

Comportamiento biológico de dos selladores endodónticos biocerámicos en el tejido óseo de la rata. Un ensayo in vivo

Biological behavior of two bioceramic endodontic sealers in the bone tissue of the rat. In vivo study

Presentado: 25 de mayo de 2020

Aceptado: 28 de julio de 2020

Osvaldo Zmener,^a Cornelis H. Pameijer,^b Roberto Della Porta^a

^aCarrera de Especialización en Endodoncia, Escuela de Odontología USAL/AOA, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina

^bSchool of Dental Medicine, University of Connecticut, Farmington, CT, Estados Unidos

Resumen

Objetivo: Analizar cualitativamente la biocompatibilidad y la capacidad osteogénica de dos selladores endodónticos a base de silicato de calcio: el biocerámico Bio-C Sealer (BIOc) y MTA Densell Sealer (MTAd).

Materiales y métodos: En la tibia izquierda de 30 ratas Wistar macho se implantó un tubo de silicona obturado con BIOc. De igual forma, en la tibia derecha de cada una se implantó un tubo de silicona obturado con MTAd. Los animales fueron eutanasiados en grupos de 10 a los 7, 30 y 90 días. Las tibias fueron procesadas para su análisis histológico y analizadas con microscopía óptica. Según lo observado, fueron clasificadas en tres categorías: 1: Presencia de cápsula fibrosa sana y neoformación ósea, sin células inflamatorias; 2: Cápsula fibrosa con o sin células inflamatorias, formación inicial de trabéculas óseas y presencia de células inflamatorias en los tejidos circundantes; 3: Ausencia de cápsula y/o tejido óseo y presencia de numerosas células inflamatorias. Los re-

sultados fueron analizados con las pruebas de McNemar y de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Resultados: A los 7 días, los tejidos en contacto con BIOc y MTAd reaccionaron según la categoría 3. A los 30 días, todos los casos correspondieron a la categoría 2. A los 90 días, los 10 implantes de BIOc fueron clasificados según la categoría 1. MTAd presentó nueve casos de categoría 1 y un caso de categoría 2. No hubo diferencias significativas entre ambos selladores dentro de cada uno de los períodos de observación ($P > 0,05$), pero sí las hubo cuando se compararon los resultados obtenidos entre períodos de observación ($P < 0,05$).

Conclusión: Al finalizar el ensayo, Bio-C Sealer y MTA Densell Sealer se comportaron como materiales biocompatibles y osteogénicos en tibias de rata.

Palabras clave: Biocerámicos, biocompatibilidad, selladores endodónticos, tejido óseo.

Abstract

Aim: To analyze the biocompatibility and osteogenic capacity of two silicate-based endodontic sealers, the bio-ceramic Bio C-Sealer (BIOc) and the MTA-based sealer MTA Densell (MTAd).

Materials and methods: Silicone tubes filled with BIOc were implanted in the left tibias of 30 white male Wistar rats (one per tibia). In similar fashion, tubes filled with MTAd were implanted in the right tibias. The animals were euthanized in groups of 10 at 7, 30 and 90 days postoperatively. The tibias were removed, processed for histology and analysed under optical microscopy. The observations were classified in three categories: 1: Presence of a healthy fibrous capsule and

newly formed bone trabeculae without inflammatory cells. 2: Fibrous capsule with or without inflammatory cells, initial formation of bone trabeculae and presence of inflammatory cells in the surrounding tissues. 3: Absence of a fibrous capsule and/or bone formation with the presence of numerous inflammatory cells. Data was analyzed by the McNemar and the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Results: At 7 days: The tissues in contact with BIOc and MTAd reacted as category 3. At 30 days: All cases were classified as category 2. At 90 days: All BIOc cases were in category 1 while MTAd presented nine cases of category 1 and one case of category 2. There were no significant differences

es ($P > 0.05$) between both sealants BIOc and MTAd in each period group. However, there were significant differences ($P < 0.05$) when the results between periods were compared.

Conclusion: At the end of the experiment both, BIOc and

MTAd behaved as biocompatible and osteogenic materials in the rats' tibias.

Key words: Bioceramic, biocompatibility, bone tissue, endodontic sealers.

