Epiphany Root Canal Sealers. *J Endod* 2006;32:656-662.
  14. Estrela C, Holland R, Estrela CRA, Alencar AHG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J* 2014;25:3-11.
  15. De-Deus G, Reis C, Di Giorgi K, Brandão MC, Audi C, Fidel RA. Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:381-386.
  16. Balguerie E, van der Sluis L, Vallaey K, Gurgel-Georgelin M, Diemer F. Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 2011;37:1576-1579.
  17. ANSI/ADA, Specification n. 57. Endodontic Sealing Material. Chicago, USA; 2000.
  18. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* 2007;33:1110-1116.
  19. Guerreiro-Tanomaru JM, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. *Braz Oral Res* 2009;23:119-123.
  20. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J* 2014;47:437-448.
  21. Tanomaru JM, Cezare L, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. Evaluation of the radiopacity of root canal sealers by digitization of radiographic images. *J Appl Oral Sci* 2004; 12:355-357.
  22. Sousa-Neto MD, Guimarães LF, Saquy PC, Pécora JD. Effect of different grades of gum resins and hydrogenated resins on the solubility, disintegration, and dimensional alterations of Grossman cement. *J Endod* 1999;25:477-480.
  23. Javidi M, Zarei M, Naghavi N, Mortazavi M, Nejat AH. Zinc oxide nanoparticles as sealer in endodontics and its sealing ability. *Contemp Clin Dent* 2014;5:20-24.
  24. White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod* 2002;28:828-830.
  25. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000;45:355-361.

Received March 28, 2014  
Accepted October 6, 2014





# Publicación núm. 2

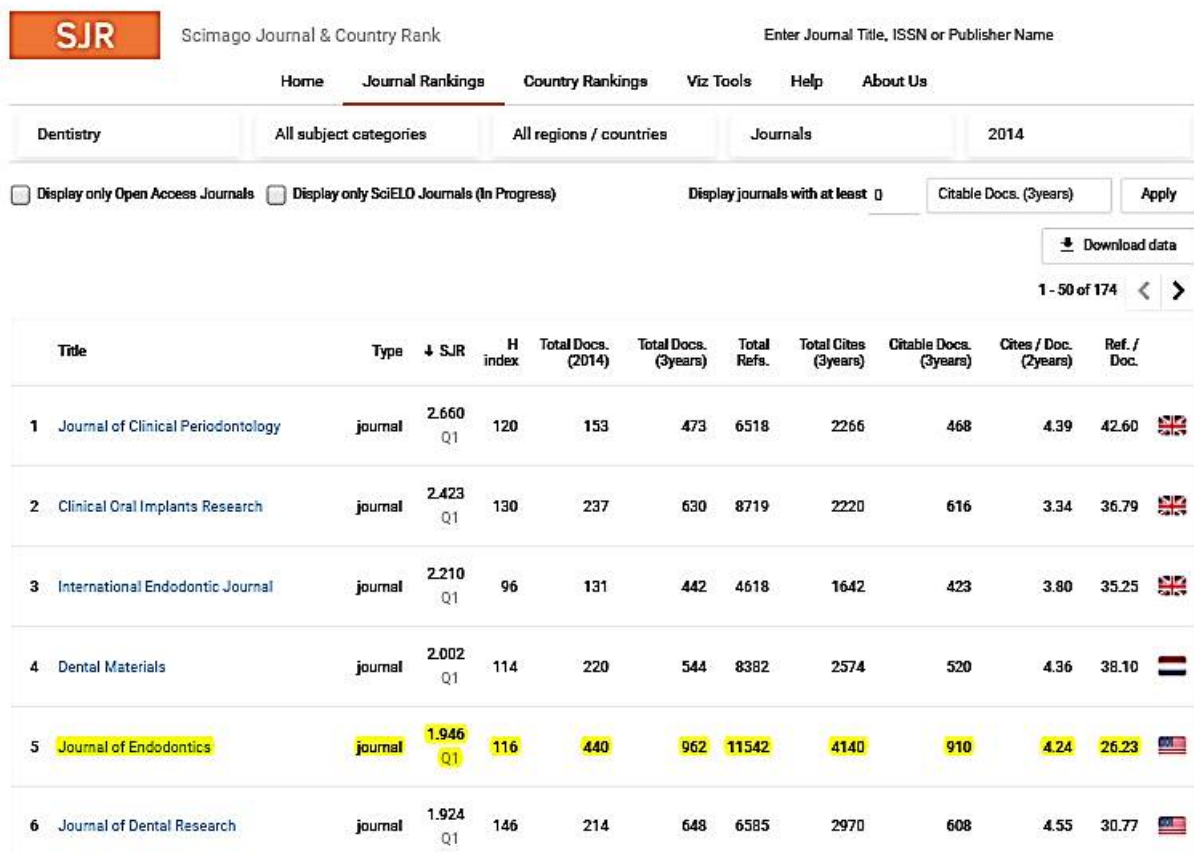
Autores: Lea Assed Bezzerra Silva, Frederic Barnett, José Pumarola-Suñé, **Piedad S. Cañadas**, Paulo Nelson-Filho, Raquel Assed Bezzerra Silva.

Título: “**Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo**”

Publicado en *Journal of Endodontics*. 2014; 40: 1424-8.

**JCR: 3.375 (Q1)**

**SJR: 1.946 (Q1)**



**SJR** Scimago Journal & Country Rank Enter Journal Title, ISSN or Publisher Name

Home **Journal Rankings** Country Rankings Viz Tools Help About Us

Dentistry All subject categories All regions / countries Journals 2014

Display only Open Access Journals  Display only SciELO Journals (In Progress) Display journals with at least 0 Citable Docs. (3years) Apply

[Download data](#)

1 - 50 of 174 < >

Title	Type	SJR	H index	Total Docs. (2014)	Total Docs. (3years)	Total Refs.	Total Cites (3years)	Citable Docs. (3years)	Cites / Doc. (2years)	Ref. / Doc.	
1 Journal of Clinical Periodontology	journal	2.660 Q1	120	153	473	6518	2266	468	4.39	42.60	
2 Clinical Oral Implants Research	journal	2.423 Q1	130	237	630	8719	2220	616	3.34	36.79	
3 International Endodontic Journal	journal	2.210 Q1	96	131	442	4618	1642	423	3.80	35.25	
4 Dental Materials	journal	2.002 Q1	114	220	544	8382	2574	520	4.36	38.10	
5 <b>Journal of Endodontics</b>	journal	<b>1.946</b> <b>Q1</b>	<b>116</b>	<b>440</b>	<b>962</b>	<b>11542</b>	<b>4140</b>	<b>910</b>	<b>4.24</b>	<b>26.23</b>	
6 Journal of Dental Research	journal	1.924 Q1	146	214	648	6585	2970	608	4.55	30.77	



# Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility *In Vivo*

Lea Assed Bezerra Silva, DDS, MSc, PhD,\* Frederic Barnett, MSc, PhD,<sup>†</sup>  
 José Pumarola-Suñé, DDS, MSc, PhD,<sup>‡</sup> Piedad S. Cañadas, DDS,<sup>‡</sup>  
 Paulo Nelson-Filho, DDS, MSc, PhD,\* and Raquel Assed Bezerra Silva, DDS, MSc, PhD\*

## Abstract

**Objective:** This study evaluated the response of apical and periapical tissues of dogs' teeth with pulp vitality after root canal filling with the endodontic sealers Sealapex Xpress and Real Seal XT. **Methods:** Thirty-eight root canals with vital pulp from dogs' premolars were used. After instrumentation, the canals were filled with Sealapex Xpress and gutta-percha (group SX/GP,  $n = 16$ ) or Real Seal XT and Resilon cones (group RS/R,  $n = 22$ ). The animals were killed after 90 days, and the teeth with surrounding tissues were subjected to histotechnical processing. Hematoxylin-eosin–stained sections were examined by conventional light microscopy for a quantitative histopathologic analysis (sealing of apical opening by newly formed mineralized tissue [biological sealing], inflammatory cell infiltrate, root and bone tissue resorption), according to a scoring system. The subsequent sections were evaluated by immunohistochemistry for identification of mineralization markers (osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2). Data were analyzed by nonparametric Mann-Whitney  $U$  test ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** Complete biological sealing was observed in 50% and 22.7% of the specimens of groups SX/GP and RS/R, respectively. Partial biological sealing was observed in 25% and 54.6% and absence of sealing in 25% and 22.7% of the specimens of groups SX/GP and RS/R, respectively. There were no significant differences ( $P > .05$ ) between the groups for the scores attributed to the histopathologic parameters. Positive staining for osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2 was observed in both groups, especially in the periodontal ligament. **Conclusions:** Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility *in vivo* and allow for sealing of apical opening by deposition of mineralized tissue. (*J Endod* 2014;40:1424–1428)

## Key Words

Periapical response, Realseal XT, root canal sealer, Sealapex Xpress, tissue compatibility

The ideal biological response required after endodontic treatment is the complete sealing of the apical opening by deposition of mineralized tissue (biological sealing) (1–4). This process is conditioned to the correct execution of all phases of the endodontic treatment as well as factors inherent to these phases such as the apical limit of root canal instrumentation, the apical limit of filing, and the characteristics of the filling material, which will be in direct contact with the apical and periapical connective tissues (3, 5). It has been demonstrated that several endodontic sealers are irritating to the apical and periapical tissues because of their cytotoxicity, and an area of inflammation of variable magnitude is often observed adjacent to these materials (6, 7). The irritating potential of sealers added to the inflammatory response to the existing pathologic processes and aggression caused by the operative phases of the endodontic treatment could increase the damage to the tissues of the periapex to variable extents. In this case, instead of fulfilling its role of defense and aid in tissue repair, this additional inflammatory reaction could act by inhibiting or delaying the healing process and the occurrence of biological apical sealing.

In the light of these observations, in the last few decades, root canal sealers with different formulations have been studied; those that are based on calcium hydroxide (3) have stood out because of a number of favorable properties, namely tissue compatibility (8, 9), antibacterial (10) and anti-exudative actions (11), creation of favorable conditions for mineralized tissue formation (5, 12–14), necrotic tissue dissolution capacity (15), and hydrolytic action against bacterial endotoxin (16, 17).

The recently launched Sealapex Xpress calcium hydroxide–based sealer (SybroEndo, Orange, CA) is an evolution of well-known Sealapex sealer. Sealapex Xpress is available as a base/catalyst system in automix syringes, which are claimed to simplify setup, delivery, and cleanup as well as offer a more accurate 1:1 ratio with no need of manual mixing of the pastes. It is featured as a non-eugenol material with a high pH. Although the biological properties of Sealapex's original formulation have been extensively investigated (1, 5, 18–21), to the best of our knowledge, no study has yet evaluated the *in vivo* apical and periapical tissue response to its new formulation.

Methacrylate-based resin sealers have been developed as an alternative to the use of conventional endodontic sealers and gutta-percha cones because a good adaptation to the root canal walls and a durable hermetic seal are fundamental requirements for a favorable prognosis after endodontic therapy (22). These materials have been shown to provide a tight adaptation to the dentin walls, a more effective seal of the root canal system, as well as increase root structure hardness (23, 24). According to a report from the United States Food and Drug Administration (25), the recently launched RealSeal Sealer XT (SybronEndo) is a self-etch resin root canal sealer presented in a catalyst/base paste formulation, which combines the 2-hydroxyethyl methacrylate and epoxy

From the \*Department of Paediatric Clinics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; <sup>†</sup>Department of Dental Medicine, Albert Einstein Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania; and <sup>‡</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain. Address reprint requests to Profa Dra Léa Assed Bezerra da Silva, Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do Café s/n, Monte Alegre, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail address: lea@forp.usp.br 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2014 American Association of Endodontists.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.040>

resin chemistry. Because of its self-etch nature and adhesive properties, RealSeal XT does not require the use of an etchant, primer, or adhesive and is used with Resilon cones (Pentron Clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT). The material is packaged in a dual-barrel syringe for the catalyst and base parts and can be mixed by using an automix tip attached to the syringe, or it also can be mixed manually on a paper pad. A recent *in vitro* study has demonstrated that the use of this material reduced marginal microleakage in a bovine incisor root model when compared with long-used zinc oxide–eugenol and epoxy sealers (26). However, there are no *in vivo* studies evaluating the tissue response to the use of this material.

The aim of this study was to evaluate the response of apical and periapical tissues of dogs' teeth with pulp vitality after root canal filling with the endodontic sealers Sealapex Xpress and Real Seal XT.

## Materials and Methods

### Animals

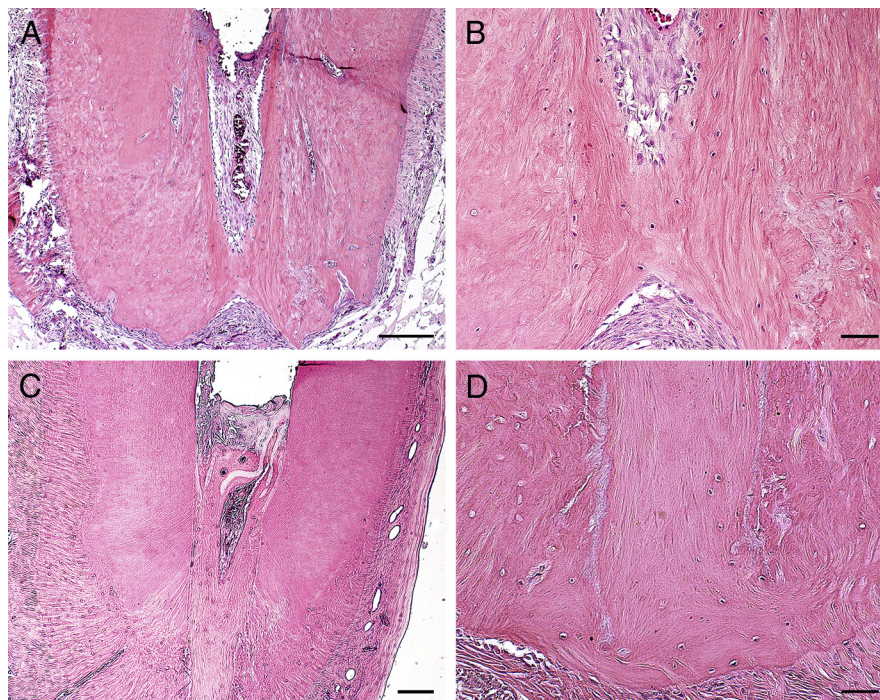
All animal procedures were performed according to the protocols reviewed and approved by the University of São Paulo's Animal Research Ethics Committee in compliance with the applicable ethical regulations of the international guiding principles for biomedical research in animals.

### Operative Procedures

This study was conducted on 38 root canals (19 teeth) from the maxillary and mandibular premolars of 2 beagle dogs (ages 12–18 months and weight 8–15 kg). Briefly, the animals were pre-anesthetized 15 minutes before the operative procedures, and inhala-

tion anesthesia with isoflurane (Abbott Laboratories, St Laurent, Canada) was delivered by using an inhalation anesthesia apparatus (Takaoka KT-20; Takaoka Ind. e Com., São Paulo, SP, Brazil). The root canals were divided into 2 experimental groups; group SX/GP consisted of 16 root canals filled with Sealapex Xpress and gutta-percha cones (Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil) by the lateral condensation technique, and group RS/R consisted of 22 root canals filled with RealSeal XT and Resilon cones, according to the manufacturers' recommendations. The 2 sets of root canal sealer/cone were tested in each of the dogs. RealSeal XT is a provisionally named prototype of a new material (26), so there is yet no information provided by the manufacturer about this sealer's composition. Regarding Sealapex Xpress, the material leaflet informs that it is a calcium hydroxide root canal sealer containing the following active ingredients of this sealer: calcium oxide, trimethylolpropane neopentyl glycol salicylate, and isobutyl salicylate resins.

After anesthesia, the teeth were examined clinically and radiographically before starting the study to confirm the maturation of the roots and absence of disease. The operative field was isolated with a rubber dam and disinfected with 2% chlorhexidine gluconate, and the coronal access was made with high-speed burs under water cooling. The pulp chamber was irrigated with 1% sodium hypochlorite solution, the working length was determined at 2 mm short of the apex, and the root pulps were removed by using a #25 Hedström file (Dentsply/Maillefer Instruments, Ballaigues, Switzerland), followed by irrigation with 1.0% NaOCl. The apical foramen was enlarged by sequential use of #15–#30 K-files (Dentsply/Maillefer) always under irrigation and aspiration with 1.0% NaOCl. Biomechanical preparation was performed to working length up to #50 K-file, and the canals were flushed with 3.6 mL



**Figure 1.** Photomicrographs of representative HE-stained microscopic sections. (A) Apical and periapical regions in specimen filled with Sealapex Xpress showing newly formed apical mineralized tissue, presence of normal periodontal ligament, and absence of apical resorption (original magnification,  $\times 5$ ; scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Detail of (A) showing complete biological sealing consisted of mineralized tissue of cementoid type and presence of numerous bundles of collagen fibers surrounding this tissue (original magnification,  $\times 20$ ; scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). (C) Apical and periapical regions in specimen filled with RealSeal XT showing newly formed apical mineralized tissue, presence of normal periodontal ligament, and absence of apical resorption (original magnification,  $\times 5$ ; scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ). (D) Detail of (C) showing presence of apical sealing and absence of inflammatory reaction (original magnification,  $\times 20$ ; scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).

1% NaOCl at each change of instrument. After instrumentation, the root canals were dried by suction and sterile paper points, filled with buffered 14.3% EDTA (pH 7.4) for 3 minutes, and then irrigated with saline and dried with paper points.

After root canal filling according to each group, excess sealer and cones were removed with a heated instrument, and vertical compaction was applied. Periapical radiographs were taken to evaluate the length and density of the apical seal. On completion of the root canal filling, the canal orifices were sealed with a glass ionomer cement base (Vitrem; 3M Dental Products, St Paul, MN), and the coronal access were restored with amalgam alloy (Sybraloy; Kerr Corporation, Orange, CA). Throughout the experimental phase, dogs were daily monitored for signs of pain associated with the dental procedures and medicated as necessary.

After a 90-day experimental period, the animals were killed with an intravenous overdose of sodium pentobarbital. The maxillas and mandibles with teeth were dissected and sectioned to obtain individual roots, which were fixed in 10% buffered formalin for 72 hours, demineralized in EDTA, and embedded in paraffin. Sagittal 5- $\mu$ m-thick semi-serial sections were obtained, and the sections were stained with hematoxylin–eosin (HE).

**Histopathologic Analysis**

In each group, representative sections were stained with HE for descriptive (qualitative) and quantitative analyses of the apical and periapical regions under conventional light microscopy. The following parameters were evaluated semiquantitatively according to a scoring system: sealing of apical opening by newly formed mineralized tissue: absent (score 0), partial (score 1), and complete (score 2); inflammatory cell infiltrate: absent (score 0), slight (score 1), moderate (score 2), and severe (score 3); root resorption: absent (score 0) and present (score 1); and bone tissue resorption: absent (score 0) and present (score 1).

Data were analyzed statistically by nonparametric Mann-Whitney *U* test at the 5% significance level by using the GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

**Immunohistochemistry Evaluation**

The subsequent sections were evaluated by immunohistochemistry for identification of mineralization markers (osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2). The reactions were performed by using the avidin-biotin-peroxidase complex method (indirect method), as described by da Silva et al (27). The primary antibodies that were used were anti-osteopontin antibody (rabbit polyclonal to osteopontin ab8448; Abcam Inc, Cambridge, MA; diluted 1:100), anti-alkaline phosphatase antibody [4H1] (mouse polyclonal [4H1] to alkaline phosphatase ab54778; Abcam Inc; diluted 1:100), and anti-RUNX2 antibody (rabbit polyclonal to RUNX2 ab23981; Abcam Inc; diluted 1:100). The slides were incubated with biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse immunoglobulin G-B sc-2039 and goat anti-rabbit immunoglobulin G-B sc-2040; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA; diluted 1:200). A negative control was prepared for each specimen by using the same method except for the primary antibody. The results were expressed qualitatively, considering the presence/absence and location of osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2, as described by da Silva et al.

All microscopic analyses were performed under light microscopy by using an Axio Imager.M1 microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) coupled to an AxioCam MRc5 camera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). An experienced, calibrated pathologist blinded to the groups conducted the analyses.