Introducción

La pérdida o el fracaso de una restauración coronaria suele ser una ruta potencial para el ingreso de bacterias y saliva del medio oral hacia los tejidos perirradiculares.¹⁻³ Con el fin de eliminar o reducir este problema, se han desarrollado e investigado diferentes materiales y técnicas de obturación de los conductos radiculares.⁴

Para cumplir con sus objetivos, un sellador endodóntico debería tener propiedades antibacterianas, ser radiopaco, biocompatible y adherirse bien a las paredes dentinarias del sistema de conductos radiculares.⁴ Según los informes de Camilleri^{5,6} y Assnan *et al.*,⁷ los selladores a base del compuesto de minerales trióxido (MTA) cumplirían con la mayoría de las premisas de un sellador endodóntico ideal.⁵⁻⁷ Estos materiales liberan iones calcio e inducen la formación de hidroxiapatita.⁵⁻⁷ Presentan, además, un excelente sellado marginal, son biocompatibles, bioactivos y osteoconductivos.^{8,9} A raíz de estas propiedades, los selladores a base de MTA han sido indicados como una excelente alternativa para la obturación del sistema de conductos radiculares.⁹ A la gran variedad de productos a base de MTA disponibles, recientemente se agregó el sellador MTA Densell (MTAd; Densell, Buenos Aires, Argentina). Sin embargo, hasta el momento no se dispone de información adecuada acerca de su comportamiento biológico en contacto con el tejido óseo.

Los selladores endodónticos biocerámicos considerados de última generación han introducido ciertos cambios importantes en relación con las técnicas de obturación,¹⁰ por lo que rápidamente captaron el interés de clínicos y especialistas. Los cementos y los selladores biocerámicos son biocompatibles, bioactivos y osteoconductivos, y en presencia de humedad son capaces de establecer una adhesión efectiva con las paredes dentinarias mediante la formación de hidroxiapatita; son radiopacos y de fácil manejo en la clínica.¹¹ Uno de los selladores biocerámicos de reciente aparición en el mercado es el Bio-C Sealer (BIOc; Angelus, Londrina, Brasil). De acuerdo con el fabricante, el sellador está compuesto por aproximadamente un 65% de carga biocerámica, y contiene silicato de calcio, aluminato de calcio, óxido de

calcio, óxido de circonio, dióxido de sílice y agentes dispersivos. Se presenta como un material premezclado, combinado con un vehículo libre de agua. Es hidrófilo, e inicia su reacción de fraguado en presencia de la humedad dentro del conducto radicular y de la existente en los conductillos dentinarios.⁶

El propósito del presente ensayo fue comparar la biocompatibilidad de BIOc y de MTAd, implantados en el tejido óseo de ratas.

Materiales y métodos

El protocolo de este ensayo fue previamente revisado y aprobado por la Comisión de Ética de la Asociación Odontológica Argentina (res. 0219).

Se implantaron en las tibias de 30 ratas Wistar macho (± 350 g de peso) tubos de silicona de 2 mm de longitud, 1,5 mm de diámetro y 0,5 mm de luz interna (Dow Corning Chemicals, Midland, MI, Estados Unidos) que habían sido esterilizados con rayos gamma y obturados al ras en ambos extremos con BIOc (lote 47731) o MTAd (lote RK0519). Ambos materiales fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Durante los procedimientos operatorios, se tuvo especial cuidado de no contaminar las paredes externas de los tubos con los selladores ensayados.

Los animales fueron tratados en conformidad con los requerimientos de las normas ISO 10993-1-1992 e ISO 10993-2-1992^{12,13} y los principios éticos de experimentación y las especificaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio.¹⁴ Durante los 7 días previos a los procedimientos de implantación, fueron puestos en cuarentena a efectos de asegurar que se encontraran en óptimas condiciones de salud.

Cada uno recibió un implante de BIOc en la tibia izquierda y uno de MTAd en la tibia derecha. La preparación de los especímenes y las maniobras quirúrgicas de implantación fueron realizadas bajo condiciones asépticas y de acuerdo con los siguientes procedimientos: luego de anestesiarse a los animales mediante la administración intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (14 mg/kg) y acepromazina (10 mg/kg), se practicó en cada tibia una incisión

longitudinal de aproximadamente 16 mm, separando los tejidos hasta la superficie ósea. Posteriormente, se realizó la disección del periostio y se practicó un orificio con una fresa redonda de carburo-tungsteno de 1,5 mm de diámetro (Maillefer-Dentsply, Ballaigues, Suiza) en el área diafisial, aproximadamente a 8 mm del extremo lateral externo y de forma perpendicular al eje mayor de la tibia, rotando en un micromotor a baja velocidad y constante refrigeración con suero fisiológico estéril. Los implantes se insertaron en los orificios, con uno de sus extremos en contacto directo con el espacio medular, mientras que el lado opuesto se niveló con la superficie externa de la cortical ósea. Finalmente, las heridas se suturaron con hilo de seda. De esta forma, se prepararon 30 implantes experimentales de BIOc y 30 de MTAd; a cada período de observación utilizado (7, 30 y 90 días) le correspondieron 10 implantes de cada material. La posición de los implantes fue controlada mediante radiografías posoperatorias inmediatas de cada una de las tibias, tomadas a una distancia estandarizada de 10 mm con películas Kodak Utraspeed (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, Estados Unidos). Los animales permanecieron en jaulas de acero inoxidable con agua potable y alimento balanceado *ad libitum*, temperatura ambiental controlada (24 °C) y ciclos de luz-oscuridad de doce horas. Luego, fueron eutanasiados mediante una sobredosis de solución anestésica. Las tibias fueron removidas, fijadas en solución de formol-buffer al 10%, descalcificadas y procesadas para su estudio histológico mediante técnicas de rutina. Se obtuvieron secciones longitudinales semi-seriadas de unos 7 mm de espesor de la parte más central de los implantes, las cuales fueron posteriormente coloreadas con hematoxilina y eosina.

Las secciones se analizaron y fotografiaron a diferentes aumentos por medio de un microscopio óptico (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Canon EOS SD M-IV (Canon, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas y analizadas con el programa Image Tool v. 3 (University of Texas Health Center, San Antonio, TX, Estados Unidos). La evaluación fue realizada por dos observadores previamente calibrados. En los casos sobre los que no hubo acuerdo, las secciones histológicas fueron nuevamente analizadas en conjunto hasta obtener un consenso.

Los parámetros considerados para la evaluación fueron la presencia y el espesor de una cápsula fibrosa, el desarrollo de nuevas trabéculas óseas, los cambios vasculares y el tipo de células inflamatorias.

Los criterios empleados para categorizar la reacción de los tejidos fueron los siguientes: Categoría 1: cápsula fibrosa con formación y desarrollo de nuevas trabéculas óseas, sin la presencia de células inflamatorias. Categoría 2: presencia de tejido fibroso, escasas células inflamatorias en los tejidos circundantes y desarrollo incipiente de trabéculas óseas. Categoría 3: ausencia de cápsula fibrosa, sin desarrollo de trabéculas óseas, presencia de tejido granulomatoso con polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, plasmocitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, fibroblastos y numerosos capilares congestionados.

Las diferencias entre BIOc y MTAd dentro de cada período de observación se analizaron por medio del *test* de McNemar. El efecto producido por los factores tiempo y material se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Resultados

Al finalizar cada uno de los períodos posoperatorios, la observación macroscópica de las áreas implantadas reveló que todos los implantes se mantenían en su sitio. A los 7 días las heridas se encontraban en proceso de cicatrización, mientras que a los 30 días habían cicatrizado normalmente. En todos los períodos estudiados, los animales se hallaban en buen estado de salud. Los estadísticos descriptivos del tipo de reacción a los materiales problema en los diferentes períodos experimentales se observan en la tabla 1.

A los 7 días, la reacción de los tejidos en contacto con BIOc y MTAd fue considerada de categoría 3 en todos los casos (fig. 1A-B). Se observó la presencia de numerosos polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, plasmocitos, macrófagos y áreas hemorrágicas. También se observaron áreas necróticas cercanas a los materiales.

A los 30 días, la reacción de los tejidos a BIOc y MTAd correspondió a la categoría 2 en todos los casos (fig. 1C-D). En contacto con ambos materiales se observó una cápsula fibrosa con presencia de células inflamatorias en su interior, un área subyacente

Tabla 1. Reacción del tejido óseo a los materiales implantados. Número de casos en cada categoría.

Material	7 días			30 días			90 días		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
BIOc	0	0	10	0	10	0	10	0	0
MTAd	0	0	10	0	10	0	9	1	0

C: categoría; BIOc: Bio-C Sealer; MTAd: MTA Densell Sealer.