**Results**

**HE Staining**

Complete biological sealing was observed in 50% and 22.7% of the specimens of groups SX/GP and RS/R, respectively (Fig. 1). Partial biological sealing was observed in 25% and 54.6% and absence of sealing in 25% and 22.7% of the specimens of groups SX/GP and RS/R, respectively. In the specimens with complete biological sealing, the newly formed mineralized tissue was of the cementoid type, containing cementocytes inside and cementoblasts at the periphery. The mineralized tissue was formed in the apical foramen region, always reaching the filling material (Fig. 1A and C). The specimens with partial biological sealing presented connective tissue with fibroblasts and numerous collagen fiber bundles extending to the interior of the root canal lumen.

There were no inflammatory cells in 75% of group SX/GP specimens and in 90.9% of the specimens of group RS/R. A mild inflammatory cell infiltrate (scarce and residual inflammatory cells) was observed in 25% and 9.1% of the specimens of groups SX/GP and RS/R, respectively (Fig. 1B and D).

In both groups, there was no resorption of mineralized tissues. The cementum and bone tissue were normal, containing cementoblasts and osteoblasts. Apical resorption was not observed (Fig. 1).

After statistical analysis, it was not possible to observe significant differences ( $P > .05$ ) between the groups for the scores attributed to any of the histopathologic parameters. The statistical results are presented in Table 1.

**Immunohistochemical Evaluation**

Similar positive staining for osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2 was observed in both groups, especially in the periodontal ligament region (Fig. 2). In both groups, strong staining for osteopontin (Fig. 2A–C) and alkaline phosphatase (Fig. 2D) was observed in the periodontal ligament and in the region of the biological apical sealing. In both groups, there was weak staining for RUNX2 only in the periodontal ligament close to the region of biological apical sealing (Fig. 2E).

Figure 3 shows a postoperative radiograph representative of the endodontic treatment in both groups.

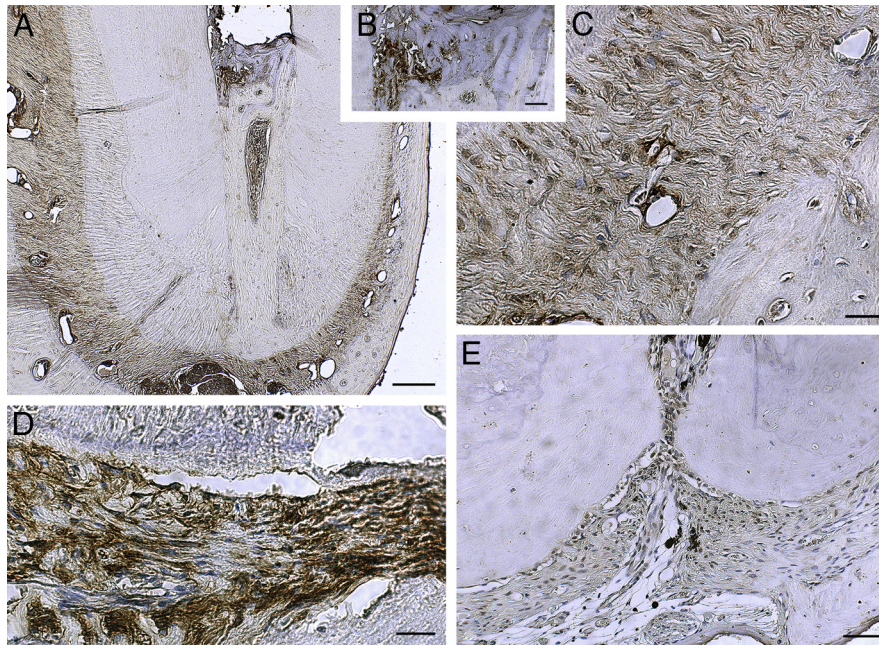
**Discussion**

In the present study, the materials were evaluated regarding their tissue compatibility and ability to promote biological apical sealing in dogs' teeth with pulp vitality. It is known that the conditions to the repair process are more favorable in teeth with pulp vitality, but also that it is the most conducive condition to evaluate the material response because

**TABLE 1.** Statistical Results (median and *P* value) of Comparison between the Endodontic Sealers Sealapex Xpress and RealSeal XT Regarding the Histopathologic Parameters

Histopathologic parameter	Median scores		<i>P</i> value
	Sealapex Xpress	RealSeal XT	
Biological sealing	1.5	1.0	.2946
Inflammatory infiltrate	0.0	0.0	.3193
Root resorption	0.0	0.0	>.9999
Bone resorption	0.0	0.0	>.9999

Sealing of apical opening by newly formed mineralized tissue: absent (score 0), partial (score 1), and complete (score 2); inflammatory cell infiltrate: absent (score 0), slight (score 1), moderate (score 2), and severe (score 3); root resorption: absent (score 0) and present (score 1); and bone tissue resorption: absent (score 0) and present (score 1).



**Figure 2.** Photomicrographs representative of osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2 immunostaining in microscopic sections of specimens filled with Sealapex Xpress and RealSeal XT. (A) Panoramic photomicrograph revealing positive staining for osteopontin, especially in region of periodontal ligament (SX/GP: original magnification,  $\times 5$ ; scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Detail of (A) showing staining of osteopontin in region of biological apical sealing (SX/GP: original magnification,  $\times 20$ ; scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). (C) Detail of (A) showing strong staining of osteopontin in periodontal ligament (SX/GP: original magnification,  $\times 40$ ; scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ). (D) Photomicrograph representative showing strong staining of alkaline phosphatase in periodontal ligament (RS/R: original magnification,  $\times 40$ ; scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ). (E) Photomicrograph representative showing weak staining of RUNX2, especially in periodontal ligament close to region of biological apical sealing (SX/GP: original magnification,  $\times 20$ ; scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).

the effects of infection are not present. After the use of both Sealapex Xpress and RealSeal XT, the periodontal ligament was normal and without inflammatory cells in the majority of cases, highlighting the good tissue tolerance to these sealers. In both groups, there was no resorption of mineralized tissues, and osteoblasts and cementoblasts were present in the bone tissue and cementum, respectively. Even in the 3 cases of extrusion of filling material, tissue compatibility could be observed, because there was no inflammatory reaction surrounding the material within the periapex.

The adhesive resin-based sealer RealSeal XT showed good histologic results, although the frequency of complete apical sealing by deposition of newly formed mineralized tissue was numerically lower when compared with Sealapex Xpress, but not statistically significant. For both

sealers there were cases with formation of partial biological sealing and with connective tissue and numerous collagen fiber bundles extended to the interior of root canal. Possibly if the follow-up period had been longer, the formation of complete biological apical sealing could have been observed in a larger number of cases for both sealers.

This statement can be substantiated by the results of the immunohistochemical analysis, which showed strong staining of osteopontin and alkaline phosphatase in the periodontal ligament and in the region of the apical biological sealing after use of Sealapex Xpress and RealSeal XT. Both proteins are crucial for tissue mineralization and play a key role during this process (28, 29). RUNX2, which is a master gene encoding for a protein involved in osteoblast differentiation (30), was also observed in the specimens of both groups. These results indicate the presence of a suitable microenvironment for biomineralization, which was not disturbed by the presence of the endodontic sealers. Similarly to Rodrigues et al (31), we also observed that endodontic sealers could interfere in the cell's microenvironment by altering cytokine release and/or cell differentiation and function.

The lack of studies evaluating the tissue response to the use of Sealapex Xpress precludes a direct comparison with the results of the present investigation. However, previous studies that used the original formulation of Sealapex demonstrated a capacity for inducing mineralized tissue deposition and promoting apical sealing (5, 18, 19), because calcium hydroxide is the basic component of different formulations. Sealapex Xpress also has the ability to induce apical biological sealing in addition to presenting improved physicochemical properties, according to the manufacturer's recommendations. As described by Wong et al (26), RealSeal XT sealer is a provisionally named prototype of a new material. Therefore, there is no manufacturer's information on the possible modifications that would improve its properties, including tissue compatibility.



**Figure 3.** Postoperative radiograph representative of endodontic treatment in both groups.

In this study, there was no statistically significant difference between the cements RealSeal XT and Sealapex Xpress with relation to histologic parameters evaluated. However, numerically, Sealapex Xpress presented complete sealing of the apical opening by the formation of mineralized tissue in 50% of cases, which could be attributed to the presence of calcium hydroxide in its chemical composition. According to Desai and Chandler (3), the 2 main reasons for using a calcium hydroxide-based filling material are the ability to promote the repair and its antimicrobial potential. Its high pH promotes an initial degenerative response that is immediately followed by the mineralization response (32). This alkaline pH also activates enzymes alkaline phosphatase and calcium concentration-dependent adenosine triphosphatase, which are directly involved in the formation of mineralized tissue (33).

This is the first study evaluating *in vivo* tissue response to the use of Sealapex Xpress and RealSeal XT. However, more studies are needed that involve evaluation of physical, chemical, mechanical, and antimicrobial properties also in teeth with necrotic pulp and apical periodontitis to confirm the clinical efficacy of these new endodontic sealers.

The endodontic sealers Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility *in vivo* and allow for sealing of apical opening by deposition of mineralized tissue.

## Acknowledgments

*The authors deny any conflicts of interest related to this study.*

## References

- Holland R, de Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod* 1985;11:535–43.
- Leonardo MR, Flowers DS, Paula E Silva FW, et al. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using Roeko Seal and AH plus root canal sealers: the histopathological evaluation. *J Endod* 2008;34:822–5.
- Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod* 2009;35:475–80.
- Silva-Herzog D, Ramirez T, Mora J, et al. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:440–6.
- Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS, et al. Calcium hydroxide root canal sealers: histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod* 1997;23:428–32.
- Ashraf H, Moradimajid N, Mozayeni MA, et al. Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dent Res J (Isfahan)* 2012;9:549–53.
- Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, et al. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod* 2012;38:1233–8.
- Nelson-Filho P, Silva LA, Leonardo MR, et al. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J* 1999;32:303–11.
- Lu Y, Liu T, Li X, et al. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:e78–84.
- Farac RV, Pizzolitto AC, Tanomaru JM, et al. Ex-vivo effect of intracanal medications based on ozone and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J* 2013;24:103–6.
- Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:240–4.
- Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541–8.
- Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther* 2006;13:611–20.
- Wang S, Sasaki Y, Ogata Y. Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human osteoblast-like Saos2 cells. *J Oral Sci* 2011;53:77–86.
- Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988;14:125–7.
- Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694–6.
- Silva LA, da Silva RA, Branco LG, et al. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2008;19:296–300.
- Sonat B, Dalat D, Gunhan O. Periapical tissue reaction to root fillings with Sealapex. *Int Endod J* 1990;23:46–52.
- Cobankara FK, Orucoglu H, Sengun A, Belli S. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. *J Endod* 2006;32:66–8.
- Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, et al. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J* 2011;22:203–11.
- Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res* 2012;26:424–30.
- Nawal RR, Parande M, Sehgal R, et al. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttatflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J* 2011;44:307–13.
- Gesi A, Raffaelli O, Goracci C, et al. Interfacial strength of Resilon and gutta-percha to intraradicular dentin. *J Endod* 2005;31:809–13.
- Pameijer CH, Zmener O. Resin materials for root canal obturation. *Dent Clin North Am* 2010;54:325–44.
- Food and Drug Administration, K102163. Access data FDA; 2010 Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/K102163.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K102163.pdf). Accessed February 28, 2014.
- Wong JG, Caputo AA, Li P, White SN. Microleakage of adhesive resinous materials in root canals. *J Conserv Dent* 2013;16:213–8.
- da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, et al. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod* 2012;38:803–13.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279–303.
- Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010;77:4–12.
- Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2012;8:891–7.
- Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human *in vitro* osteoclastogenesis. *J Endod* 2013;39:833–8.
- Manhart MJ. The calcium hydroxide method of endodontic sealing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54:219–24.
- Stock CJ. Calcium hydroxide: root resorption and perio-endo lesions. *Br Dent J* 1985;158:325–34.





## Publicación núm. 3








Autores: L.A.B. Silva, L.U. Azevedo, A. Consolaro, F. Barnett, Y. Xu, R.A. Battaglino, **P.S. Cañadas**, Katharina Morant Holanda de Oliveira, R.A.B. Silva.

Título: “***Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue***”

Publicado en *Clinical Oral Investigations*. 2017; 21: 2851-61.

**JCR: 2.352 (Q1)**

**SJR: 0.983 (Q1)**

21	Caries Research	journal	1.048 Q1	80	72	228	2745	510	209	1.99	38.13	
22	Journal of Prosthetic Dentistry	journal	1.047 Q1	102	360	771	7478	1580	693	2.17	20.77	
23	International Journal of Prosthodontics	journal	1.012 Q1	80	127	270	1773	419	234	1.58	13.96	
24	Clinical Oral Investigations	journal	0.983 Q1	57	395	848	11244	1851	780	2.04	28.47	
25	Orthodontics and Craniofacial Research	journal	0.948 Q1	46	31	108	755	150	104	1.28	24.35	
26	International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	journal	0.935 Q1	80	254	752	6801	1340	692	1.87	26.78	
27	Journal of Prosthodontic Research	journal	0.904 Q1	21	78	135	1515	283	108	2.52	19.42	



# Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue

L. A. B. Silva<sup>1</sup> · L. U. Azevedo<sup>1</sup> · A. Consolaro<sup>2</sup> · F. Barnett<sup>3</sup> · Y. Xu<sup>4</sup> · R. A. Battaglini<sup>5</sup> · P. S. Cañadas<sup>6</sup> · Katharina Morant Holanda de Oliveira<sup>1</sup> · R. A. B. Silva<sup>1</sup>

Received: 15 June 2016 / Accepted: 20 February 2017 / Published online: 9 March 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

## Abstract

**Objectives** The objective of the present study is to evaluate the in vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of two novel endodontic sealers: RealSeal XT1 and Sealapex Xpress on the subcutaneous connective tissue of mice.

**Materials and methods** The cytotoxicity was assessed by cell viability using the MTT assay (one-way ANOVA), trypan blue test (Mann-Whitney) and cell apoptosis by flow cytometer. For the subcutaneous study, polyethylene tubes filled with the sealers were implanted in 70 BALB/c mice: 6 experimental groups ( $n = 10/\text{group}$ ) and 2 control groups with empty tubes ( $n = 5/\text{group}$ ). At the end of experimental periods (7, 21, and 63 days), the tissue was removed and histotechnically processed. Angioblastic proliferation and edema (Fisher's exact test) were evaluated, besides thickness measurement ( $\mu\text{m}$ ) of the reactionary granulomatous tissue

and neutrophil counts (Kruskal-Wallis and Dunn's post test; Mann-Whitney) ( $\alpha = 0.05$ ).

**Results** MTT assay, trypan blue, and analysis of apoptotic cells showed a dose-dependent direct effect: the more diluted the sealer, the less cytotoxic. Regarding the angioblastic proliferation and edema, difference between the sealers at 7 and 63 days occurred ( $p < 0.05$ ). Both endodontic sealers initially promoted perimaterial tissue reaction as a foreign body granuloma and thus stimulated favorable tissue responses.

**Conclusions** Both sealers showed a dose-dependent effect and promoted satisfactory subcutaneous tissue response; the sealer Sealapex Xpress was less cytotoxic and more biocompatible than RealSeal XT.

**Clinical relevance** The step of root canal filling during endodontic treatment is highly important for the preservation of the periapical tissue integrity. Subcutaneous reaction to endodontic sealers enables scientific basis for clinical use.

✉ Katharina Morant Holanda de Oliveira  
kmho@usp.br

<sup>1</sup> Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café s/n, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil

<sup>2</sup> Department of Oral Pathology, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil

<sup>3</sup> Department of Dental Medicine, Albert Einstein Medical Center, Philadelphia, PA, USA

<sup>4</sup> Department of Skeletal Biology, The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

<sup>5</sup> Department of Physical Medicine and Rehabilitation, University of Colorado School of Medicine, Denver, CO, USA

<sup>6</sup> Department of Endodontics, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Keywords** Endodontic sealers · Mice · Tissue response · Biocompatibility · Cytotoxicity · Cell viability

## Introduction

Root canal filling during endodontic treatment is highly important for the preservation of the periapical tissues' integrity [1]. Currently, there are many sealers commercially available that present distinct chemical, biological, mechanical, and physical properties. Among these materials, the novel endodontic sealer called Sealapex Xpress (SybronEndo Corp., Orange, CA, USA) was recently introduced as an evolution of the previous sealer, Sealapex. Sealapex Xpress is an automix, a calcium hydroxide base/catalyst syringe system that presents an alkaline pH. RealSeal XT (SybronEndo Corp., Orange, CA, USA), an evolution of the previous

RealSeal, is a methacrylate epoxy resin-based sealer. This sealer is not yet commercially available. It can be used with a dual-output syringe but can also be manually mixed.

Our research group previously showed, *in vivo*, that Sealapex Xpress and RealSeal XT stimulated the expression of mineralization markers (osteopontin, alkaline phosphatase, and RUNX2), mild inflammatory reaction, and apical deposition of mineralized tissue after endodontic treatment in dogs' teeth [2].

The diversity of the filling materials requires evaluation of their biological response in cell culture and in animal models prior to their use in clinical trials. Studies in cell cultures demonstrated that monomers of methacrylate and triethylene glycol dimethacrylate—present in restorative materials—may affect the recruitment of leukocytes in local inflammation, decreasing the expression of intercellular adhesion molecules and inducing enzymatic activity and expression of growth factors and cytokines [3, 4]. In addition, monomers of resin could suppress mitochondrial activity of macrophages and could alter the inflammatory responses [5, 6].

Several papers attempted to evaluate the subcutaneous tissue response of some endodontic sealers [7–9]. However, these studies only evaluated the tissue response after the use of the older versions of RealSeal XT and Sealapex Xpress [10–12].

Thus, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* biocompatibility of two novel endodontic sealers: RealSeal XT1 and Sealapex Xpress on the subcutaneous connective tissue of mice.

## Materials and methods

### Material preparation

To assess the *in vitro* cytotoxicity, the preparation of the materials was based on the standards ISO 10993-12:2007 [13] and ISO 10993-5:2009 [14]. Sealapex Xpress's active ingredients (SybronEndo Corp., Orange, CA, USA) are calcium oxide, trimethylol propane, neopentyl glycol, and salicylate and isobutyl salicylate resins. Also, RealSeal XT (SybronEndo Corp., Orange, CA, USA) is a provisionally named prototype of a new material, so there is yet no information provided by the manufacturer about this sealer's composition.

The endodontic sealers were prepared in accordance with the manufacturer's instructions, both in a base/catalytic system in a 1:1 ratio, at room temperature for 15 s. The confirmation of the initial cure was determined to be the point at which a needle could no longer indent the surface of the sample. Of both the methacrylate/epoxy resin-based sealer (RealSeal XT, SybronEndo Corp., Orange, CA, USA) and the calcium hydroxide-based sealer (Sealapex Xpress,

SybronEndo Corp., Orange, CA, USA), 0.3 mL was inserted into a 24-well cell culture plate (Cell Wells, 25820, Corning Glass Workers, NY, USA). Then, the plate was sterilized by UV radiation for 1 h. After that, 1.5 mL of DMEM-c was added to the wells and the plates were kept in a humidified incubator containing 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After this period, the supernatants were collected and added to 2-mL microtubes.

### Cells

RAW 264.7 cells of the macrophage lineage were spread ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) in 24-well cell culture plates with DMEM-c and placed in an incubator for 24 h. Then, the medium was aspirated and 500  $\mu$ L of solution previously prepared with the sealers was added in dilutions of 1:20, 1:100, and 1:500. For controls, only DMEM-c or lipopolysaccharide (LPS) (10 g/mL of DMEM-c) was used. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

### Viability tests and cell proliferation

Cell viability of the RAW 264.7 cells in the different dilution groups was evaluated by MTT colorimetric assay (bromide 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

A 5% MTT solution was added and maintained at 37 °C, in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, for 4 h. After this period, the cultures were washed with 1 mL of warmed PBS. Then, 1 mL of a solution of acid isopropanol was added in each well for 5 min under agitation to complete the dissolution of the precipitate. Aliquots of 100  $\mu$ L were removed from the wells and transferred to a 96-well plate for measurement in a colorimetric spectrophotometer (570 nm;  $\mu$ Quanti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Results were obtained from nine samples per experimental group ( $n = 9$ /group) and were expressed as a percentage of viable cells.

In addition, the trypan blue test was used to evaluate the number of unviable cells after contact with the different materials. For this protocol, the medium in contact with the cells was removed and replaced by trypsin 0.12% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 min to promote the breakdown of the cells with the substrate. Then, 50  $\mu$ L of this cell suspension was aliquoted and 50  $\mu$ L of a 0.04% trypan blue solution was added (Sigma-Aldrich) at room temperature for 2 min. trypan blue solution stains the cytoplasm of unviable cells in blue. To perform the cell count, 10  $\mu$ L of solution was placed in a hemocytometer in an inverted light microscope (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). The cell count was performed on total number and non-viable cells, and the percentage of unviable cells was calculated from four samples per group ( $n = 4$ /group).