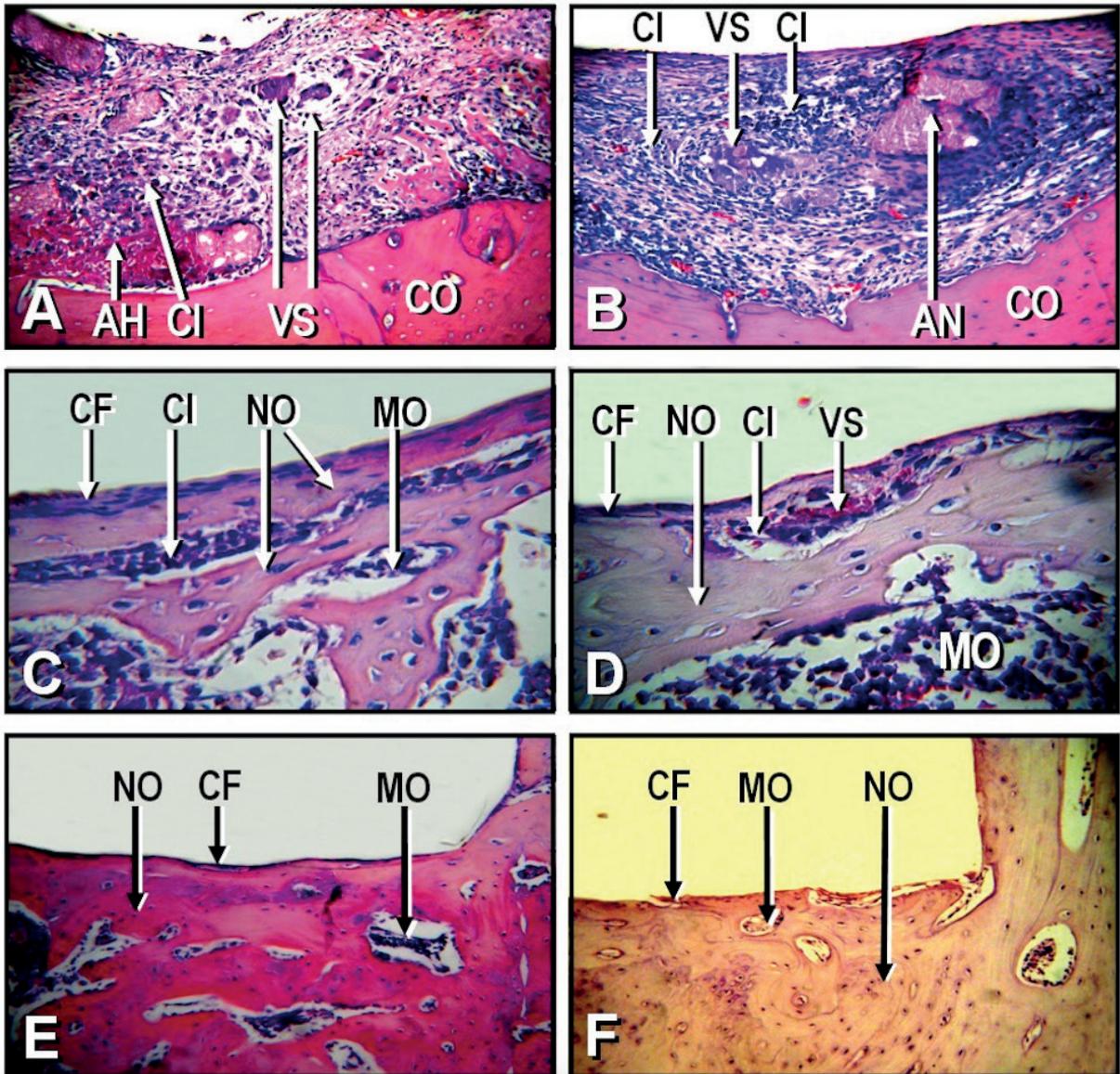


Figura 1. A: Microfotografía de un espécimen representativo de BIOc a los 7 días. Se observa la presencia de áreas hemorrágicas (AH), células inflamatorias (CI) y numerosos vasos sanguíneos (VS). (CO: cortical ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original X850). **B:** Microfotografía de un espécimen representativo de MTAd a los 7 días. Se observa un cuadro similar, con gran cantidad de células inflamatorias (CI), vasos sanguíneos (VS) y áreas necróticas (AN). (CO: cortical ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original X850). **C:** Microfotografía de un espécimen representativo de BIOc a los 30 días. Se observa una cápsula fibrosa con algunas células inflamatorias (CF), trabéculas óseas neoformadas (NO), persistencia de células inflamatorias entre las trabéculas (CI). (MO: médula ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original X850). **D:** Microfotografía de un espécimen representativo de MTAd a los 30 días. Se observa una cápsula fibrosa delgada (CF), células inflamatorias persistentes (CI), vasos sanguíneos (VS) y una trabécula ósea neoformada (NO). (MO: médula ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original X1000). **E:** Microfotografía de un espécimen representativo de BIOc a los 90 días. Se observa una cápsula fibrosa delgada (CF) rodeada por una neoformación ósea (NO), sin células inflamatorias. (MO: médula ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original x850). **F:** Microfotografía de un espécimen representativo de MTAd a los 90 días. Delgada cápsula fibrosa (CF) rodeada por una neoformación de tejido óseo sano (NO). (MO: médula ósea; hematoxilina y eosina; magnificación original X850).

de tejido granulomatoso persistente y neoformación incipiente y desordenada de trabéculas óseas.

A los 90 días, la reacción de los tejidos a BIOc perteneció a la categoría 1 en todos los casos, mientras que para MTAd solo 9 casos fueron catalogados en esta categoría (fig. 1E-F). En contacto con ambos materiales se observó una cápsula fibrosa delgada y la neoformación de tejido óseo sin presencia de células inflamatorias. Un espécimen de MTAd reveló la persistencia de células inflamatorias rodeando una formación incipiente de nuevas trabéculas óseas; fue considerado de categoría 2. En este período se observó que, en contacto con BIOc, los espacios medulares fueron ligeramente más amplios.

El análisis estadístico de los resultados mostró que no hubo diferencias significativas entre materiales dentro de cada período de observación ($P > 0,05$), pero sí las hubo ($P < 0,05$) cuando se compararon los resultados obtenidos en los distintos períodos de observación.

Discusión

La implantación de biomateriales en el tejido óseo de la rata constituye un procedimiento válido como ensayo previo a las pruebas de uso para el estudio de la biocompatibilidad de los materiales endodónticos.^{15,16} El empleo de tubos de silicona como portadores de los materiales investigados tuvo como objetivo el aprovechamiento de su excelente biocompatibilidad, ya informada en estudios anteriores.¹⁷⁻¹⁹ Los períodos de observación estipulados se hallan comprendidos en los plazos establecidos por los estándares internacionales para el estudio de las propiedades biológicas de biomateriales.²⁰ La observación histológica del área que rodeaba los implantes reveló que, a los 30 y 90 días posoperatorios, se encontraban totalmente circundados por una cápsula fibrosa libre de células inflamatorias y tejido óseo, fácilmente distinguible de la reacción focalizada en el área en la que el tejido tomaba contacto directo con los materiales problema.

Si bien hasta el momento el comportamiento biológico de BIOc y MTAd en tejido óseo no ha sido convenientemente informado, la intensidad de la reacción osteogénica a la implantación de ambos materiales al finalizar el presente experimento no resultó totalmente inesperada,²¹ ya que no fue diferente a lo que ocurre con otros selladores comerciales a base de MTA o de silicato de calcio.^{19,22,23} Las áreas necróticas observadas a 7 días de la implantación probablemente se deban a la formación de hidróxido de calcio y al pH altamente alcalino de los materiales

durante su fraguado.^{24,25} Luego de una reacción inflamatoria inicial, tanto BIOc como MTAd estimularon e indujeron la reparación de los tejidos mediante la formación de nuevas trabéculas óseas sanas con espacios medulares regulares, especialmente a los 90 días posoperatorios. Este orden de los acontecimientos es considerado como el desarrollo normal y progresivo del proceso de reparación del tejido óseo luego de la implantación de materiales que poseen la capacidad de estimular e inducir la neoformación de tejidos calcificados.^{9,21-23}

Conclusión

En las condiciones en que fue realizado el presente ensayo, tanto BIOc como MTAd se comportaron como materiales biocompatibles y osteoinductores en tibia de ratas.