## Analyses of apoptotic cells

The proportion of cells that displayed changes in their cytoplasmic membrane—a typical event in the initial process of apoptosis—was determined by a flow cytometry after 24 h of exposure to the different materials (in 1:20, 1:100, and 1:500 dilutions), using the FITC Annexin V kit (BioLegend, San Diego, CA, USA). As a control, LPS (10 µg/mL) and Staurosporine 200 nM were used. RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/well) were seeded in a six-well cell culture plate overnight. After this period, cells were trypsinized, washed twice with BioLegend's Cell Staining, and resuspended in 100 µL of Annexin V marker. Then, the cell suspension was transferred to a 50-mL tube and 2.5 µL of FITC Annexin V and 2.5 µL of 7-AAD Tracer Solution were added. After shaking, the cells were incubated for 15 min at room temperature (25 °C) in the absence of light. Analysis was performed in a flow cytometer (FACSCanto, BD, San Jose, CA, USA), using the FACSDiva software (BD) and expressed as percentage of cells undergoing apoptosis.

## Animals

Seventy male BALB/c isogenic mice, 6 to 8 weeks of age (15–20 g), were divided into eight groups (experimental and control). Table 1 presents the group distribution. After the approval of the Institutional Animal Ethics Committee from the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo (#2013.1.1403.58.8), the animals were anesthetized with an intramuscular injection of 0.20 mL/kg of 10% ketamine (Agener Union National Pharmaceutical Chemistry S/A, Embu, SP, Brazil) and 0.8 mL/kg xylazine (Dopaser, Calier Laboratories, SA, Barcelona, Spain), respectively. The dorsal region of the animal was shaved, and antisepsis of the region was performed with 1% chlorhexidine gluconate. Then, a 1-cm incision was performed on the dorsal region, followed by tissue divulsion and insertion of polyethylene tubes containing the sealers.

## Tube preparation

Polyethylene tubes were used, as recommended by the standards ISO 10993-12:2007 [13]. Seventy polyethylene tubes with a height of 5 mm and a diameter of 1.5 mm were prepared. The tubes were sealed on one side with heated clinical forceps and then sterilized in ethylene oxide. The endodontic sealers RealSeal XT and Sealapex Xpress (both in the system base/catalyst in the ratio 1:1) were prepared at room temperature according to the manufacturer's instructions. The polyethylene tubes were completely filled with the sealers. After placing the polyethylene tube into the tissue, the skin was sutured. The animals were kept in the animal facility at the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São

**Table 1** Experimental group distribution (subcutaneous study)

Groups	Material	Number of animals	Periods (days)
I	RealSeal XT1	10	7
II	RealSeal XT1	10	21
III	RealSeal XT1	10	63
IV	Sealapex Xpress	10	7
V	Sealapex Xpress	10	21
VI	Sealapex Xpress	10	63
VII	Empty tube	5	7
VIII	Empty tube	5	21

Paulo, during the experimental periods of 7, 21, and 63 days, with food and water ad libitum. At the end of each experimental period, all animals were euthanized by anesthetic overdose. The following set was removed: the polyethylene tube, the surrounding portion of the subcutaneous connective tissue, and the skin. The removed tissue was fixed in 10% buffered formalin for 48 h and was submitted to routine histotechnical processing. Serial 5-µm-thick sections were obtained (parallel to the tube's long axis) and stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic analysis.

## Descriptive microscopic analyses

Two calibrated pathologists analyzed the specimens at  $\times 25$ ,  $\times 50$ ,  $\times 100$ , and  $\times 200$  magnifications under a light binocular microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). The pathologists analyzed the sections blinded and independently. After this, the analysis was confronted. It was concluded that as both analyses were similar with no conflict between them, they were summarized into one. The tissue reaction to the materials in comparison with the control group was evaluated by a descriptive microscopic analysis.

## Score analysis of the angioblastic proliferation and the edema

The study design and parameters for tissue reaction evaluation were in accordance with the ISO 10993-6 (2007) standard and based on previous studies [15, 16]. The angioblastic proliferation and the edema were scored for the microscopic analysis of the peripheral tissue. A four-point (0–3) scoring system was used for the semiquantitative analysis, considering the following criteria: score 0—number of vessels similar to the normal conjunctive tissue; score 1—minimal capillary proliferation, focal, with a total number slightly more than in normal connective tissue, well-formed collagen fibers arranged in bundles observed between these vessels; score 2—newly formed vessels with red blood cells inside, with few collagen fibers arranged between them (with supporting fibroblastic structures); the number of these vessels is higher than those

observed in the same area with score 1; and score 3—presence of extensive band of capillaries, with very thin walls and red blood cells inside; area shows few collagen fibers in bundles, and fewer fibroblast cells are observed between the vessels than organized collagen fibers [15].

The following scores were considered for the analysis of edema: score 0—individualization of collagen fibers without the presence of negative spaces between them; score 1—small irregular negative spaces between the collagen fibers and presence of fibroblast and inflammatory cells; score 2—larger irregular spaces between the collagen fibers, which appear to be thin and also irregular and sometimes interrupted, in addition to the absence of extracellular matrix in the perivascular spaces; and score 3—large negative spaces and irregular collagen fibers distributed randomly, associated with large perivascular negative spaces and without associated collagen fibers.

### Quantitative analysis of reactionary granulomatous tissue thickness and the number of neutrophils

A quantitative analysis was performed by measuring the reactionary granulomatous tissue ( $\mu\text{m}$ ), as well as counting the neutrophils in the peritubular tissue of each sample in the experimental and control groups.

Microscopic images were obtained and analyzed with the AxioVision software for the microscope Axio Imager M1, with an attached camera AxioCam MRC5 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

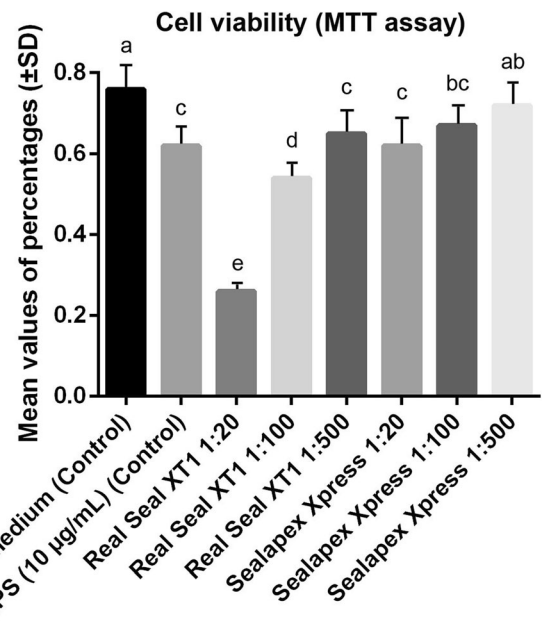
### Statistical analyses

Data was analyzed using the statistical software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), using the one-way ANOVA test for the MTT assay and the Mann-Whitney test for the analysis of the trypan blue test; the Fisher exact test was used to analyze the angioblastic proliferation and edema scores. Kruskal-Wallis with Dunn's post test and Mann-Whitney test were used to analyze the continuous variables (thickness of the reactionary granulomatous tissue and neutrophil count). The significance level was 5%.

## Results

### Viability and cell proliferation

The RAW 264.7 macrophage viability assessed by MTT assay is expressed in Fig. 1. After MTT assay, we could observe that the Sealapex Xpress was less cytotoxic than the RealSeal XT sealer ( $p > 0.05$ ). In addition, the 1:500 dilution of Sealapex Xpress sealer was similar to the negative control group



**Fig. 1** Mean values of percentages and standard deviation of cell viability (MTT assay) after stimulation of RAW 264.7 cells with Sealapex Xpress and RealSeal XT in different dilutions. Same letters mean absence of statistically significant differences (one-way ANOVA,  $p > 0.05$ )

(culture medium without any stimulus). In relation to the RealSeal XT sealer, the 1:500 dilution showed no statistically significant difference when compared to the 1:20 and 1:100 dilutions from Sealapex Xpress. On the other hand, the 1:20 dilution of RealSeal XT was the most cytotoxic to RAW 264.7 cells (0.26), being even more cytotoxic than the positive control (LPS = 0.62).

The percentage of RAW 264.7 unviable cells assessed by the trypan blue test is expressed in Table 2. From the results obtained by the trypan blue test, it was possible to observe that

**Table 2** Values in percentage (%) of unviable RAW 264.7 line cells marked by trypan blue test after stimulation with Sealapex Xpress and RealSeal XT sealers in different dilutions

Groups	Cells marked by trypan blue (%)
DMEM-c medium (control)	1.25 (0.83–1.71) F
LPS (10 µg/mL) (control)	72.50 (71.57–73.45) A
RealSeal XT1 1:20	28.11 (22.45–34.11) B
RealSeal XT1 1:100	8.80 (8.15–10.40) D
RealSeal XT1 1:500	3.97 (2.61–5.05) E
Sealapex Xpress 1:20	16.58 (13.04–21.07) C
Sealapex Xpress 1:100	8.90 (7.20–12.65) D
Sealapex Xpress 1:500	6.55 (5.05–8.50) DE

Values were expressed as median (percentile 25–percentile 75). Same letters mean absence of statistically significant difference (Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ )

the dilution ratio of 1:20 for both sealers was more cytotoxic to the macrophage line RAW 264.7 compared to the dilutions of 1:100 and 1:500. Interestingly, the 1:500 dilution of both sealers presented no statistically significant difference.

For both sealers, MTT assay and the trypan blue test showed a dose-dependent effect: the more diluted is the sealer, the less cytotoxic it was for the cells.

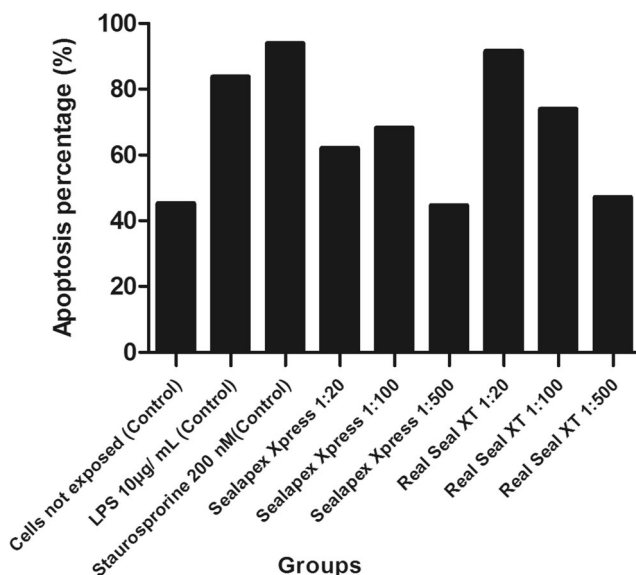
### Analysis of apoptotic cells

The results of this representative experiment to detect RAW 264.7 cells undergoing apoptosis, expressed as percentage, are shown in Fig. 2.

It was possible to note that the more diluted the material is (1:500), the lower the percentage of apoptotic cells is, reaching a value close to that obtained by negative control (45.3%). The RealSeal XT dilution of 1:20 showed the greater percentage of cells undergoing apoptosis, with values closer to those obtained in positive controls (Staurosporine—93.9% and LPS—83.7%).

### Descriptive microscopic analyses

We observed an accumulation of macrophages in the RealSeal XT group at 7 days, representing a foreign body reaction, with a fibrous connective tissue forming a peripheral capsule at the granuloma. Also, there were multinucleated giant cells, neutrophils, lymphocytes, and a discreet angioblastic proliferation. At 21 days, an increased fibrosis was more evident as well as foreign body-type granulomas, with punctual



**Fig. 2** Values in percentage of cells undergoing apoptosis obtained after stimulation of RAW 264.7 cells with the endodontic sealers in different dilutions (1:20, 1:100, and 1:500)

neutrophils, edema, and angioblastic proliferation. After 63 days, macrophages with material inside of them occupied a larger area compared to the previous periods. The fibrous tissue peripheral to the granuloma was more fibrous with well-organized fibroblasts (Fig. 3).

There was a necrotic zone of tissue coagulation in the Sealapex Xpress group at 7 days, with a higher number of neutrophils compared to RealSeal XT1. There was a slight tissue fibrosis, organized fibroblasts, sparse neutrophils, and macrophages. At 21 days, there was a reduction in the thickness of the coagulated necrosis band and the macrophages had less material inside. Peripheral fibrosis was higher, and angioblastic proliferation was eventual. At 63 days, there was a clear reduction of tissue and material thickness, with punctual foreign body granulomas. The fibrous capsules were thinner, with more collagen fibers and with minimal dispersed eosinophils (Fig. 4).

In the control group, the tissue reaction in the opened side of the tube showed a strong presence of fibroblasts, permeated by macrophages and eventual neutrophils after 7 days. There were no inflammatory multinucleated giant cells. In contrast with this opened end, the tissue response was much less exuberant on the side walls of the polyethylene tube. At 21 days, the tissue reaction at the opened end of the tube had less thickness compared to the 7-day period. The degree of fibrosis was lower, and the macrophages were associated with eventual neutrophils and inflammatory multinucleated giant cells (Fig. 5).

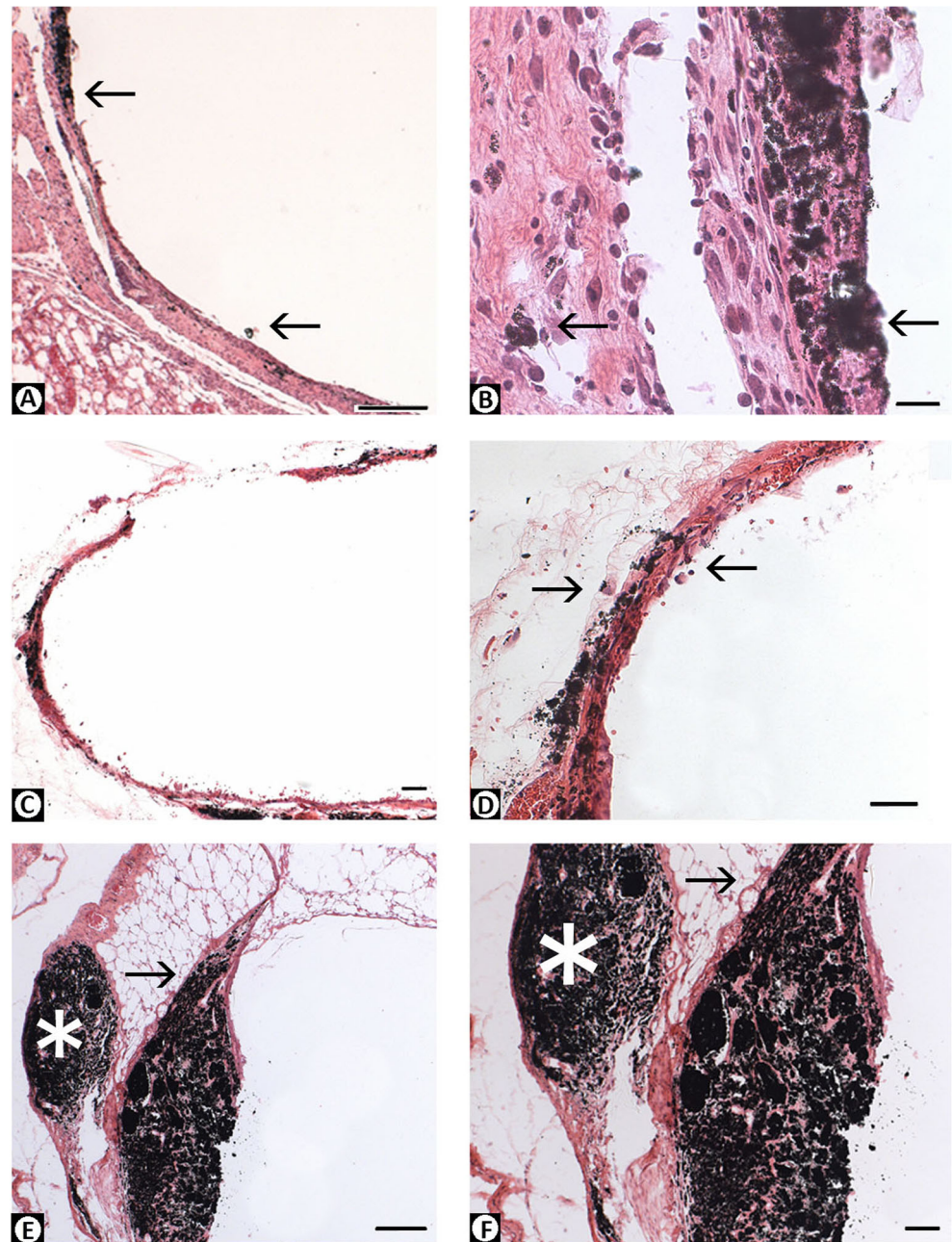
### Semiquantitative analysis of the angioblastic proliferation and edema

Table 3 shows the comparisons between groups in each experimental period. A statistically significant difference in angioblastic proliferation after 7 days was observed between the control group and Sealapex Xpress, as well as between both sealers ( $p < 0.05$ ). During this period, the RealSeal group showed higher frequency of score 2 (70%), which presents newly formed vessels with few collagen fibers between them. The Sealapex Xpress group presented score 1 for all specimens (100%), which is represented by newly formed vessels with slightly greater numbers. The Sealapex Xpress and control groups presented a significant difference ( $p < 0.05$ ) after 21 days, with a prevalence of score 2 (55.56%). During this period, there was no difference between the control group and the RealSeal group; both groups showed predominance of scores 0 and 1. At 63 days, statistical significance was only observed between the sealers. The RealSeal group had a score of 0 in 100% of the specimens ( $p < 0.05$ ).

Regarding the presence of edema, at 7 days, a statistically significant difference was found between the control group and the Sealapex Xpress group and between both sealers ( $p < 0.05$ ). A score of 1 was predominant (80%) in the



**Fig. 3** RealSeal XT. **a, b** 7 days. Connective tissue with moderate fibrosis and many macrophages laden with particles of the material (*arrows*). Far from the interface with the material, several macrophages carrying particles of the material representing a foreign body granuloma. The thickness of the tissue reaction is greater than in the control group (*scale bar* = 500 and 50  $\mu\text{m}$ , respectively). **c, d** 21 days. Tissue reaction with intense fibrosis and many macrophages with material particles (*arrows*) representing a foreign body granuloma (*scale bar* = 200 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively). **e, f** 63 days. Granulomatous tissue reaction with many macrophages with particles of material separated by delicate bundles of fibrous connective tissue. On the periphery, there is a tenuous fibrous tissue (*arrows*). There is a similar reaction around a small amount of material outside the polyethylene tube (*asterisks*) (*scale bar* = 500 and 200  $\mu\text{m}$ , respectively)

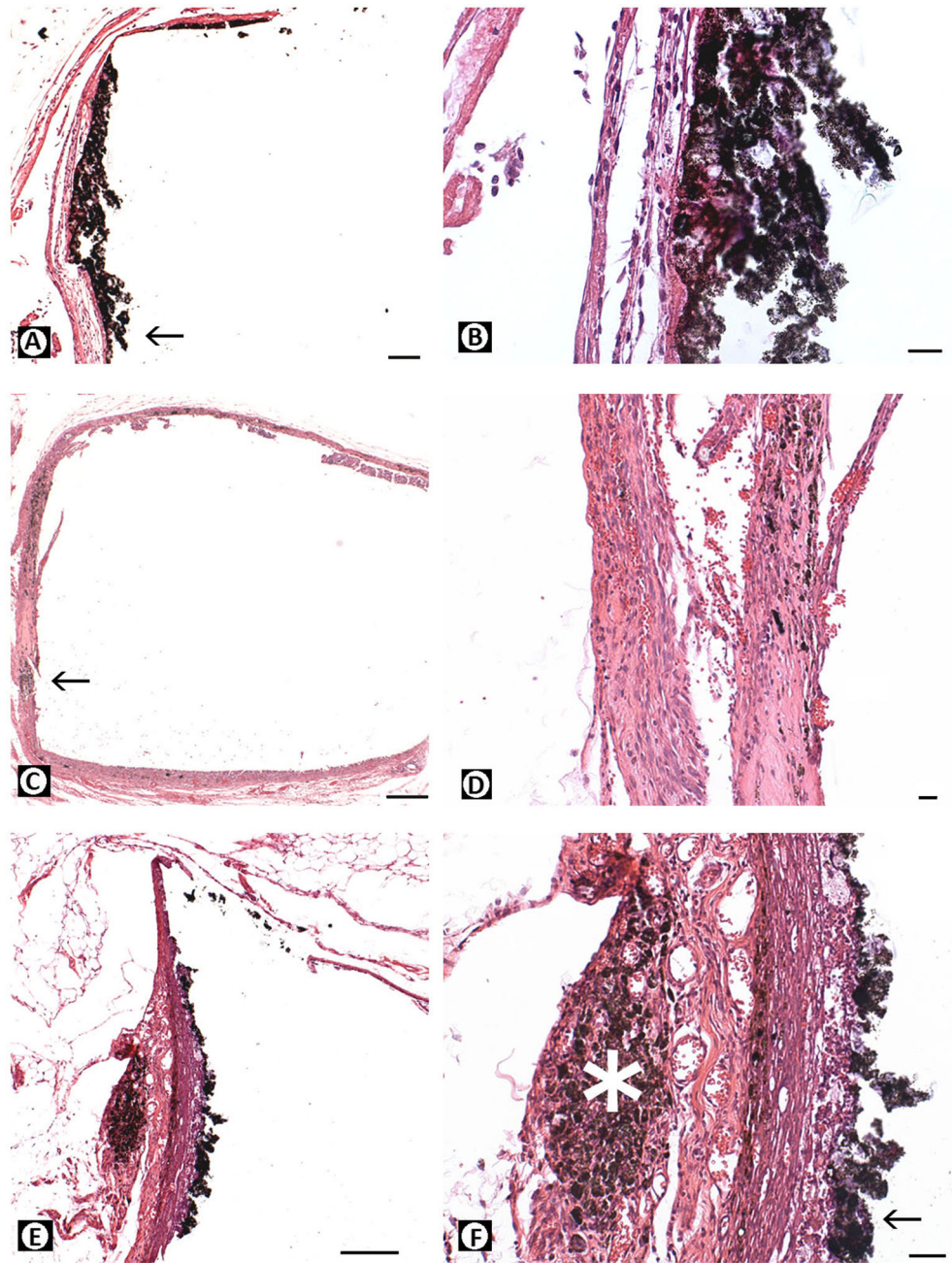


RealSeal group. This score shows small irregular negative spaces between the collagen fibers and the presence of fibroblast and inflammatory cells. A score of 2 was found in 100% of the specimens in the Sealapex Xpress, in which large irregular spaces between the thin and irregular collagen fibers are found with no extracellular matrix in the perivascular spaces. At 21 days, no statistically significant differences were observed between groups, since that there was a predominance of score 0 ( $p > 0.05$ ). At 63 days, a statistically significant difference was observed between the sealers ( $p < 0.05$ ). The RealSeal group had a score of 0 in 100% of the specimens.

#### Analysis of the thickness of the reactionary granulomatous tissue and number of neutrophils

The thickness values of the reactionary granulomatous tissue are shown in Fig. 6. At 7 days, both sealers stimulated tissue formation with a similar thickness. There was no statistically significant difference between groups ( $p = 0.11$ ). At 21 days, there was no statistically significant difference between the sealers ( $p > 0.05$ ); however, a statistically significant difference between the Sealapex Xpress and the control group ( $p = 0.01$ ) was observed at this period; the Sealapex Xpress was significantly thicker.

**Fig. 4** Sealapex Xpress. **a, b** 7 days. Tissue reaction with mild fibrosis and thin thickness. At the interface with the material, there are occasional macrophages carrying particles of the material (*arrow*) (*scale bar* = 200 and 50  $\mu\text{m}$ , respectively). **c, d** 21 days. Tissue reaction with intense fibrosis and macrophage infiltration carrying particles of the material (*arrow*). The reaction tissue presents casual polymorphonuclear leukocytes and no edema (*scale bar* = 500 and 50  $\mu\text{m}$ , respectively). **e, f** 63 days. Tissue reaction with intense fibrosis and many macrophages carrying particles in the interface with the material (*arrow*). Note few PMNs. On the periphery, there are material fragments showing a tissue reaction similar to the tissue in the interface, characterized by granuloma of the foreign body (*asterisk*) (*scale bar* = 500 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively)



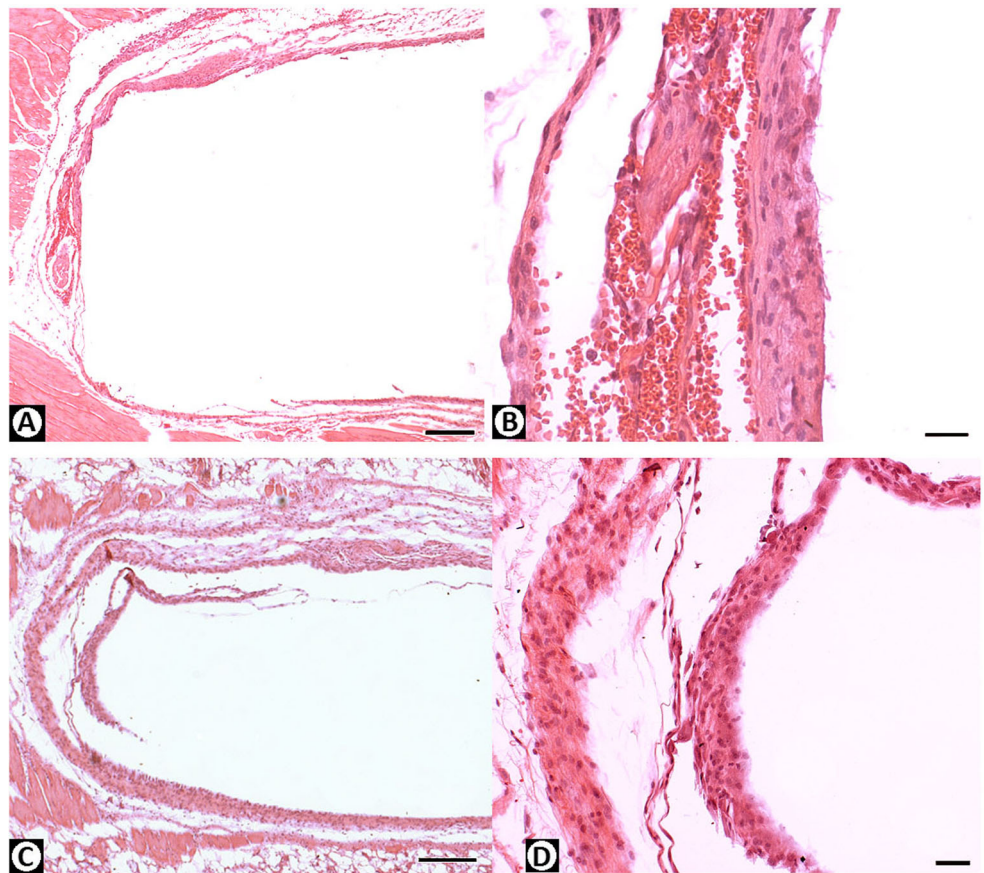
At 63 days, both sealers presented similar thickness values, with no statistically significant difference between them ( $p = 0.43$ ).

Figure 7 shows the counting of neutrophils. There was no statistically significant difference between groups at 7 days ( $p = 0.96$ ) or 21 days ( $p = 0.21$ ). At 63 days, there were no neutrophils in the Sealapex Xpress group; this was statistically different in comparison with the RealSeal group ( $p = 0.04$ ). The Sealapex Xpress group showed a declining trend in the number of neutrophils over the three time periods.

**Discussion**

The root canal filling should be considered a critical step of endodontic treatments. This step must be performed using an endodontic sealer that promotes a hermetic sealing to prevent the movement of periapical fluid, microorganisms and their products, or reinfection of root canals [17, 18]. Moreover, the sealers should have satisfactory physical and chemical properties and should not promote exacerbated tissue response. The toxic effect of the materials used in endodontic therapy is of particular concern since it can cause periapical tissue

**Fig. 5** Control group. **a, b** 7 days. Connective tissue with mild fibrosis (*scale bar* = 500 and 50  $\mu\text{m}$ , respectively). **c, d** 21 days. Highly collagenized connective tissue (*scale bar* = 500 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively)



degeneration and can delay or prevent the repair process. After insertion into the root canal, the filling material contacts the cells of the periapical tissue and releases substances that may or may not be harmful. This highlights the importance of *in vitro* and *in vivo* studies in evaluating the possible cytotoxic effects.

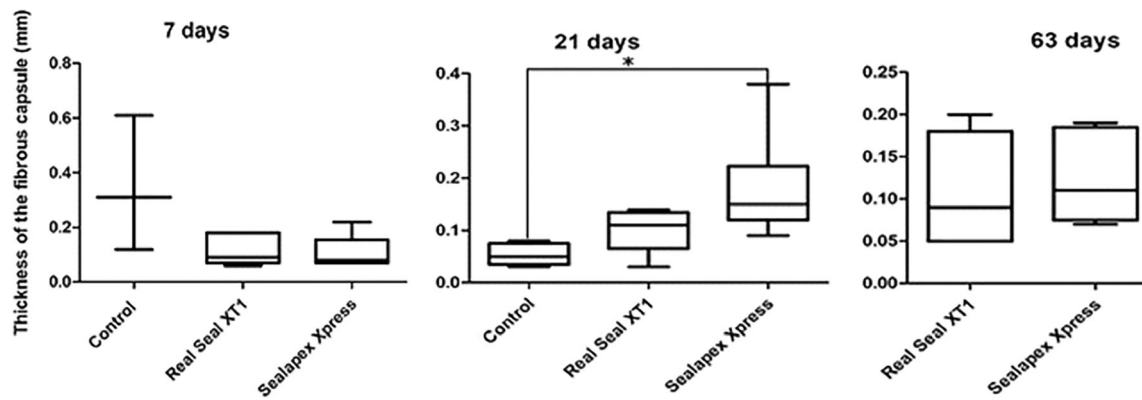
In this study, the cytotoxicity of Sealapex Xpress and RealSeal XT endodontic sealers was evaluated. Using these new formulations, our research group has already published a microscopic study in which we observed that Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility *in vivo* allow the closing of the apical foramen by deposition of mineralized

**Table 3** Frequency analyses of the scores (*p* value) obtained in the microscopic evaluation for the angioblastic proliferation and edema for the different groups and periods (%)

Scores	7 days						21 days						63 days		
	Control	RealSeal XT	Sealapex Xpress	<i>C</i> × <i>RS</i> <i>p</i> value	<i>C</i> × <i>SX</i> <i>p</i> value	<i>RS</i> × <i>SX</i> <i>p</i> value	Control	RealSeal XT	Sealapex Xpress	<i>C</i> × <i>RS</i> <i>p</i> value	<i>C</i> × <i>SX</i> <i>p</i> value	<i>RS</i> × <i>SX</i> <i>p</i> value	RealSeal XT	Sealapex Xpress	<i>RS</i> × <i>SX</i> <i>p</i> value
<b>Angioblastic proliferation</b>															
0	0	0	0	0.85	<i>0.01</i>	<i>0.006</i>	80%	37.5%	11.11%	0.3	<i>0.02</i>	0.15	100%	25%	<i>0.008</i>
1	25%	30%	100%				20%	50%	33.33%				0	25%	
2	75%	70%	0				0	12.5%	55.56%				0	50%	
<b>Edema</b>															
0	0	0	0	0.83	<i>0.01</i>	<i>0.001</i>	80%	87.5%	88.9%	0.71	0.3	0.3	100%	50%	<i>0.02</i>
1	75%	80%	0				20%	12.5%	0				0	50%	
2	25%	20%	100%				0	0	11.1%				0	0	

Italic forms indicate *p* < 0.05

*C* control, *RS* RealSeal XT1, *SX* Sealapex Xpress



**Fig. 6** Statistical box plots expressing minimum values, first quartiles, medians, third quartiles, and maximum values of fibrous capsule thickness at 7, 21, and 63 days. *Asterisk*: statistically significant difference

tissue [2]. However, the cellular effects of these new sealers were not yet evaluated.

Studies using cell cultures are commonly carried out to evaluate the biocompatibility of materials used in dentistry [19–22] such as endodontic sealers, which stay in contact with the periradicular tissues. In this region, we found countless cells responsible for the body’s defense, such as macrophages. These cells have an important role in the inflammatory response [23, 24] since they are the first cells that come into contact with foreign particles present in the tissue [25, 26]. Therefore, we evaluated the endodontic sealers Sealapex Xpress and RealSeal XT with the macrophage RAW 264.7 lineage of cells in this study [27].

The MTT colorimetric assay is widely used in the literature for cytotoxicity evaluation [28–30]. It assesses the viability of mitochondrial enzymes in living cells to convert the yellowish solvent liquid, the tetrazolium salt, into dark blue crystals. Since unviable cells are not able to produce such a product, this test is used to distinguish live cells from dead cells [31].

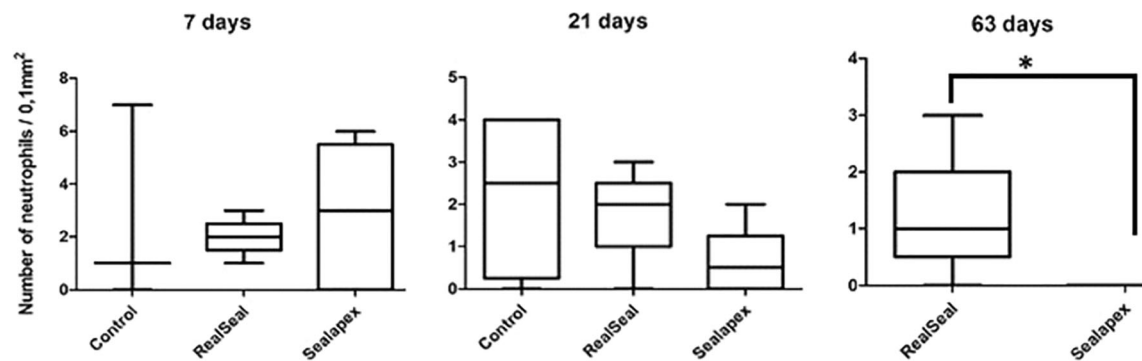
Based on our results from the MTT assay, we could observe a dose-dependent effect on the inhibition of viability/cell proliferation compared to the dilution of the tested endodontic sealers. The more diluted the extract obtained from the medium in the contact material, less cytotoxic it was. The highest concentration tested (1:20) of RealSeal XT caused the greatest

cytotoxic effect (0.26), while the lowest concentration of Sealapex Xpress (1:500) presented values similar to the cytotoxicity of the control group. A similar effect was reported when testing the cytotoxicity of the cements AH Plus, Gutta Flow, Tubliseal, Sealapex, and RealSeal when exposed to human osteoclasts and osteoblasts [30].

The highest cytotoxic effect of RealSeal XT at a dilution of 1:20 may be due to the fact that this material is a resin-based sealer and the release of *bisphenol A diglycidyl ether*, a compound present in resin-based sealers, is considered to be mutagenic [32]. However, the more diluted this material was, the lower its cytotoxicity, reaching values similar to the positive control (LPS 10 µg/mL) and to the Sealapex Xpress dilutions of 1:20 and 1:100.

The dilution with cytotoxicity closest to the control group was 1:500 of Sealapex Xpress, which can be explained by the fact that this is a material based on calcium hydroxide. This was also observed in other studies [33–38], in which endodontic calcium-hydroxide sealers presented biocompatibility. The highest cytotoxicity of Sealapex Xpress at a dilution of 1:20 can be explained by high pH in the initial moments after the exposure of the material to the cell culture medium [39].

From the results obtained by the trypan blue test, it was possible to observe a dose-dependent effect similar to that observed when evaluating the cytotoxicity by MTT assay.



**Fig. 7** Statistical box plots expressing minimum values, first quartiles, medians, third quartiles, and maximum values of neutrophil counting at 7, 21, and 63 days. *Asterisk*: statistically significant difference

As the three dilutions of both cements grew stronger, the number of unviable cells increased after exposure when compared to the negative control group (DMEM-c).

The assay for apoptosis corroborated with the results obtained in the MTT assay and trypan blue test. It was possible to note a larger percentage of apoptotic cells as the sealers became less diluted. In dilutions of 1:500 for both Sealapex Xpress and RealSeal XT, the percentage of apoptotic cells was close to the value obtained in the control group (45.3%), with scores of 44.6 and 47.1%, respectively. At a dilution of 1:20, RealSeal XT caused cell changes in the environment by increasing the percentage of apoptotic cells (91.5%) to a value close to those obtained when the cells were kept in contact with the two positive controls (Staurosporine 200 nM and LPS 10 µg/mL).

We also evaluated the subcutaneous tissue response to the endodontic sealers. The subcutaneous evaluation was performed to investigate closer results to clinical applications. In vivo studies may provide more relevant scientific data than those observed in vitro and enable the evaluation of important parameters, such as the interaction of the material with blood, chronic inflammatory responses, and bone regeneration [40]. The analysis of angiogenesis contributes to understanding the histopathology, once it is essential in both pathological processes as in physiological processes, on the development of granulation tissue, tissue repair, and wound healing [41, 42]. In the same way, the edema evaluation represents a histopathologic alteration that characterized the occurrence of cellular aggression [43].

At 7 days, a higher percentage of angioblastic proliferation and edema compared to 21-day group was observed, probably due to the surgery, since the sterile polyethylene tube is an inert device and does not cause inflammation.

Some studies evaluated the tissue response after subcutaneous implantations in rodents using the RealSeal and Sealapex sealers [44]. The thickness of the fibrous capsule, the vascular alterations, and the various types of inflammatory cells were analyzed after different periods of time. The authors showed that the implantation of the RealSeal sealer promoted an initial inflammatory process that progressed to resolution over time. After 90 days of analyses, RealSeal was considered biologically acceptable when implanted in rats' subcutaneous connective tissues. More recently, Grecca and coworkers also evaluated RealSeal [11]. The results found by those authors corroborate with the present study; good tissue tolerance was observed for both sealers, with no significant difference in the number of neutrophils or macrophages between the experimental and control groups (empty tubes). Similarly, the present study showed that the evolution of the RealSeal sealer also presented biocompatibility to the subcutaneous tissue of mice after a long-term analysis.

Gomes-Filho et al. [10] evaluated the Sealapex Plus sealer for cell viability and production of cytokines. The authors

observed the formation of mineralized nodules, a slight increase in interleukin (IL)-6 expression, and absence of IL-1β expression. Thus, the authors suggest that the Sealapex Plus sealer can be considered biocompatible and induces mineralized tissue formation. Likewise, according to the results from the present study, the Sealapex Xpress sealer had a favorable tissue response. It was not possible to observe a difference between the control groups (nor at 7 days neither at 21 days) and the Sealapex Xpress regarding the thickness of the reactionary granulomatous tissue or in the number of neutrophils.

Yamanaka et al. [12] evaluated the tissue reaction to subcutaneous implants of the methacrylate-based materials Epiphany SE, MetaSEAL, and Super-Bond RC in mice. The authors concluded that all tested methacrylate-based cements showed a similar level of inflammatory infiltrate.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated Sealapex Xpress and RealSeal XT sealers in the subcutaneous tissues of mice. Therefore, our in vivo results cannot be compared with others. Randomized studies should be performed in order to evaluate the clinical performance of these new materials.

## Conclusion

Both sealers showed a dose-dependent effect on macrophage cells and promoted satisfactory subcutaneous tissue response, with the sealer Sealapex Xpress being less cytotoxic and more biocompatible than RealSeal XT.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Funding** The work was supported by the São Paulo Research (FAPESP) in Brazil (Grant #2013/21180-7).

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants. The study was approved by the Institutional Animal Ethics Committee from the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo (#2013.1.1403.58.8). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

**Informed consent** For this type of study, formal consent is not required.

## References

1. Stoll R, Betke K, Stachniss V (2005) The influence of different factors on the survival of root canal fillings: a 10-year retrospective study. *J Endod* 31(11):783–790
2. Silva LA, Barnett F, Pumarola-Sune J et al (2014) Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility in vivo. *J Endod* 40(9):1424–1428

3. Kostoryz EL, Tong PY, Strautman AF et al (2001) Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *J Dent Res* 80(9):1789–1792
4. Gregson KS, Terrence O'Neill J, Platt JA et al (2008) In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemoattractant protein-1. *Dent Mater* 24(11):1461–1467
5. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA et al (1998) Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod* 24(8):528–533
6. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA et al (1999) Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod* 25(2):114–117
7. Cintra LT, Bernabe PF, de Moraes IG et al (2010) Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J Appl Oral Sci* 18(1):75–82
8. Marques AA, Sponchiado EC Jr, Garcia LF et al (2011) Morphological analysis of tissue reaction caused by a new endodontic paste in subcutaneous tissue of rats. *J Conserv Dent* 14(3):309–313
9. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL et al (2014) Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod* 40(9):1485–1488
10. Gomes-Filho JE, Gomes AC, Watanabe S et al (2011) Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci* 19(4):329–336
11. Grecca FS, Kopper PM, Santos RB et al (2011) Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. *J Appl Oral Sci* 19(1):52–56
12. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshida K et al (2011) Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J* 44(7):669–675
13. ISO 10993-12 (2007) Biological evaluation of medical devices—part 12: sample preparation and reference materials. International Standards Organization, Switzerland
14. ISO 10993-5 (2009) Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. International Standards Organization, Switzerland, pp 1–34
15. Queiroz AM, Assed S, Consolaro A et al (2011) Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J* 22(3):203–211
16. ISO-10993-6 (2007) Biological evaluation of medical devices—part 6: tests for local effects after implantation. International Standards Organization, Switzerland, pp 1–21
17. Bailey GC, Ng YL, Cunnington SA et al (2004) Root canal obturation by ultrasonic condensation of gutta-percha. Part II: an in vitro investigation of the quality of obturation. *Int Endod J* 37(10):694–698
18. Marciano MA, Bramante CM, Duarte MA et al (2010) Evaluation of single root canals filled using the lateral compaction, tagger's hybrid, microseal and guttaflow techniques. *Braz Dent J* 21(5):411–415
19. Heyder M, Kranz S, Volpel A et al (2013) Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater* 29(5):542–549
20. Barros J, Costa-Rodrigues J, Lopes MA et al (2014) Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod* 40(8):1149–1155
21. Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO et al (2014) Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod* 40(4):530–533
22. Melegari KK, Botero TM, Holland GR (2006) Prostaglandin E production and viability of cells cultured in contact with freshly mixed endodontic materials. *Int Endod J* 39(5):357–362
23. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG et al (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46(6):845–852
24. Unanue ER (1978) The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. *Immunol Rev* 40:227–255
25. Stern MH, Mackler BF, Dreizen S (1981) A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J Endod* 7(2):70–74
26. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T et al (1996) Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 22(6):311–316
27. Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P et al (2009) Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J* 20(2):99–106
28. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC et al (2009) Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 35(11):1577–1579
29. Xu P, Liang J, Dong G et al (2010) Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod* 36(1):40–44
30. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA et al (2014) Behaviour of co-cultured human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers' extracts. *Clin Oral Investig* 18(2):479–488
31. Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK et al (2013) A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restor Dent Endod* 38(4):204–209
32. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P et al (1996) Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 368(3–4):181–194
33. Brodin P (1988) Neurotoxic and analgesic effects of root canal cements and pulp-protecting dental materials. *Endod Dent Traumatol* 4(1):1–11
34. Chang MC, Lin LD, Chen YJ et al (2010) Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J* 43(3):251–257
35. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR et al (2002) Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 28(2):94–98
36. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W (2002) Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod* 28(11):749–753
37. Silva LA, Leonardo MR, Oliveira DS et al (2010) Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J* 21(1):38–45
38. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW et al (2011) Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent* 21(5):353–360
39. Dahl JE (2005) Toxicity of endodontic filling materials. *Endod Topics*:39–43
40. Anderson JM (2001) Biological responses to materials. *Ann Rev Mat Res* 31:81–110
41. Folkman J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175(3):409–416
42. Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshida K et al (2012) Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. *J Endod* 38(3):313–317
43. Lopes JV, Oliveira PG, Sousa JB et al (2007) Histopathologic evaluation of the peritoneum exposed to heat shock: experimental study in rats. *Acta Cir Bras* 22(5):342–350
44. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA et al (2010) Subcutaneous connective tissue reaction to methacrylate resin-based and zinc oxide and eugenol sealers. *J Endod* 36(9):1574–1579



## **6. DISCUSIÓN**





### 6. DISCUSIÓN

PUBLICACIÓN N° 1. Pese a la unanimidad de opiniones en cuanto a la importancia de la obturación del sistema de conductos radiculares, existen multitud de materiales para el relleno de los mismos (97,287), demostrando esto la inexistencia de un material ideal que cumpla todos los requisitos necesarios, enumerados por Grossman (2).

El cemento endodóncico ideal debería tener algún grado de radiopacidad para poder controlar su colocación intraconducto (36). En la primera publicación "*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*", todos los cementos endodóncicos cumplieron con los requisitos ANSI / ADA para la radiopacidad siendo el Endo-CPM Sealer el cemento menos radiopaco (4 mm Al) seguido por Activ GP. Guerreiro-Tanomaru et al. (288) también mostraron valores de radiopacidad del Endo-CPM Sealer superiores al mínimo recomendado, equivalente a 6 mm Al. El cemento AH Plus fue significativamente más radiopaco (ligeramente superior a 16 mm Al) que el resto de materiales testados, lo que concuerda con otros estudios previos que también habían comparado la radiopacidad de diferentes cementos endodóncicos (36,289). En otro trabajo donde se comparaba la radiopacidad de varios cementos endodóncicos, Tanomaru et al. (290) demostraron que Sealapex es el cemento menos radiopaco, con una equivalencia a 2 mm Al, mientras que AH Plus obtuvo un valor equivalente a 16 mm Al. En nuestra publicación, se encontraron resultados similares para AH Plus, mientras que Sealapex presentó valores de radiopacidad significativamente mayores (14 mm Al). La diferencia en la radiopacidad de Sealapex podría explicarse por la adición de trióxido de bismuto en la nueva formulación que condujo a una marcada mejora en la radiopacidad. En un estudio más reciente que utilizó métodos y materiales similares,

Tanomaru et al. (28) encontraron que la radiopacidad de Sealapex con trióxido de bismuto en lugar de sulfato de bario como radiopacificador era equivalente a 6 mm Al, mientras que el cemento endodóncico a base de ionómero de vidrio del sistema Activ GP era equivalente a 2 mm Al. Resultado similar fue encontrado por Flores et al. (13), en cuyo estudio Activ GP no cumplió con los requisitos ANSI / ADA con respecto a la radiopacidad. Sin embargo, en nuestro estudio, Activ GP presentó valores altos de radiopacidad (12 mm Al).

La curación periapical después del tratamiento de conductos debe caracterizarse por la regeneración del tejido óseo, la deposición del cemento en la región periapical y la normalidad del espacio del ligamento periodontal. Al contacto con el agua, el hidróxido de calcio libera iones de calcio durante la disociación iónica y la cantidad de iones calcio libres determina el potencial de este material para inducir la formación de tejido mineralizado. Además, la eficacia del hidróxido de calcio se basa en su capacidad para liberar iones hidroxilo y provocar un aumento local del pH, que es esencial para conseguir una acción antimicrobiana clínica (15).

Además de otros óxidos, los materiales de relleno de conductos radiculares generalmente contienen hidróxido de calcio, que es el responsable de aumentar el pH (15). La composición de estos cementos endodóncicos altera el pH según su reactividad en medio acuoso y/o las características farmacotécnicas del polímero que compone el material.

El hidróxido de calcio puede liberar iones hidroxilo y mantener el pH alcalino y estable durante un tiempo relativamente largo. En la primera publicación "*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*", las

mediciones de pH revelaron que los cementos endodóncicos AH Plus, Sealapex y Endo-CPM Sealer son materiales alcalinos que liberan iones hidroxilo al medio, lo cual coincide con estudios publicados con anterioridad (32). Sin embargo, se pudo observar también un aumento rápido en los valores de pH seguido de una disminución que tuvo tendencia a estabilizarse. Esto puede explicarse por el hecho de que la solubilidad del hidróxido de calcio disminuye a medida que fragua el cemento y los iones hidroxilo ya liberados son absorbidos por otras sustancias presentes en la solución o en la superficie del cemento.

Activ GP fue el único cemento endodóncico que fue ácido desde el principio, con valores de pH cercanos a 4,0. Este resultado era de esperar ya que el cemento endodóncico que forma parte del sistema Activ GP deriva de un cemento a base de ionómero de vidrio compuesto por ácidos poliacrílico e itacónico que liberan iones  $H^+$ , aumentando la acidez. El análisis de la variación del pH de este cemento endodóncico muestra una disminución inicial seguida de un aumento, lo que indica que, como se observa con los cementos endodóncicos alcalinos, los iones  $H^+$  son consumidos por otros componentes de la solución.

La solubilidad es la capacidad de una sustancia para disolverse en otra y se expresa como la concentración de la solución saturada de la primera en la segunda (291). Todos los cementos endodóncicos probados en esta publicación cumplieron con los requisitos ANSI / ADA ya que mostraron una solubilidad inferior al 3%. Sealapex presentó una solubilidad media de solo 0,055%, mientras que AH Plus fue el cemento endodóncico más soluble (0,82% del valor medio). Estos resultados no concuerdan con los de un estudio que se publicó poco antes que el presente (14) en el que se demostró que Sealapex mostraba valores de solubilidad superiores al límite establecido por ANSI / ADA,

mientras que AH Plus cumplía con este requisito ANSI / ADA para la solubilidad. Según lo observado por Eldeniz et al. (32), Sealapex es un cemento endodóncico con una alta solubilidad; esta afirmación fue atribuida a su alto pH y a su alta liberación de iones de calcio. Sin embargo, la baja solubilidad de Sealapex observada en la primera publicación "*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*" se atribuyó a su nueva composición, formulada con el objetivo de proporcionar mayor radiopacidad y baja solubilidad, sin perder sus adecuadas propiedades biológicas.

La correlación del perfil de solubilidad con la variación del pH a lo largo del tiempo reveló que el cemento endodóncico más soluble, AH Plus, también tenía un consumo más rápido de iones hidroxilo. Por lo tanto, se podría inferir que hay una reacción secundaria entre la liberación de iones hidroxilo y la reacción posterior con los subproductos del cemento endodóncico disueltos en medio acuoso.

La alta solubilidad es beneficiosa tanto desde el punto de vista físico-químico como biológico, porque la liberación de más iones calcio en el tejido así como un pH más alto puede llevar a que este cemento endodóncico muestre un efecto antibacteriano más potente (31).

A pesar de tener baja solubilidad y difusibilidad, el hidróxido de calcio no promoverá los efectos curativos esperados en los tejidos circundantes a menos que el calcio y los iones hidroxilo se disocien del cemento endodóncico. Esta es la razón por la cual la capacidad de sellado a largo plazo de los cementos endodóncicos a base de hidróxido de calcio y sus efectos terapéuticos están sujetos a una gran discusión (15).

Una adecuada adaptación a la pared dentinaria radicular es una propiedad importante de los cementos endodóncicos ya que ayudará a proporcionar un sellado hermético y ayudará a prevenir la filtración bacteriana y el fracaso del tratamiento (292). En la primera publicación "*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*" observamos que los cementos endodóncicos AH Plus y Sealapex tuvieron una buena adaptación en los tercios medio y apical mientras que Activ GP y Endo-CPM Sealer presentaron una pobre adaptación a las paredes dentinarias del conducto. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Balguerie et al. (8) quienes mostraron, después de la evaluación a través de SEM, que el cemento endodóncico AH Plus presentaba una penetración tubular y una adaptación a la pared del conducto radicular óptimas.

Royer et al. (293) evaluarón la capacidad de sellado apical de Activ GP, EndoREZ y un cemento a base de óxido de zinc-eugenol mediante la observación con SEM de los cortes transversales realizados tras la obturación de 45 conductos de dientes humanos extraídos. En este estudio, los dientes obturados con el sistema Activ GP mostraron unos valores de sellado y filtración comparables con los obtenidos con gutapercha y cemento a base de óxido de zinc-eugenol. En cambio, EndoREZ fue con el que peores resultados se obtuvieron mostrando una tasa significativamente más alta de filtración apical y una penetración de colorante más profunda en comparación con la combinación de gutapercha y cemento a base de óxido de zinc-eugenol y el sistema Activ GP.

No se encontraron otros estudios en la literatura que evaluaran la adaptación al conducto radicular mediante SEM de los cementos endodóncicos Activ GP, Endo-CPM Sealer y Sealapex.

Es de destacar que para esta evaluación en la primera publicación “Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers” se decidió trabajar con dientes bovinos por su fácil disponibilidad y debido a que comparten cualidades microscópicas morfológicas con la dentina humana (294), siendo un buen sustituto de ésta. Además, según Schilke et al. (295), mediante la observación con SEM, no hay diferencias significativas en cuanto a los diámetros de los túbulos dentinarios en dentina humana y dentina bovina.

PUBLICACIÓN Nº 2. Todos los cementos a base de resina actualmente utilizados en endodoncia exhiben un grado variable de toxicidad, especialmente recién mezclados (119,270,296,297). RealSeal XT (SybronEndo, Orange, CA, EE.UU.), evolución del RealSeal SE, es un cemento que combina una modificación química de resina metacrilato basada en el cemento endodónico RealSeal SE y una modificación química de la resina epoxi basada en el cemento endodónico AH Plus. Según lo descrito por Wong et al. (267) el cemento llamado provisionalmente RealSeal XT es el prototipo de un nuevo material. Por lo tanto, hay poca información del fabricante en cuanto a las posibles modificaciones realizadas que mejorarían sus propiedades, incluyendo la compatibilidad con los tejidos.

La diversidad de los materiales de obturación requiere la evaluación de su respuesta biológica en cultivos celulares y en modelos animales antes de su uso en ensayos clínicos. En la segunda publicación “*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*” evaluamos los materiales en cuanto a su compatibilidad con los tejidos y su capacidad para promover el sellado apical biológico en dientes de perros con vitalidad pulpar. Se sabe que las condiciones para el proceso de reparación son más

favorables en los dientes con vitalidad pulpar, pero también que es la condición más favorable para evaluar la respuesta del material ya que no están presentes los efectos producidos por una infección. Después del uso tanto del Sealapex Xpress como del RealSeal XT, el ligamento periodontal fue normal y sin células inflamatorias en la mayoría de los casos, destacando la buena tolerancia de los tejidos a estos cementos endodóncicos. En ninguno de los dos grupos hubo reabsorción de tejidos mineralizados y estuvieron presentes los osteoblastos y cementoblastos en el tejido óseo y en el cemento, respectivamente. Incluso en tres casos en los que hubo extrusión de material de obturación se pudo observar biocompatibilidad en los tejidos ya que no hubo reacción inflamatoria que rodeara al material en periápice.

El cemento a base de resina adhesiva RealSeal XT mostró buenos resultados histológicos, aunque el número de casos en los que se obtuvo sellado apical completo por la deposición de tejido mineralizado recién formado fue inferior en comparación con Sealapex Xpress, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa. Tanto con RealSeal XT como con Sealapex Xpress se obtuvieron casos en los que hubo una formación de sellado biológico parcial, con tejido conectivo y numerosos haces de fibras de colágeno extendidos hacia el interior del conducto radicular. Posiblemente, si el período de seguimiento hubiese sido más largo, se hubiera podido observar la formación de un sellado apical biológico completo en un mayor número de casos.

Esta afirmación puede ser demostrada por los resultados del análisis inmunohistoquímico en los que después del uso de Sealapex Xpress y RealSeal XT se observó una fuerte tinción de osteopontina y de fosfatasa alcalina en el ligamento periodontal y en la región del sellado apical biológico. Ambas proteínas son cruciales para



la mineralización de los tejidos y juegan un papel clave durante este proceso (298,299). También se observó en las muestras de ambos grupos proteína RUNX2 que es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos, codificada en humanos por el gen *runx2* (300). Estos resultados indican la presencia de un microambiente adecuado para la biomineralización, que no fue perturbado por la presencia de los cementos endodóncicos. De manera similar a Rodrigues et al. (297), en la segunda publicación "*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*" también observamos que los cementos endodóncicos podrían interferir en el microambiente celular mediante la alteración de la liberación de citoquinas y/o la diferenciación y función celular.

La falta de estudios que evalúen la respuesta de los tejidos en contacto con el cemento endodónico Sealapex Xpress impide una comparación directa con los resultados de la segunda publicación "*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*". Sin embargo, estudios previos en los que se testó la formulación original de Sealapex, siendo el hidróxido de calcio el componente básico de las diferentes formulaciones, demostraron también una capacidad de inducir la deposición de tejido mineralizado y de promover el sellado apical (53,67,68). Así, Sealapex Xpress también tiene la capacidad de inducir el sellado apical biológico, además de presentar propiedades físico-químicas mejoradas, según defiende su fabricante.

No hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los cementos endodóncicos RealSeal XT y Sealapex Xpress en relación a los parámetros histológicos evaluados en la segunda publicación "*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*". Sin embargo, numéricamente el cemento endodónico Sealapex

Xpress consiguió un sellado completo del foramen apical por la formación de tejido mineralizado en un 50% de los casos en comparación al 22,7% que consiguió RealSeal XT, lo que podría atribuirse a la presencia de hidróxido de calcio en la composición química de Sealapex Xpress. Según Desai y Chandler (15), las dos principales razones que justifican el uso de un material de relleno de conductos radiculares a base de hidróxido de calcio son la capacidad de promover la reparación apical y su potencial antimicrobiano. Su alto pH promueve una respuesta degenerativa inicial seguida inmediatamente por una respuesta de mineralización (301). Este pH alcalino también activa las enzimas fosfatasa alcalina y trifosfato de adenosina dependiente de la concentración de calcio, directamente implicadas en la formación de tejido mineralizado (302).

PUBLICACIÓN Nº 3. Así pues, habiendo observado en la segunda publicación "*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*" que Sealapex Xpress y RealSeal XT estimularon la expresión de marcadores de mineralización (osteopontina, fosfatasa alcalina y RUNX2), mostrando una reacción inflamatoria leve y un depósito apical de tejido mineralizado después del tratamiento endodóncico en dientes de perro (303) y teniendo en cuenta la novedad en la composición y forma de mezcla del Sealapex Xpress (SybronEndo Corp., Orange, CA, EE. UU.) y RealSeal XT (SybronEndo Corp., Orange, CA, EE. UU.), se llevó a cabo la tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*" en la cual el objetivo fue evaluar la citotoxicidad *in vitro* en cultivos celulares y la biocompatibilidad *in vivo* en tejido conectivo de ratones de los cementos RealSeal XT y Sealapex Xpress.

La obturación del conducto radicular debe considerarse un paso crítico en los tratamientos de endodoncia. Este paso debe realizarse utilizando un cemento endodóncico que promueva un sellado hermético para evitar el movimiento del líquido periapical, los microorganismos y sus productos o la re-infección de los conductos radiculares (304,305). Además, los cementos endodóncicos deben presentar propiedades físicas y químicas satisfactorias y no deben promover una respuesta tisular exacerbada. El efecto tóxico de los materiales utilizados en la terapia endodóncica es especialmente preocupante, ya que puede causar la degeneración del tejido periapical y puede retrasar o evitar el proceso de reparación. Después de su inserción en el conducto radicular, el material de obturación entra en contacto con las células del tejido periapical y libera sustancias que podrían ser nocivas o no. Esto resalta la importancia de los estudios *in vitro* e *in vivo* en la evaluación de los posibles efectos citotóxicos.

En la tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*" se evaluó la citotoxicidad de los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT. Usando estas nuevas formulaciones ya habíamos observado que Sealapex Xpress y RealSeal XT son materiales compatibles con los tejidos *in vivo*, permitiendo un cierre del foramen apical en dientes de perro mediante la deposición de tejido mineralizado (303). Sin embargo, se debía seguir evaluando los efectos celulares de estos nuevos cementos endodóncicos.

Los estudios que utilizan cultivos celulares son habituales para evaluar la biocompatibilidad de materiales utilizados en odontología (306-309), como son los cementos endodóncicos los cuales permanecen en contacto con los tejidos

perirradiculares. En esta región encontramos innumerables células responsables de la defensa del cuerpo, como son los macrófagos. Estas células tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria (310,311) ya que son las primeras células que entran en contacto con las partículas extrañas presentes en el tejido (312,313). Por esta razón en nuestra tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*" evaluamos los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT con la línea celular de macrófagos RAW 264.7 (314).

En otro estudio anterior (268) se evaluó la citotoxicidad de RealSeal XT comparándolo con AH Plus usando la línea celular de fibroblastos L929 de ratón. Ambos cementos indujeron muerte celular; sin embargo, los análisis morfológicos y de viabilidad mostraron que RealSeal XT fue menos citotóxico que AH Plus y su citotoxicidad inicial disminuyó progresivamente con el tiempo.

Algunos estudios previos han comparado las versiones anteriores de RealSeal con AH Plus demostrando ser más citotóxico el primero que el segundo (315,316). Otros estudios compararon estos dos cementos con cementos a base de silicona (Gutta Flow 2) o silicato de calcio (MTA) y encontraron que los cementos más citotóxicos fueron RealSeal y AH Plus (317). Van Landuyt et al. (318) encontraron que AH plus fue más mutagénico que RealSeal y este más que EndoRez pero sin diferencias significativas con el grupo control (Calcicur). Por lo tanto, no encontraron indicadores de un mayor riesgo de genotoxicidad de los selladores de conductos radiculares a base de resina. Gambarini et al. (319) no encontraron efectos citotóxicos de RealSeal y Thermafil (Tulsa Dental, Tulsa, OK, EE. UU.) en comparación con el grupo control. Otros estudios como el de Ames et al.

(225) evaluaron la citotoxicidad de diferentes cementos a base de resina metacrilato (EndoREZ, RealSeal, MetaSEAL y RealSeal SE) y vieron que todos estos cementos presentaron una citotoxicidad severa inicial (semana 0) manteniéndose severamente citotóxicos solo RealSeal y EndoREZ después de 5 semanas. La citotoxicidad de los cementos de autograbado MetaSEAL y RealSeal SE disminuyó gradualmente con el tiempo aunque la microscopía electrónica de transmisión de las células expuestas a RealSeal SE mostró grados variables de lesión celular que reflejaban su estado de toxicidad. Scelza et al. (70) también evaluaron la citotoxicidad de Real Seal SE y AH Plus además de GuttaFlow, Sealapex, Roth 801 y ThermaSeal Plus y vieron que todos los cementos presentaron cierto efecto citotóxico sobre fibroblastos humanos pero esta citotoxicidad pareció disminuir de manera similar de una forma tiempo-dependiente. En todos estos estudios de citotoxicidad se evaluaron versiones anteriores de RealSeal XT por lo que no podemos hacer una comparación directa con los resultados hallados en nuestra publicación.

Varios estudios han mostrado que los efectos citotóxicos en el cultivo celular pueden ser causados por monómeros liberados (320,321). Debido a que el fraguado del cemento a base de resina no suele ser completo, los monómeros no convertidos pueden liberarse de la resina en fase acuosa y difundir a través de la dentina. Por lo tanto, antes del fraguado, la citotoxicidad del propio monómero afectará a los tejidos, mientras que después del fraguado, el efecto residual del monómero sobre los tejidos dependerá de la cantidad y la cinética de elución. La prueba de citotoxicidad de los cementos recién mezclados es clínicamente relevante porque los cementos están en un estado inestable cuando se introducen en los conductos y pueden entrar en contacto con los tejidos periapicales. En el estudio de Cotti et al. (268) la citotoxicidad de los materiales probados

se evaluaron después de 1, 24, 48 y 72 horas a diferencia de en nuestra tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*" en la cual la evaluación de la citotoxicidad la realizamos utilizando la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y con cemento RealSeal XT ya fraguado; habiendo visto que con el estudio de Cotti et al. (268) RealSeal XT tenía un efecto citotóxico tiempo-dependiente, nuestro objetivo estuvo más centrado en el comportamiento dosis-dependiente, sin tener tanto en cuenta el tiempo.

En el estudio de Cotti et al. (268) se usó rojo neutro y ensayo colorimétrico MTT para la evaluación de la citotoxicidad. El primero consiste en la determinación de la citotoxicidad tras contacto directo del elemento de ensayo con células, mediante tinción de células vivas con un colorante vital (rojo neutro). Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierde viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa, se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Se calcula el porcentaje de mortalidad y viabilidad celular (evaluación cuantitativa) y se evalúa el aspecto morfológico de las células (evaluación cualitativa) utilizando microscopio óptico.

El ensayo colorimétrico MTT utilizado en nuestra publicación es ampliamente utilizado en la literatura para la evaluación de citotoxicidad (316,322,323). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-

difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Es decir, evalúa la viabilidad de las enzimas mitocondriales en las células vivas al convertir el compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo, en cristales azul oscuro-violeta al reducirse y convertirse en un compuesto insoluble en agua de la familia formazanos. Dado que las células inviables no pueden producir dicho producto, esta prueba se utiliza para distinguir las células vivas de las células muertas (324).

En base a nuestros resultados del ensayo de MTT, pudimos observar un efecto dependiente de la dosis sobre la inhibición de la viabilidad / proliferación celular en comparación con la dilución de los cementos endodóncicos probados. Cuanto más diluido se obtuvo el extracto del medio en el material de contacto, menos citotóxico fue. La concentración más alta probada (1:20) de RealSeal XT causó el mayor efecto citotóxico (0,26), mientras que la concentración más baja de Sealapex Xpress (1:500) presentó valores similares a la citotoxicidad del grupo de control. Se demostró un efecto similar al probar la citotoxicidad de los cementos AH Plus, GuttaFlow, Tubliseal, Sealapex y RealSeal cuando se expusieron a osteoclastos y osteoblastos humanos (323).

El mayor efecto citotóxico de RealSeal XT a una dilución de 1:20 puede deberse al hecho de que este material es un cemento endodóncico a base de resina y podría existir liberación de bisfenol A diglicidil éter, un compuesto presente en los materiales a base de resina que es considerado mutagénico (325). Sin embargo, cuanto más diluido está este material, menor es su citotoxicidad, alcanzando valores similares al control positivo (LPS 10 µg/ml) y a las diluciones Sealapex Xpress de 1:20 y 1:100.

La dilución con citotoxicidad más cercana al grupo control fue de 1:500 de Sealapex Xpress, lo que puede explicarse por el hecho de que este es un material a base de hidróxido de calcio. Esto también se observó en otros estudios (326-331), en los cuales los cementos endodóncicos a base de hidróxido de calcio también fueron biocompatibles. La mayor citotoxicidad de Sealapex Xpress se observó a una dilución de 1:20 y esto se podría atribuir al alto pH en los momentos iniciales después de la exposición del material al medio de cultivo celular (332).

A partir de los resultados obtenidos con la prueba del azul de tripano en nuestra tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*", fue posible observar un efecto dosis-dependiente similar al observado al evaluar la citotoxicidad mediante el ensayo MTT. A medida que las tres diluciones de ambos cementos se hicieron más fuertes, el número de células inviables aumentó después de la exposición cuando se comparó con el grupo de control negativo (DMEM-c).

El ensayo de apoptosis corroboró los resultados obtenidos en el ensayo de MTT y la prueba de azul tripano. Fue posible observar un mayor porcentaje de células apoptóticas a medida que los cementos endodóncicos testados estaban menos diluidos. En diluciones de 1:500 para Sealapex Xpress y RealSeal XT, el porcentaje de células apoptóticas fue cercano al valor obtenido en el grupo control (45,3%), con porcentajes de 44,6 y 47,1%, respectivamente. A una dilución de 1:20, RealSeal XT causó cambios celulares en el ambiente al aumentar el porcentaje de células apoptóticas (91,5%) a un valor cercano a las obtenidas cuando las células se mantuvieron en contacto con los dos controles positivos (Estaurosporina 200 nM y LPS 10 µg / mL).



En esta tercera publicación “*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*” también fue evaluada la respuesta del tejido subcutáneo ante los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT. La evaluación subcutánea se realizó para investigar resultados más cercanos a las aplicaciones clínicas de estos materiales (333). Los estudios *in vivo* pueden proporcionar datos científicos más relevantes que los observados *in vitro* y permiten la evaluación de parámetros importantes, como la interacción del material con la sangre, las respuestas inflamatorias crónicas y la regeneración ósea (334). El análisis de la angiogénesis contribuye a la comprensión de la histopatología. Este tipo de análisis es esencial tanto en procesos patológicos como en procesos fisiológicos, en el desarrollo de tejido de granulación, reparación de tejidos y curación de heridas (335,336). Del mismo modo, la evaluación del edema representa una alteración histopatológica que caracteriza la aparición de la agresión celular (337).

A los 7 días, se observó un mayor porcentaje de proliferación angioblástica y edema en comparación con el grupo de 21 días, probablemente debido a la cirugía, ya que el tubo de polietileno estéril es un dispositivo inerte y no causa inflamación.

Algunos estudios evaluaron la respuesta tisular después de implantes subcutáneos en roedores utilizando los cementos endodóncicos RealSeal y Sealapex (218). El grosor de la cápsula fibrosa, las alteraciones vasculares y los diversos tipos de células inflamatorias se analizaron después de diferentes períodos de tiempo. Los autores demostraron que la implantación del cemento RealSeal promovió un proceso inflamatorio inicial que progresó a una resolución a lo largo del tiempo. Después de 90 días de análisis, RealSeal se consideró biológicamente aceptable cuando se implantó en tejido

conectivo subcutáneo de ratas. Más recientemente, Grecca et al. (273) también evaluaron RealSeal además de AH Plus y los resultados encontrados por estos autores coinciden con lo observado en la tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*"; se comprobó una buena tolerancia del tejido para ambos cementos endodóncicos, sin diferencias significativas en el número de neutrófilos o macrófagos entre los grupos experimentales y control (tubos vacíos). De forma similar, nuestra publicación mostró que la evolución del cemento endodóncico RealSeal XT también presentaba biocompatibilidad con el tejido subcutáneo de los ratones después de un análisis a largo plazo.

Gomes-Filho et al. (286) evaluaron un cemento endodóncico experimental llamado Sealapex Plus (combinación de Sealapex y MTA) en cuanto a la viabilidad celular y a la producción de citocinas. Los autores observaron la formación de nódulos mineralizados, un ligero aumento en la expresión de interleuquina (IL)-6 y ausencia de expresión de IL-1 $\beta$ . Por lo tanto, los autores sugirieron que el cemento endodóncico Sealapex Plus podría considerarse biocompatible e inducir la formación de tejido mineralizado. Asimismo, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra publicación, el cemento endodóncico Sealapex Xpress tuvo una respuesta tisular favorable. No fue posible observar alguna diferencia entre los grupos control (ni a los 7 días ni a los 21 días) y Sealapex Xpress con respecto al espesor del tejido granulomatoso reactivo o al número de neutrófilos.

Yamanaka et al. (226) evaluaron la reacción tisular de los cementos endodóncicos a base de resina metacrilato Epiphany SE, MetaSEAL y Super-Bond RC implantados en tejido subcutáneo de ratones. Los autores llegaron a la conclusión de que todos los

cementos a base de metacrilato testados mostraron un nivel similar de infiltrado inflamatorio.

Nuestra segunda publicación "*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*" fue el primer estudio en evaluar la respuesta del tejido vivo después de utilizar los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT y hasta donde tenemos conocimiento, nuestra tercera publicación "*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*" fue el primer estudio que evaluó los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT en tejidos subcutáneos de ratones. Desconocemos la existencia de otras publicaciones para poder comparar sus resultados con nuestros resultados *in vivo*.

Se debe tener en cuenta que la carga inorgánica adicional de esta nueva composición del prototipo RealSeal XT podría proporcionar una mayor estabilidad pero reducir su viscosidad, que el espectro de tamaños de relleno y formas de partículas incluidos en esta nueva formulación influiría en las propiedades de manejo y fluidez, al igual que en la velocidad de polimerización y que al mismo tiempo que este mayor contenido de relleno aumentaría la estabilidad y disminuiría la filtración, podría también dificultar la eliminación del cemento endodóncico en caso de necesitar retratamiento.

Por lo tanto, son necesarios realizar estudios aleatorizados para evaluar el rendimiento clínico de estos nuevos materiales y se necesitan más estudios, que incluyan una evaluación de propiedades físicas, químicas, mecánicas y antimicrobianas también en dientes con pulpa necrótica y periodontitis apical con el fin de confirmar la eficacia clínica de estos cementos endodóncicos.

## **7. CONCLUSIONES**



### 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la publicación N° 1 “*Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers*” fueron las siguientes:

- I. Tanto Sealapex, como Endo-CPM Sealer, como el cemento a base de ionomero de vidrio del sistema Activ GP y el AH Plus cumplieron con los requisitos ANSI/ADA de solubilidad inferior al 3%.
- II. Tanto Sealapex, como Endo-CPM Sealer, como el cemento a base de ionomero de vidrio del Activ GP y el AH Plus cumplieron con los requisitos ANSI/ADA de radiopacidad siendo superior a 3 mm Al.
- III. Tanto Sealapex, como Endo-CPM Sealer y AH plus favorecieron un pH básico después de su dispersión en agua.
- IV. Solo el cemento a base de ionomero de vidrio Activ GP favoreció un pH ácido después de su dispersión en agua.
- V. En el examen a través de SEM, el cemento AH Plus fue superior a los demás en cuanto a la adaptación a las paredes del conducto radicular en diente bovino.

Las conclusiones de la publicación N° 2 “*Sealapex Xpress and RealSeal XT Feature Tissue Compatibility In Vivo*” fueron las siguientes:

- I. Los cementos endodóncicos Sealapex Xpress y RealSeal XT se caracterizaron por mostrar biocompatibilidad con los tejidos *in vivo*.

- II. Tanto el cemento endodónico Sealapex Xpress como RealSeal XT permitieron el sellado del foramen apical por la deposición de tejido mineralizado en dientes vitales de perro.

Las conclusiones de la publicación N° 3 “*Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue*” fueron las siguientes:

- I. Los cementos endodónicos Sealapex Xpress y RealSeal XT mostraron un efecto dosis dependiente sobre macrófagos.
- II. Sealapex Xpress fue menos citotóxico y más biocompatible que RealSeal XT.
- III. Tanto el cemento endodónico Sealapex Xpress como RealSeal XT indujeron una respuesta satisfactoria en tejido subcutáneo de ratones.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**





## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Musikant BL, Cohen BI, Deutsch AS. Rethinking endodontics: attaining total obturation of the root canal system with a simplified system. *Gen Dent.* 1999; 47: 73-82.
2. Grossman L. Obturation of root canal. In: Grossman L, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, 1982. Pág. 297.
3. ANSI/ADA, Specification no. 57. Endodontic Sealing Material. Chicago, USA; 2000.
4. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36:16-27.
5. Tronstad L, Barnett F, Flax M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4: 152-9.
6. Estrela C, Holland R, Estrela CRA, Alencar AHG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J.* 2014; 25: 3-11.
7. De-Deus G, Reis C, Di Giorgi K, Brandão MC, Audi C, Fidel RA. Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111: 381-6.
8. Balguerie E, van der Sluis L, Vallaey K, Gurgel-Georgelin M, Diemer F. Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2011; 37: 1576-9.
9. Fitzpatrick EL, Steiman HR. Scanning electron microscopic evaluation of finishing techniques on IRM and EBA retrofillings. *J Endod.* 1997; 23: 423-7.
10. Peters CI, Peters OA. Occlusal loading of EBA and MTA root-end fillings in a computer-controlled masticator: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J.* 2002; 35: 22-9.

11. Gondim E, Zaia AA, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Investigation of the marginal adaptation of root-end filling materials in root-end cavities prepared with ultrasonic tips. *Int Endod J.* 2003; 36: 491-9.
12. Shipper G, Grossman ES, Botha AJ, Cleaton-Jones PE. Marginal adaptation of mineral trioxide aggregate (MTA) compared with amalgam as a root-end filling material: a low-vacuum (LV) versus high-vacuum (HV) SEM study. *Int Endod J.* 2004; 37: 325-36.
13. Flores DS, Rached FJ Jr, Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44: 126-35.
14. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CE, Pécora JD. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J.* 2012; 45: 419-28.
15. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers: A Review. *J Endod.* 2009; 35: 475-80.
16. Santos AD, Moraes JCS, Araújo EB, Yukimitu K, Valério Filho WV. Physicochemical properties of MTA and a novel experiment cement. *Int Endod J.* 2005; 38: 443-7.
17. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt-Ford TR. Physical and chemical properties of a new root end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 349-53.
18. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11: 3-9.
19. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. A comparative study of white mineral trioxide aggregate and white Portland cements using X-ray microanalysis. *Aust Endod J.* 2004; 30: 89-92.

20. Oliveira MG1, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18: 3-7.
21. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 483-9.
22. Berástegui E, Valmaseda-Castellón E, Faus V, Ballester ML, Berini-Aytés L. Study of two MTA cements. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014; 19: e634-8.
23. Ballester ML, Berástegui E, Parellada N, Canalda C. Interferometric microscopy study of the surface roughness of Portland cement under the action of different irrigants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18: e817-21.
24. Ballester ML, Pons M, Bolívar I, Berástegui E. Mineral trioxide aggregate and portland cement exposed to endodontic irrigants: pH, conductivity, and solubility. *Endod.* 2018; 36: 10-21.
25. Ballester ML, Pons M, Bolívar I, Berástegui E. Surface roughness of the mineral trioxide aggregate and portland cement exposed to endodontic irrigants. *Endod.* 2018; 36: 22-35.
26. Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J.* 2011; 44: 370-5.
27. Assmann E, Scarparo RK, Böttcher DE, Grecca FS. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *J Endod.* 2012; 38: 219-21.
28. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam.* 2008; 21:147-51.

29. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46: 755-62.
30. Fransen JN, He J, Glickman GN, Rios A, Shulman JD, Honeyman A. Comparative assessment of ActiV GP/Glass Ionomer sealer, Resilon/ Epiphany, and Gutta-Percha/AH Plus obturation: a bacterial leakage study. *J Endod.* 2008; 34: 725-7.
31. Donadio M, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: e74-8.
32. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: e86-91.
33. Ingle J, John I. *Endodontics*, 5<sup>a</sup> ed. Hamilton Ontario, Canada: BC Decker Inc, 2002. Pág. 571-668.
34. Allan N, Williams M, Schaeffer M. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro condition. *J Endod.* 2001; 27: 421-3.
35. Caicedo R, von Fraunhofer J. The properties of endodontic sealer cements. *J Endod.* 1988; 14: 527-34.
36. Resende LM1, Rached-Junior FJ, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CE, Silva-Sousa YT, Sousa Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J.* 2009; 42: 785-93.
37. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the Intraosseous Biocompatibility of AH Plus, Endo REZ, and Epiphany Root Canal Sealers. *J Endod.* 2006; 32: 656-62.

38. Schroeder A. Endodontics: science and practice—a textbook for student and practitioner. Chicago, IL: Quintessence, 1981. Pág. 288.
39. Schäfer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J.* 2003; 36: 660-9.
40. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J.* 2006; 39: 464-71.
41. Donnelly A, Sword J, Nishitani Y, Yoshiyama M, Agee K, Tay FR, Pashley DH. Water sorption and solubility of methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod.* 2007; 33: 990-4.
42. Bodrumlu E, Sumer AP, Gungor K. Radiopacity of a new root canal sealer, Epiphany. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: e59-61.
43. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. *Int Endod J.* 2007; 40: 514-20.
44. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro Tanomaru JM, Gonçalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod.* 2007; 33: 249-51.
45. Nunes VH, Silva RG, Alfredo E, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT. Adhesion of Epiphany and AH Plus sealers to human root dentin treated with different solutions. *Braz Dent J.* 2008; 19: 46-50.
46. Orstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater.* 2001; 17: 512-9.
47. Gulsahi K, Cehreli ZC, Onay EO, Tasman-Dagli F, Ungor M. Comparison of the area of resin-based sealer and voids in roots obturated with Resilon and gutta-percha. *J Endod.* 2007; 33: 1338-41.

48. De Deus G, Gurgel Filho ED, Ferreira CM, Coutinho Filho T. Intratubular penetration of root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16: 332-6.
49. Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000; 26: 391-4.
50. Holland R, de Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod.* 1985; 11: 535-43.
51. Leonardo MR, Flores DS, de Paula E Silva FW, Leonardo RT, Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using Roeko Seal and AH plus root canal sealers: the histopathological evaluation. *J Endod.* 2008; 34: 822–5.
52. Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44: 440-6.
53. 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: 428-32.
54. Ashraf H, Moradimajd N, Mozayeni MA, Dianat O, Mahjour F, Yadegari Z. Cytotoxicity evaluation of three resin based sealers on an L929 cell line. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 9: 549-53.
55. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38: 1233-8.
56. Nelson-Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J.* 1999; 32: 303-11.

57. Lu Y, Liu T, Li X, Li H, Pi G. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: e78-84.
58. Farac RV, Pizzolitto AC, Tanomaru JM, Morgental RD, Lima RK, Bonetti-Filho I. Ex-vivo effect of intracanal medications based on ozone and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 2013; 24: 103-6.
59. Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 240-4.
60. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985; 64: 541-8.
61. Almushayt A, Narayanan K, Zaki A E, George A. Dentinmatrix protein 1 induces cyto-differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* 2006; 13: 611-20.
62. Wang S, Sasaki Y, Ogata Y. Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human osteoblast-like Saos2 cells. *J Oral Sci.* 2011; 53: 77-86.
63. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988; 14: 125-7.
64. Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002; 28: 694-6.
65. Silva LA, da Silva RA, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2008; 19: 296-300.



66. Cañadas PS, Berástegui E, Gatón-Hernández P, Silva LA, Leite GA, Silva RS. Physicochemical Properties and Interfacial Adaptation of Root Canal Sealers. *Braz Dent J.* 2014; 25: 435-41.
67. Sonat B, Dalat D, Gunhan O. Periapical tissue reaction to root fillings with Sealapex. *Int Endod J.* 1990; 23: 46-52.
68. Cobankara FK, Orucoglu H, Sengun A, Belli S. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. *J Endod.* 2006; 32: 66-8.
69. Queiroz A M, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J.* 2011; 22: 203-11.
70. Scelza M Z, Coil J, Alves G G. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res.* 2012; 26: 424-30.
71. Ferracane JL. Resin composite – State of the art. *Dent Mater.* 2011; 27: 29-38.
72. Sarrett DC. Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. *Dent Mater.* 2005; 21: 9-20.
73. Padrós E, Padrós JL, Creus M, Rodríguez J, Manero JM. Un nuevo método de acondicionamiento, desinfección y obturación en endodoncia. *Endod.* 2004; 22: 162-75.
74. Shipper G, Ørstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplasticity syntetic polymer-based root canal filling material (resilon). *J Endod.* 2004; 30: 342-7.
75. Lotfi M, Ghasemi N, Rahimi S, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Shahidi A. Resilon: a comprehensive literature review. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2013; 7:119-30.

76. Braga RR, Ferracane JL, Condon JR. Polymerization contraction stress in dual-cure cements and its effect on interfacial integrity of bonded inlays. *J Dent.* 2002; 30: 333-40.
77. Spinell T, Schedle A, Watts DC. Polymerization shrinkage kinetics of dimethacrilate resin-cements. *Dent Mater.* 2009; 25: 1058-66.
78. Canalda C, Brau E. *Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas*, 3<sup>o</sup> ed. España: Elsevier Masson, 2014. Pág. 212-5.
79. Bowen RL inventor. Method of preparing a monomer having phenoxy and methacrilate groups linked by hydroxy glyceryl groups. US patent 3, 179, 623, 1965.
80. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 97-116.
81. Moszner N, Saltz U. New developments of polymeric dental composites. *Prog Polym Sci.* 2001; 26: 535-76.
82. Barszczewska-Rybarek IM. Structure-property relationships in dimethacrilate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. *Dent Mater.* 2009; 25: 1082-9.
83. Feilzer AJ, de Gee AJ, Davidson CL. Relaxation of polymerization contraction shear stress by hygroscopic expansion. *J Dent Res.* 1990b; 69: 36-9.
84. Bowen RL, Marjenhoff WA. Dental composites/glass ionomers: the materials. *Adv Dent Res.* 1992; 6: 44-9.
85. Álvarez-Gayosso C, Barceló-Santana F, Guerrero-Ibarra J, Sáez-Espínola G, Canseco-Martínez MA. Calculation of contraction rates due to shrinkage in light-cured composites. *Dent Mater.* 2004; 20: 228-35.
86. Schneider LF, Cavalcante LM, Silikas N. Shrinkage stresses generated during resin-composite applications: a review. *J Dent Biomechanics* 2010; doi: 10.4061/2010/131630.

87. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J.* 2011; 44: 307-13.
88. Gesi A, Raffaelli O, Goracci C, Pashley D, Tay F, Ferrari M. Interfacial strength of Resilon and gutta-percha to intraradicular dentin. *J Endod.* 2005; 31: 809-13.
89. Pameijer CH, Zmener O. Resin materials for root canal obturation. *Dent Clin North Am.* 2010; 54: 325-44.
90. Tay F, Loushine R, Lambrechts P, Weller N, Pashley D. Geometric factors affecting dentin bonding in root canals: A theoretical modeling approach. *J Endod.* 2005; 31: 584-9.
91. Ferracane JL. Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dent Mater.* 2005; 21: 36-42.
92. Dewaele M, Truffier-Boutry D, Devaux J, Leloup G. Volume contraction in photocured dental resins: the shrinkage-conversion relationship revisited. *Dent Mater.* 2006; 22: 359-65.
93. Bausch JR, de Lange K, Davidson CL, Peters A, de Gee AJ. Clinical significance of polymerization shrinkage of composite resins. *J Prosthet Dent.* 1982; 48: 59-67.
94. Gonçalves F, Pfeifer CCS, Stansbury JW, Newman SM, Braga RR. Influence of matrix composition on polymerization stress development of experimental composites. *Dent Mater.* 2010; 26: 697-703.
95. Gonçalves F, Kawano Y, Braga RR. Contraction stress related to composite inorganic content. *Dent Mater.* 2010; 26: 704-9.
96. Wu MK, Wesselink PR. An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: a leakage study in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 499-502.

97. De Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru FM, Silva LA. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endod J.* 2000; 33: 25-7.
98. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. *J Endod.* 2005; 31: 91-6.
99. Reeh ES, Douglas WH, Messer HH. Stiffness of endodontically treated teeth related to restoration technique. *J Dent Res.* 1989; 68: 1540-4.
100. Tay FR, Pashley DH. Monoblocks in root canals: a hypothetical or a tangible goal. *J Endod.* 2007; 33: 391-8.
101. Teixeira FB, Teixeira ECN, Thompson JY, Trope M. Fracture resistance of roots endodontically treated with a new resin filling material. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135: 646-52.
102. Perdigão J, Lopes MM, Gomes G. Interfacial adaptation of adhesive materials to root canal dentin. *J Endod.* 2007; 33: 259-63.
103. Onay EO, Ungor M, Ari H, Belli S, Ogus E. Push-out bond strength and SEM evaluation of new polymeric root canal fillings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 879-85.
104. Costa JA, Rached-Júnior FA, Souza-Gabriel AE, Silva-Sousa YTC, Sousa-Neto MD. Push-out strength of methacrylate resin-based sealers to root canal walls. *Int Endod J.* 2010; 43: 698-706.
105. Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. *J Endod.* 2005; 31: 514-9.
106. Tay FR, Hiraishi N, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Gillespie WT, Doyle MD. Bondability of Resilon to a methacrylate-based root canal sealer. *J Endod.* 2006; 32: 133-7.

107. Teixeira FB, Teixeira ECN, Thompson JY, Leinfelder KF, Trope M. Dentinal bonding reaches the root canal system. *J Esthet Restor Dent*. 2004; 16: 348-54.
108. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Effect of a new obturating material on vertical root fracture resistance of endodontically treated teeth. *J Endod*. 2007; 33: 732-6.
109. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ. Reinforcement of immature roots with a new resin filling material in a model of apexification. *J Endod*. 2006; 32: 350-3.
110. Wilkinson KL, Beeson TJ, Kirkpatrick TC. Fracture resistance of simulated immature teeth filled with Resilon, gutta-percha or composite. *J Endod*. 2007; 33: 480-3.
111. Hemalatha H, Sandeep M, Kulkarni S, Yakub SS. Evaluation of fracture resistance in simulated immature teeth using Resilon and ribbond as root reinforcements - an in vitro study. *Dent Traumatol*. 2009; 25: 433-8.
112. Hiraishi N, Papacchini F, Loushine R, Weller RN, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. Shear bond strength of Resilon to a methacrylate-based root canal sealer. *Int Endod J*. 2005; 38: 753-63.
113. Kazandag MK, Sunay H, Tanalp J, Bayirli G. Fracture resistance of roots using different canal filling systems. *Int Endod J*. 2009; 42: 705-10.
114. Williams C, Loushine RJ, Weller RN, Pashley HD, Tay FR. A comparison of cohesive strength and stiffness of Resilon and gutta-percha. *J Endod*. 2006; 32: 553-5.
115. Sagsen B, Kahraman Y, Akdogan G. Resistance to fracture of roots filled with three different techniques. *Int Endod J*. 2007; 40: 31-5.
116. Ribeiro FC, Souza-Gabriel AE, Marchesan MA, Alfredo E, Silva-Sousa YT. Influence of different endodontic filling materials on root fracture susceptibility. *J Dent*. 2008; 36: 69-73.

117. Hanada T, Quevedo CGA, Okitsu M, Yoshioka T, Iwasaki N, Takahashi H, Suda H. Effects of new adhesive resin root canal filling materials on vertical root fractures. *Aust Endod J.* 2010; 36: 19-23.
118. Ricucci D, Grondahl K, Bergenholtz G. Periapical status of root filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90: 354-49.
119. Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu LS, Kim SK, Pashley DH, Gutmann JL, Tay FR. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod.* 2010; 36: 383-99.
120. Aptekar A, Ginnan K. Comparative analysis of microleakage and seal for two obturation materials: Resilon/Epiphany and gutta-percha. *J Can Dent Assoc.* 2006; 72: 245.
121. Sagsen B, Er O, Kahraman Y, Orucoglu H. Evaluation of micro leakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique. *J Endod.* 2006; 32: 1168-70.
122. Stratton RK, Apicella MJ, Mines P. A fluid filltration comparsion of gutta-percha versus Resilon, a new soft resin endodontic obturation system. *J Endod.* 2006; 32: 642-5.
123. Tunga U, Bodrumlu. Apical leakage of Resilon obturation material. *J Contemp Dent Pract.* 2006; 7: 45-52.
124. Tunga U, Bodrumlu E. Assessment of the sealing ability of a new root canal obturation material. *J Endod.* 2006; 32: 876-8.
125. Bodrumlu E, Tunga U. Coronal sealing ability of a new root canal filling material. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73: 623 (abstract).
126. Ishimura H, Yoshioka T, Suda H. Sealing ability of new adhesive root canal filling materials measured by new dye penetration method. *Dent Mater J.* 2007; 26: 290-5.

127. Verissimo DM, do Vale MS, Monteiro AJ. Comparison of apical leakage between canals filled with gutta-percha/AH-plus and Resilon/Epiphany System, when submitted to two filling techniques. *J Endod.* 2007; 33: 291-4.
128. Wedding JR, Brown CE, Legan JJ, Moore BK, Vail MM. An in vitro comparison of micro leakage between Resilon and gutta-percha with a fluid filtration model. *J Endod.* 2007; 33: 1447-9.
129. Kocak MM, Er O, Saglam BC, Yaman S. Apical leakage of Epiphany root canal sealer combined with different master cones. *Eur J Dent.* 2008; 2: 91-5.
130. Shin S, Jee S, Song J, Junbg I, Cha J, Kim E. Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or Resilon. *J Endod.* 2008; 34: 445-8.
131. Duggan D, Arnold RR, Teixeira FB, Caplan DJ, Tawil P. Periapical inflammation and bacterial penetration after coronal inoculation of dog roots filled with RealSeal 1 or Thermafil. *J Endod.* 2009; 35: 852-7.
132. Moura-Netto C, Pinto T, Davidowicz H, de Moura AAM. Apical leakage of three resin-based endodontic sealers after 810-nm-diode laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 891-4.
133. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Rao NR, Naik A. A comparative evaluation of 3 root canal filling systems. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111: 387-93.
134. Shashidhar C, Shivanna V, Shivamurthy G, Shashidhar J. The comparison of microbial leakage in roots filled with resilon and gutta-percha: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2011; 14: 21-7.
135. Biggs SC, Knowles KI, Ibarrola JL, Pashley DH. An in vitro assessment of the sealing ability of Resilon/ Epiphany using a fluid filtration. *J Endod.* 2006; 32: 759-61.

136. Dutra F, Barroso JM, Carrasco LD, Capelli A, Guerisoli DM, Pécora JD. Evaluation of apical microleakage of teeth sealed with four different canal sealers. *Appl Oral Sci.* 2006; 14: 341-5.
137. Pitout E, Oberholzer TG, Blignaut E, Molepo J. Coronal leakage of teeth root filled with gutta-percha or Resilon root canal filling material. *J Endod.* 2006; 32: 610-5.
138. Baumgartner G, Zehnder M, Paque F. Enterococcus faecalis type strain leakage through root canals filled with gutta-percha/AH plus or Resilon/ Epiphany. *J Endod.* 2007; 33: 45-7.
139. Bodrumlu E, Tunga U. The apical sealing ability of a new root canal filling material. *Am J Dent.* 2007; 20: 295-8.
140. De-Deus G, Audi C, Murad C, Fidel S, Fidel RA. Sealing ability of oval-shaped canals filled using the System B heat source with either gutta-percha or Resilon: an ex vivo study using a polymicrobial leakage model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 114-9.
141. Kaya BU, Kececi AD, Belli S. Evaluation of the sealing ability of gutta-percha and thermoplastic synthetic polymer-based systems along the root canals through glucose penetration model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 66-73.
142. Muñoz HR, Saravia-Lemus GA, Florián, Lainfiesta JF. Microbial leakage of Enterococcus faecalis after post space preparation in teeth filled in vivo with RealSeal versus gutta-percha. *J Endod.* 2007; 33: 674-5.
143. Raina R, Loushine RJ, Weller RN, Tay FR, Pashley D H. Evaluation of the quality of the apical seal in Resilon/Epiphany and Gutta-percha/AH Plus-filled root canals by using a fluid filtration approach. *J Endod.* 2007; 33: 944-7.
144. Shemesh H, van der Bos M, Wu, MK, Wesselink PR. Glucose penetration and uid transport through coronal root structure and filled root canals. *Int Endod J.* 2007; 40: 866-72.



145. Silveira FF, Soares JA, Nunes E, Mordente VL. Negative influence of continuous wave technique on apical sealing of the root canal system with Resilon. *J Oral Sci.* 2007; 49: 121-8.
146. Belli S, Ozcan E, Derinbay O, Eldeniz AU. A comparative evaluation of sealing ability of a new, self etching, dual-curable sealer hybrid root SEAL (MetaSEAL). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 45-52.
147. Hollanda AC, Estrela CR, Decurcio D de A, Silva JA, Estrela C. Sealing ability of three commercial resin-based endodontic sealers. *Gen Dent.* 2009; 57: 368-73.
148. Kazandag MK, Tanalp J, Bayrak ÖF, Sunay H, Bayirh G. Microleakage of various root filling systems by glucose filtration analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 96-102.
149. Lyons WW, Hartwell GR, Stewart JT, Reavley B, Appelstein C, Lafkowitz S. Comparison of coronal bacterial leakage between immediate versus delayed post-space preparations in root canals filled with Resilon/Epiphany. *Int Endod J.* 2009; 42: 203-7.
150. Shokouhinejad N, Sharifian MR, Aligholi M, Assadian H, Tabor RK, Nekoofar MH. The sealing ability of Resilon and gutta-percha following different smear layer removal methods: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110: 45-9.
151. Onay EO, Ungor M, Orucoglu H. An in vitro evaluation of the apical sealing ability of a new resin based root canal obturation system. *J Endod.* 2006; 32: 976-8.
152. Shemesh H, Wu MK, Wesselink PR. Leakage along the apical root fillings with and without smear layer using two different leakage models: a two month longitudinal ex vivo study. *Int Endod J.* 2006; 39: 968-76.
153. Paqué F, Sirtes G. Apical sealing ability of Resilon/ Epiphany versus gutta-percha/AH Plus: immediate and 16 month leakage. *Int Endod J.* 2007; 40: 722-9.

154. De-Deus G, Namen F, Galan J. Reduced long-term sealing ability of adhesive root fillings after water-storage stress. *J Endod.* 2008; 34: 322-5.
155. Jack RM, Goodell GG. In vitro comparison of coronal microleakage between Resilon alone and gutta-percha with a glass ionomer intraorifice barrier using a fluid filtration model. *J Endod.* 2008; 34: 718-20.
156. Pasqualini D, Scotti N, Mollo L, Berutti E, Angelini E, Migliaretti G, Cuffini A, Adlerstein D. Microbial leakage of gutta-percha and Resilon root canal filling material: a comparative study using a new homogenous assay for sequence detection. *J Biomater Appl.* 2007; 22: 337-52.
157. Saleh I M, Ruyter I E, Haapasalo M, Ørstavik D. Bacterial penetration along different root canal filling materials in the presence or absence of smear layer. *Int Endod J.* 2008; 41: 32-40.
158. De Bruyne MA, De Moor RJ. Long-term sealing ability of Resilon apical root-end fillings. *Int Endod J.* 2009; 42: 884-92.
159. Kokorikos I, Kolokouris I, Economides N, Gogos C, Helvatjoglu-Antoniades M. Long-term evaluation of the sealing ability of two root canal sealers in combination with self-etching bonding agents. *J Adhes Dent.* 2009; 11: 239-46.
160. Hirai VH, da Silva Neto UX, Westphalen VPD, Perin CP, Carneiro E, Fariniuk LF. Comparative analysis of leakage in root canal filling performed with gutta-percha and Resilon cones with AH Plus and Epiphany sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 131-5.
161. Santos J, Tjäderhane L, Ferraz C, Zaia A, Alves M, De Goes M, Carrilho M. Long-term sealing ability of resin-based root canal fillings. *Int Endod J.* 2010; 43: 455-60.
162. Wu MK, Wesselink PR. Endodontic leakage studies reconsidered. Part I. Methodology, application and relevance. *Int Endod J.* 1993; 26: 37-43.

163. Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of moist root canal dentin with the use of methacrylate-based endodontic sealers: an in vitro coronal dye leakage study. *J Endod.* 2008; 34: 76-9.
164. De-Deus G, Namen F, Galan J, Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizing bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *J Endod.* 2008; 34: 703-5.
165. Yiu CK, Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Imazato S, King NM, Lai SC. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res.* 2002; 81: 628-32.
166. Erdemir A, Ari H, Gungunes H, Belli S. Effects of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. *J Endod.* 2004; 30: 113-6.
167. Ozturk B, Özer F. Effect of NaOCl on bond strengths of bonding agents to pulp chamber lateral walls. *J Endod.* 2004; 30: 362-5.
168. Nagas E, Cehreli Z, Durmaz V, Vallittu P, Lassila L. Regional push out bond strength and coronal micro leakage of Resilon after different light curing methods. *J Endod.* 2007; 33: 1464-8.
169. Babb BR, Loushine RJ, Bryan TE, Ames JM, Causey MS, Kim J, Kim YK, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Bonding of self-adhesive (self-etching) root canal sealers to radicular dentin. *J Endod.* 2009; 35: 578-82.
170. Kim YK, Mai S, Haycock JR, Kim SK, Loushine RJ, Pashley DH, Tay FR. The self-etching potential of RealSeal versus RealSeal SE. *J Endod.* 2009; 35:1264-9.
171. Ballal NV, Tweeny A, Baumgartner JC, Ginjupalli K, Saraswathin V. Effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the shear bond strength of RealSeal SE sealer to root canal dentin. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2013; 21: 152-6.
172. Christopher SR, Mathai V, Nair RS, Angelo JM. The effect of three different antioxidants on the dentinal tubular penetration of Resilon and Real Seal SE on

- sodium hypochlorite-treated root canal dentin: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2016; 19: 161-5.
173. De Assis DF, Prado M, Simão RA. Evaluation of the interaction between endodontic sealers and dentin treated with different irrigant solutions. *J Endod.* 2011; 37: 1550-2.
174. Stelzer R, Schaller HG, Gernhardt CR. Push-out bond strength of RealSeal SE and AH Plus after using different irrigation solutions. *J Endod.* 2014; 40: 1654-7.
175. Prado M, de Assis DF, Gomes BP, Simão RA. Effect of disinfectant solutions on the surface free energy and wettability of filling material. *J Endod.* 2011; 37: 980-2.
176. Chen H, Zhao X, Qiu Y, Xu D, Cui L, Wu B. The Tubular Penetration Depth and Adaption of Four Sealers: A Scanning Electron Microscopic Study. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 2946524.
177. Stoll R, Thull P, Hobeck C, Yüksel S, Jablonski-Momeni A, Roggendorf MJ, Frankenberger R. Adhesion of self-adhesive root canal sealers on gutta-percha and Resilon. *J Endod.* 2010; 36: 890-3.
178. Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmüller B, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on different root canal filling materials and sealers. *J Endod.* 2011; 37: 1247-52.
179. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998; 24: 91-6.
180. Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int Endod J.* 1997; 30: 141-4.
181. Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles-the view of the validator. *Dev Biol.* 2002; 111: 199-206.

182. Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *ALTEX*. 2003; 20: 3-61.
183. Combs RD. The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods. *Altern Lab Anim*. 2002; 30: 151-65.
184. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod*. 2000; 26: 328-30.
185. Repetto M. *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. 3ª ed. Sevilla: Ediciones Díaz de Santos, 2002. Pág. 303-5.
186. Rappaport H, Lilly G, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1964; 8: 785-801.
187. Beltes P, Koulaouzidou E, Kolokuris I, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two glass-ionomer root canal sealers. *J Endod*. 1997; 23: 572-4.
188. Fentem JH. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Hum Exp Toxicol*. 1994; 13: 445-9.
189. Kostoryz EL, Tong PY, Strautman AF, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM. Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *J Dent Res*. 2001; 80: 1789-92.
190. Gregson KS, Terrence O'Neill J, Platt JA, Jack Windsor L. In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. *Dent Mater*. 2008; 24: 1461-7.
191. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod*. 1998; 24: 528-33.

192. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod.* 1999; 25:114-7.
193. Tronstad L, Wennberg A, Hasselgren G. Screening tests for dental materials. *J Endod.* 1978; 4: 300-1.
194. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *J Endod.* 2001; 27: 12-21.
195. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2006; 32: 756-8.
196. Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endod J.* 2006; 39: 940-4.
197. Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact with Millipore filter assays. *J Endod.* 2007; 33: 24-7.
198. Brasil DS, Soares JA, Horta MC, Ferreira CL, Nunes E, Chaves GG, Silveira FF. Periapical repair in dog teeth: root canal adhesive filling by using the Resilon System. *J Endod.* 2010; 36: 482-8.
199. Donadio M, Jiang J, Safavi K E, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP, Resilon cones in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 76-9.
200. Economides N, Koulaouzidou E A, Gogos C, Kolokouris I, Beltes P, Antoniadis D. Comparative study of the cytotoxic effect of Resilon against two cell lines. *Braz Dent J.* 2008; 19: 291-5.
201. Tay FR, Pashley DH, Williams MC, Raina R, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, King NM. Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. I. Alkaline hydrolysis. *J Endod.* 2005; 31: 593-8.

202. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod.* 2006; 32: 989-92.
203. Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, Wataha JC. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endod J.* 2008; 41: 1072-8.
204. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2008; 41: 72-7.
205. Al-Hiyasat A S, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J.* 2010; 43: 148-53.
206. Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 95: 380-6.
207. Maeda H, Tomokiyo A, Koori K, Monnouchi S, Fujii S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Saito T, Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. *Int Endod J.* 2011; 44: 425-31.
208. Heitman EP, Joyce AP, McPherson JC 3rd, Roberts S, Chuang A. An in vitro evaluation of the growth of human periodontal ligament fibroblasts after exposure to a methacrylate-based endodontic sealer. *J Endod.* 2008; 34: 186-9.
209. Baraba A, Želježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J.* 2011; 44: 652-61.
210. Nielsen BA, Beeler WJ, Vy C, Baumgartner JC. Setting times of Resilon and other sealers in aerobic and anaerobic environments. *J Endod.* 2006; 32: 130-2.

211. 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 gingival and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40: 329-37.
212. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005; 38: 505-9.
213. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991; 70: 1450-5.
214. Onay EO, Ungor M, Ozdemir BH. In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 60-6.
215. De Campos-Pinto MM, de Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD, da Cruz Perez DE. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105: 77-81.
216. Gambarini G, Romeo U, Tucci E, Gerosa R, Nocca G, Lupi A, De Luca M, Quaranta M, Gagliani M, Testarelli L. Cytotoxicity of Epiphany SE Endodontic sealer: a comparative in vitro study. *Med Sci Monit.* 2009; 15: 15-8.
217. Garcia Lda F, Marques AA, Roselino Lde M, Pires-de-Souza Fde C, Consani S. Biocompatibility evaluation of Epiphany/Resilon root canal filling system in subcutaneous tissue of rats. *J Endod.* 2010; 36: 110-4.
218. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu G, Grana D. Subcutaneous connective tissue reaction to methacrylate resin based and zinc oxide and eugenol sealers. *J Endod.* 2010; 36: 1574-9.
219. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials.* 2005; 26: 745-53.



220. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7: 172-9.
221. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 333-55.
222. Gopferisch A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996; 17: 103-14.
223. Boland EJ, MacDougall M, Carnes DL, Dickens SH. In vitro cytotoxicity of a remineralizing resin-based calcium phosphate cement. *Dent Mater.* 2006; 22: 338-45.
224. Gatewood RS. Endodontic materials. *Dent Clin North Am.* 2007; 15: 695-712.
225. Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, Bryan TE, Lockwood PE, Sui M, Roberts S, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod.* 2009; 35: 225-8.
226. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Yoshiba N, Okiji T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44: 669-75.
227. Ruparel NB, Ruparel SB, Chen PB, Ishikawa B, Diogenes A. Direct effect of endodontic sealers on trigeminal neuronal activity. *J Endod.* 2014; 40: 683-7.
228. Bodrumlu E, Semiz M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. *J Can Dent Assoc.* 2006; 72: 637.
229. Melker KB, Vertucci FJ, Fernanda R, Progulske-Fox A, Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. *J Endod.* 2006; 32: 148-51.
230. Bodrumlu E, Alaçam T. The antimicrobial and antifungal activity of a root canal core material. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138: 1228-32.

231. Pinheiro CR, Guinesi AS, Pizzolitto AC, Bonetti- Filho I. In vitro antimicrobial activity of Acroseal, Poli I and Epiphany against *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 2009; 20: 107-11.
232. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss E, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod.* 2008; 34: 735-8.
233. Schäfer E, Bering N, Bürklein S. Selected physicochemical properties of AH Plus, EndoREZ and RealSeal SE root canal sealers. *Odontology.* 2015; 103: 61-5.
234. Bodrumlu E, Gungor K. Radiopacity of an endodontic core material. *Am J Dent.* 2009; 22: 15-9.
235. Imura N, Kato A S, Hata G I, Uemura M, Toda T, Weine F. A comparison of the relative efficacies of four hand and rotary instrumentation techniques during endodontic retreatment. *Int Endod J.* 2000; 33: 361-6.
236. Ferreira JJ, Rhodes JS, Pitt Ford TR. The efficacy of gutta-percha removal using ProFiles. *Int Endod J.* 2001; 34: 267-74.
237. Masiero AV, Barletta FB. Effectiveness of different techniques for removing gutta-percha during retreatment. *Int Endod J.* 2005; 38: 2-7.
238. Ezzie E, Fleury A, Solomon E, Spears R, He J. Efficacy of retreatment techniques for a resin based root canal obturation material. *J Endod.* 2006; 32: 341-4.
239. De Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. Comparison between gutta-percha and Resilon removal using two different techniques in endodontic retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 362-4.
240. Schirrmeister JF, Meyer KM, Hermanns P, Altenburger MJ, Wrbas KT. Effectiveness of hand and rotary instrumentation for removing a new synthetic polymer-based root canal obturation material (Epiphany) during retreatment. *Int Endod J.* 2006; 39: 150-6.

241. Cunha RS, De Martin AS, Barros PP, da Silva FM, de Castilho Jacinto R, da Silveira Bueno CE. In vitro evaluation of the cleansing working time and analysis of the amount of gutta-percha or Resilon remnants in the root canal walls after instrumentation for endodontic retreatment. *J Endod.* 2007; 33: 1426-8.
242. Hassanloo A, Watson P, Finer Y, Friedman S. Retreatment efficacy of the Epiphany soft resin obturation system. *Int Endod J.* 2007; 40: 633-43.
243. Bodrumlu E, Uzun O, Topuz O, Semiz M. Efficacy of three techniques in removing root canal filling material. *J Can Dent Assoc.* 2008; 74: 721.
244. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Three-dimensional evaluation of effectiveness of hand and rotary instrumentation for retreatment of canals filled with different materials. *J Endod.* 2008; 34: 1370-3.
245. Lizuka N, Takenaka S, Shigetani Y, Okiji T. Removal of resin-based root canal filling materials with K3 rotary instruments: relative efficacy for different combinations of filling materials. *Dent Mater J.* 2008; 27: 75-80.
246. Somma F, Cammarota G, Plotino G, Grande NM, Pameijer CH. The effectiveness of manual and mechanical instrumentation for the retreatment of three different root canal filling materials. *J Endod.* 2008; 34: 466-9.
247. Taşdemir T, Yildirim T, Çelik D. Comparative study of removal of current endodontic fillings. *Int Endod J.* 2008; 34: 326-9.
248. Ring J, Murray PE, Namerow KN, Moldauer BI, Garcia-Godoy F. Removing root canal obturation materials: a comparison of rotary le systems and re-treatment agents. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140: 680-8.
249. Zarei M, Shahrami F, Vatanpour M. Comparison between gutta-percha and Resilon retreatment. *J Oral Sci.* 2009; 51: 181-5.

250. Fenoul G, Meless GD, Pérez F. The efficacy of R-Endo rotary NiTi and stainless steel hand instruments to remove gutta-percha and Resilon. *Int Endod J.* 2010; 43: 135-41.
251. Marfisi K, Mercade M, Plotino G, Duran-Sindreu F, Bueno R, Roig M. Efficacy of three different rotary files to remove gutta-percha and resilon from root canals. *Int Endod J.* 2010; 43: 1022-8.
252. Friedman S, Moshonov J, Trope M. Efficacy of removing glass ionomer cement, zinc oxide eugenol and epoxy resin sealers from retreated root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1992; 73: 609-12.
253. Friedman S, Moshonov J, Trope M. Residue of gutta-percha and a glass ionomer cement sealer following root canal retreatment. *Int Endod J.* 1993; 26: 169-72.
254. Moshonov J, Trope M, Friedman S. Retreatment efficacy 3 months after obturation using glass ionomer cement, zinc oxide-eugenol, and epoxy resin sealers. *J Endod.* 1994; 20: 90-2.
255. Wiemann AH, Wilcox LR. In vitro evaluation of four methods of sealer placement. *J Endod.* 1991; 17: 444-7.
256. Verdellis K, Eliades G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle, and apical root dentin locations. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15: 164-70.
257. Kosti E, Lambrianidis T, Economides N, Neofitou C. Ex vivo study of the efficacy of H-Files and rotary Ni-Ti instruments to remove gutta-percha and four types of sealer. *Int Endod J.* 2006; 39: 48-54.
258. Bayram E, Dalat D, Bayram M. Solubility evaluation of different root canal sealing materials. *J Contemp Dent Pract.* 2015; 16: 96-100.
259. Vranas RN, Hartwell GR, Moon PC. The effect of endodontic solutions on Resorcinol-formalin paste. *J Endod.* 2003; 29: 69-72.

260. Shokouhinejad N, Sabeti MA, Hasheminasab M, Shafiei F, Shasmshiri AR. Push-out bond strength of Resilon/Epiphany self-etch to intraradicular dentin after retreatment: a preliminary study. *J Endod.* 2010; 36: 493-6.
261. Royal M J, Williamson AE, Drake DR. Comparison of 5.25% sodium hypochlorite, MTAD, and 2% chlorhexidine in the rapid disinfection of polycaprolactone-based root canal filling material. *J Endod.* 2007; 33: 42-4.
262. Pawinska M, Kierklo A, Marczuk-Kolada G. New technology in endodontics the Resilon-Epiphany system for obturation of root canals. *Adv Med Sci.* 2006; 51: 154-7.
263. Torabinejad M, Kutsenko DK, Machnick TK, Ismail A, Newton CW. Levels of evidence for the outcome of nonsurgical endodontic treatment. *J Endod.* 2005; 31: 637-46.
264. Cotton TP, Schindler WG, Schwartz SA, Watson WR, Hargreaves KM. A retrospective study comparing clinical outcomes after obturation with Resilon/Epiphany or gutta-percha/Kerr sealer. *J Endod.* 2008; 34: 789-97.
265. Conner DA, Caplan DJ, Teixeira FB, Trope M. Clinical outcome of teeth treated endodontically with a nonstandardized protocol and root filled with Resilon. *J Endod.* 2007; 33: 1290-2.
266. Barborka BJ, Woodmansey KF, Glickman GN, Schneiderman E, He J. Long-term Clinical Outcome of Teeth Obturated with Resilon. *J Endod.* 2017; 43: 556-60.
267. Wong JG, Caputo AA, Li P, White SN. Microleakage of adhesive resinous materials in root canals. *J Conserv Dent.* 2013; 16: 213-8.
268. Cotti E, Petreucic V, Re D, Simbula G. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an in vitro study. *J Endod.* 2014; 40: 124-8.
269. Pissiotis E, Spångberg LS. Toxicity of Pulpispad using four different cell types. *Int Endod J.* 1991; 24: 249-57.

270. Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, Dettori C, Pashley DH, Tay FR. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *J Endod.* 2008; 34: 1085-8.
271. Garza EG, Wadajkar A, Ahn C, Zhu Q, Opperman LA, Bellinger LL, Nguyen KT, Komabayashi T. Cytotoxicity of methacrylate-based resins for clinical endodontics in vitro. *J Oral Sci.* 2012; 54: 213-7.
272. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15: 767-71.
273. Grecca FS, Kopper PM, Santos RB, Fossati AC, Carrard VC, Acasigua GA, Figueiredo JA. Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19: 52-6.
274. Karapinar-Kazandaq M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, Bayırlı G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2011; 44: 626-34.
275. 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: 274-7.
276. Brackett MG, Lewis JB, Kious AR, Messer RL, Lockwood PE, Brackett WW, Wataha JC. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 7: 1729-35.
277. Food and Drug Administration, K102163. Access data FDA; 2010 Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/K102163.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K102163.pdf). Accessed February 28, 2014.
278. Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater.* 2000; 16: 188-97.

279. Perdigao J, Swift EJ Jr, Denehy GE, Wefel JS, Donly KJ. In vitro bond strengths and SEM evaluation of dentin bonding systems to different dentin substrates. *J Dent Res.* 1994; 73: 44-55.
280. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol.* 1988; 17: 396-403.
281. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *Am J Dent.* 1998; 11: 106-8.
282. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7: 104-33.
283. Cintra LT, Bernabe PF, de Moraes IG, Gomes-Filho JE, Okamoto T, Consolaro A, Pinheiro TN. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18: 75-82.
284. Marques AA, Sponchiado EC Jr, Garcia LF, Garrido AD, França SC, Lia RC. Morphological analysis of tissue reaction caused by a new endodontic paste in subcutaneous tissue of rats. *J Conserv Dent.* 2011; 14: 309-13.
285. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod.* 2014; 40: 1485-8.
286. Gomes-Filho JE, Gomes AC, Watanabe S, Oliveira SH, Bernabé PF, Percinoto C. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19: 329-36.
287. Soares IJ, Goldberg F. *Endodoncia: Técnica y fundamentos.* 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2012. Pág. 525.
288. Guerreiro-Tanomaru JM, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. *Braz Oral Res.* 2009; 23: 119-23.

289. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2014; 47: 437-48.
290. Tanomaru JM, Cezare L, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. Evaluation of the radiopacity of root canal sealers by digitization of radiographic images. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12: 355-7.
291. Sousa-Neto MD, Guimarães LF, Saquy PC, Pécora JD. Effect of different grades of gum resins and hydrogenated resins on the solubility, disintegration, and dimensional alterations of Grossman cement. *J Endod.* 1999; 25: 477-80.
292. Javidi M, Zarei M, Naghavi N, Mortazavi M, Nejat AH. Zinc oxide nano-particles as sealer in endodontics and its sealing ability. *Contemp Clin Dent.* 2014; 5: 20-4.
293. Royer K, Liu XJ, Zhu Q, Malmstrom H, Ren YF. Apical and root canal space sealing abilities of resin and glass ionomer-based root canal obturation systems. *Chin J Dent Res.* 2013; 16: 47-53.
294. White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod.* 2002; 28: 828-30.
295. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 355-61.
296. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cell and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002; 35: 153-8.
297. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod.* 2013; 39: 833-8.



298. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 279-303.
299. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77: 4-12.
300. Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev.* 2012; 8: 891-7.
301. Manhart MJ. The calcium hydroxide method of endodontic sealing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 54: 219-24.
302. Stock CJ. Calcium hydroxide: root resorption and perio-endo lesions. *Br Dent J.* 1985; 158: 325-34.
303. Silva LA, Barnett F, Pumarola-Suñé J, Cañadas PS, Nelson-Filho P, Silva RA. Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility in vivo. *J Endod.* 2014; 40: 1424-8.
304. Bailey GC, Ng YL, Cunnington SA, Barber P, Gulabivala K, Setchell DJ. Root canal obturation by ultrasonic condensation of gutta-percha. Part II: an in vitro investigation of the quality of obturation. *Int Endod J.* 2004; 37: 694-8.
305. Marciano MA, Bramante CM, Duarte MA, Delgado RJ, Ordinola-Zapata R, Garcia RB. Evaluation of single root canals filled using the lateral compaction, tagger's hybrid, microseal and guttaflow techniques. *Braz Dent J.* 2010; 21: 411-5.
306. Heyder M, Kranz S, Völpel A, Pfister W, Watts DC, Jandt KD, Sigusch BW. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater.* 2013; 29: 542-9.
307. Barros J, Costa-Rodrigues J, Lopes MA, Pina-Vaz I, Fernandes MH. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod.* 2014; 40: 1149-55.

308. Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod.* 2014; 40: 530-3.
309. Melegari KK, Botero TM, Holland GR. Prostaglandin E production and viability of cells cultured in contact with freshly mixed endodontic materials. *Int Endod J.* 2006; 39: 357-62.
310. Van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* 1972; 46: 845-52.
311. Unanue ER. The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. *Immunol Rev.* 1978; 40: 227-55.
312. Stern MH, Mackler BF, Dreizen S. A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J Endod.* 1981; 7: 70-4.
313. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod.* 1996; 22: 311-6.
314. Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J* 2009; 20: 99-106.
315. Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, Valera MC. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *Int Endod J.* 2018; 5: 41-57.
316. Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod.* 2010; 36: 40-4.

317. Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2014; 40: 1156-9.
318. Van Landuyt KL, Geebelen B, Shehata M, Furche SL, Durner J, Van Meerbeek B, Hickel R, Reichl FX. No evidence for DNA double-strand breaks caused by endodontic sealers. *J Endod.* 2012; 38: 636-41.
319. Gambarini G, Testarelli L, Al-Sudani D, Plotino G, Grande NM, Lupi A, Giardina B, Nocca G, De Luca M. In vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Different Root Canal Filling Materials. *Open Dent J.* 2011; 5: 29-32.
320. Gerzina TM, Hume WR. Effect of hydro-static pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res.* 1995; 74: 369-73.
321. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996; 24: 125-8.
322. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod.* 2009; 35: 1577-9.
323. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Behaviour of co-cultured human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers' extracts. *Clin Oral Investig.* 2014; 18: 479-88.
324. Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK, Bahadure RN, Tawani SG, Tawani G, Badole SG. A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restor Dent Endod.* 2013; 38: 204-9.
325. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res.* 1996; 368: 181-94.
326. Brodin P. Neurotoxic and analgesic effects of root canal cements and pulp-protecting dental materials. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4: 1-11.

327. Chang MC, Lin LD, Chen YJ, Tsai YL, Cheng YA, Kuo CS, Chang HH, Tai TF, Lin HJ, Jeng JH. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2010; 43: 251-7.
328. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002; 28: 94-8.
329. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod.* 2002; 28: 749-53.
330. Silva LA, Leonardo MR, Oliveira DS, Silva RA, Queiroz AM, Hernández PG, Nelson-Filho P. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J.* 2010; 21: 38-45.
331. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent.* 2011; 21: 353-60.
332. Dahl JE. Toxicity of endodontic filling materials. *Endod Topics.* 2005; 12: 39-43.
333. Silva LAB, Azevedo LU, Consolaro A, Barnett F, Xu Y, Battaglino RA, Cañadas PS, de Oliveira KMH, Silva RAB. Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue. *Clin Oral Investig.* 2017; 21: 2851-61.
334. Anderson JM. Biological responses to materials. *Ann Rev Mat Res.* 2001; 31: 81-110.
335. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972; 175: 409-16.
336. Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshiba K, Kaneko R, Yoshiba N, Shigetani Y, Nör JE, Okiji T. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. *J Endod.* 2012; 38: 313-7.

337. Lopes JV, Oliveira PG, Sousa JB, Bão SN, Takano GH, Leal II. Histopathologic evaluation of the peritoneum exposed to heat shock: experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2007; 22: 342-50.