Sin embargo, es necesario considerar que los resultados de la implantación de un biomaterial en animales de experimentación no pueden ser extrapolados de forma directa a la situación clínica en humanos, por lo que deberían ser interpretados con cautela.

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este artículo y afirman no haber recibido financiamiento externo para realizarlo.

Referencias

1. Trope M, Chow E, Nissan R. In vitro endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:90-4. DOI: 10.1111/j.1600-9657.1995.tb00465.x
2. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2004;37:193-8. DOI: 10.1111/j.0143-2885.2004.00785.x
3. Boullaguet S, Shaw L, Barthelemy J, Krejci I, Wataha JC. Long-term ability of pulp canal sealer, AH-Plus, GuttaFlow and Epiphany. *Int Endod J* 2008;41:219-26. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2007.01343.x
4. Sagsen B, Er O, Kahraman Y, Erucoglu H. Evaluation of microleakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique. *Int Endod J* 2006;32:1168-70. DOI: 10.1016/j.joen.2006.07.016
5. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod* 2009;35:1412-17. DOI: 10.1016/j.joen.2009.07.008
6. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008;41:408-17. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2007.01370.x
7. 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. DOI: 10.1016/j.joen.2011.10.018

8. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202. DOI: 10.1016/j.joen.2009.09.010
9. Utneja S, Nawal RR, Talwar S, Verma M. Current perspectives of bio-ceramic technology in endodontics: calcium enriched mixture cement - review of its composition, properties and applications. *Restor Dent Endod* 2015;40:1-13. DOI: 10.5395/rde.2015.40.1.1
10. Koch K, Brave D. A new day has dawned: The increased use of bio-ceramics in endodontics. *Dental Town* 2009 [citado el 11 de mayo de 2020];10:17-22. Disponible en: www.ibioceramix.com/files/DentDown.pdf
11. Gomes-Filho JE, Moreira JV, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Dezan Junior E, et al. Sealability of MTA and calcium hydroxide-containing sealers. *J Appl O Sci* 2012;20:347-51. DOI: 10.1590/s1678-77572012000300009
12. ISO 10993-1:1992, *Biological evaluation of medical devices - Part 1: Guidance on selection of tests*, Ginebra, 1992 [citado el 8 de mayo de 2020]. Disponible en: www.iso.org/standard/18960.html
13. ISO 10993-2:1992, *Biological evaluation of medical devices - Part 2: Animal welfare requirements*, Ginebra, 1992 [citado el 8 de mayo de 2020]. Disponible en: www.iso.org/standard/18961.html
14. Bayne K. Developing guidelines of the care and use of animals. *Ann NY Acad Sci* 1998;30105-10. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09122.x
15. Zmener O, Banegas G, Pameijer CH. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. *J Endod* 2005;31:457-9. DOI: 10.1097/01.don.0000145431.59950.64
16. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *J Endod* 2006;32:656-62. DOI: 10.1016/j.joen.2005.12.003
17. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Endod* 1988;14:229-35. DOI: 10.1016/S0099-2399(88)80175-4
18. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA, Grana DR. Subcutaneous connective tissue reaction to methacrylate resin-based and zinc oxide and eugenol sealers. *J Endod* 2010;36:1574-9. DOI: 10.1016/j.joen.2010.06.019
19. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G. Intraosseous biocompatibility of an MTA-based and zinc oxide and eugenol root canal sealer. *Endod Pract* 2013 [citado el 8 de mayo de 2020];16:12-9. Disponible en: endopracticeus.com/wp-content/uploads/2015/02/CE_Zmener.pdf
20. Fédération Dentaire Internationale. Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30:174-6.
21. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod* 2009;35:256-60. DOI: 10.1016/j.joen.2008.11.006
22. Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PM. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2015;41:62-6. DOI: 10.1016/j.joen.2014.09.019
23. Güven EP, Taşlı PN, Yalvac ME, Sofiev N, Kayahan MB, Sahin F. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *Int Endod J* 2013;46:1173-82. DOI: 10.1111/iej.12115
24. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-14. DOI: 10.1111/iej.12062.
25. Wang Z. Bioceramic materials in Endodontics. *Endod Topics* 2015;32:2-30. DOI: 10.1111/etp.12075

Contacto:

OSVALDO ZMENER

osvaldo@zmener.com.ar

Julián Álvarez 2335 (C1425DHI)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina