



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina
Especialidad en Endodoncia

“CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINA 6 COMO MARCADOR DE RESPUESTA
CELULAR ANTE EL ESTÍMULO DE CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la

Especialidad en Endodoncia

Presenta:

C.D. Ana Isabel Soza Bolaños

Dirigido por:

C.D.E.E. Roberto Sánchez Lara y Tajonar

Co-dirigido por:

Dra. María Ofelia Mora Izaguirre

C.D.E.E. Roberto Sánchez Lara y Tajonar

Presidente

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

Secretario

Dr. María del Socorro Maribel Liñán

Fernández

Vocal

Dr. Rosa Martha Pérez Serrano

Suplente

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo 2020

México

RESUMEN

Introducción: El objetivo de la terapia endodóntica es prevenir y curar periodontitis apical a través de la desinfección, conformación y obturación del sistema de conductos radiculares. Con frecuencia subproductos de los cementos selladores endodónticos entran en íntimo contacto con tejidos perirradiculares desencadenando diversos tipos de cambios celulares en el organismo. Es imprescindible entender, estas respuestas moleculares y la forma en que repercuten en el organismo, con la finalidad de elegir materiales que posean mayor biocompatibilidad. **Objetivos:** Determinar cuál cemento sellador estimula, en menor grado, la producción de IL-6 en las células mononucleares humanas expuestas a BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer o Ah Plus. **Material y métodos:** Se estimularon células mononucleares humanas con eluidos obtenidos de los diferentes cementos selladores. Se recuperó el sobrenadante de los cultivos a las 3, 6, 12 y 24 horas de estimulación y se utilizó ELISA para cuantificar la producción de IL-6 en el medio. **Resultados:** El eluido del cemento sellador AH Plus estimuló la mayor producción de IL-6, mientras que el de Pulp Canal Sealer la menor (por debajo del rango detectable del ensayo), existiendo diferencias entre ellos ($p < 0.05$). Se pudo observar que los eluidos de MTA Fillapex, el BioRoot y el Pulp Canal Sealer no existen diferencias de producción en ningún tiempo experimental ($p > 0.05$), mientras que para el AH Plus se observó un incremento a las 12 horas y disminución a las 24 horas ($p < 0.05$). La estimulación realizada con el control positivo mostró un aumento gradual a través del tiempo ($p < 0.05$). **Conclusiones:** En general, todos los eluidos estimularon a la producción de IL-6. Sin embargo, el Pulp Canal Sealer no indujo la producción de la citocina, mientras que el AH Plus fue el que más estimuló.

Palabras clave: IL-6, cementos selladores endodónticos, células mononucleares humanas, ELISA.

SUMMARY

Introduction: The main objective of endodontic therapy is to prevent and cure apical periodontitis through disinfection, conformation and filling of the root canal system. Frequently by-products of endodontic sealer cements come into intimate contact with periradicular tissues, triggering different types of cellular changes in the organism. It is essential to have a better understanding of these molecular responses and the way in which they affect the organism in order to be able to choose materials with greater biocompatibility. **Objectives:** to determine which endodontic sealer cement stimulated less production and release of IL-6 produced by human mononuclear cells, BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer or Ah Plus. **Material and methods:** Human mononuclear cells were stimulated with eluates obtained from the different sealing cements. The culture supernatant was recovered at 3,6,12 and 24 hours of stimulation and ELISA was used to quantify the production and release of IL-6 in the medium. **Results:** The AH Plus sealer eluate stimulated the highest production of IL-6, while that of Pulp Canal Sealer the lowest, below the detectable range of the assay ($p < 0.05$). It was observed that the eluates from MTA Fillapex, BioRoot and Pulp Canal Sealer did not show differences in production at any experimental time ($p > 0.05$), while for AH Plus an increase was observed at 12 hours and a decrease at 24 hours ($p < 0.05$). The stimulation performed with the positive control showed a gradual increase over time ($p < 0.05$). **Conclusions:** In general, all the eluates stimulated the production of IL-6. However, the Pulp Canal Sealer did not induce this cytokine production, while the AH Plus was the one that most stimulated.

Key words: IL-6, endodontic sealer cement, human mononuclear cells, ELISA.

DEDICATORIA

A mamá, Alejandra, Anabelle y Gabriel. Este proyecto empezó y terminó con ayuda de ustedes. Fueron parte y pilares para realizar un logro más. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido iniciar y terminar este largo camino, darme salud y sabiduría para poder enfrentar dos años fuera de casa.

A mi familia por siempre apoyarme desde lejos en todo momento y ser pilar fundamental de mis proyectos.

A todos mis docentes por haber transmitido todos sus conocimientos y haberme dado una base integral científica y humanista durante toda la especialidad, en especial al Dr. Rubén Domínguez Pérez, Dr. Santiago Andaracua García y Dr. Roberto Sánchez Lara por haberme apoyado incondicionalmente durante estos dos años.

Al Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM en especial a la Dra. Ofelia Mora Izaguirre por todo su apoyo en el desarrollo de mi investigación y a la M. en C. María Laura González Dávalos por su disposición en orientarme. A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM por los equipos y orientación de usarlos que fueron cruciales para el proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por haber abierto sus puertas y convertirse en mi casa de estudios y desarrollo profesional.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología de México por becar a jóvenes profesionales e impulsarlos a crecer profesionalmente.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Fundamentación teórica	5
IV. Hipótesis	11
IV.1. Hipótesis de trabajo	11
IV.2. Hipótesis nula	11
V. Objetivos	12
V.1. Objetivo General	12
V.2. Objetivo Específico	12
VI. Material y Métodos	13
VI.1. Tipo de investigación	13
VI.2 Población	13
VI.3. Muestra y tipo de muestra	13
VI.3.1. Criterios de inclusión	13
VI.3.2. Criterios de exclusión	13

VI.3.3. Criterios de eliminación	13
VI.4. Técnicas e instrumentos	14
VI.4.1 Definición de variables y unidades de medida	14
VI.5. Procedimiento	15
VI.5.1 Análisis estadístico	22
VI.5.2 Consideraciones éticas	22
VII. Resultados	23
VIII. Discusión	24
IX. Conclusiones	29
X. Propuestas	30
XI. Bibliografía	31

Abreviaturas y siglas

Células DPL	Células de ligamento periodontal
IL-4	Interleucina 4
IL 6	Interleucina 6
IL 8	Interleucina 8
IL 10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL 12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
MTA	Mineral trióxido agregado
ZOE	Óxido de zinc y eugenol
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas

I. Introducción

Una de las finalidades de la terapia endodóntica es la reducción de la carga bacteriana; así como evitar la filtración de subproductos bacterianos a través de la obturación del sistema de conductos (Williamson *et al.*, 2005). Los cementos selladores endodónticos están idealmente confinados al espacio del conducto radicular (Ricucci y Langeland, 1998). Sin embargo, pueden ser extruidos a través del foramen apical durante su colocación y tener contacto directo con tejidos perirradiculares (Silva *et al.*, 2013).

En la actualidad existen diversos tipos de cementos selladores que varían desde sus presentaciones hasta su composición química. Entre ellos se encuentran cementos selladores a base de óxido de zinc y eugenol, ionómero de vidrio, hidróxido de calcio, resinas sintéticas, resinas epóxicas, resinas polivinílicas, cementos de policarboxilatos, siliconas (Anusavice *et al.*, 2004) y cementos selladores más recientes denominados biocerámicos (Brave *et al.*, 2012). Idealmente un cemento sellador debería proporcionar un excelente sellado cuando fragua, estabilidad dimensional, tiempo de fraguado lento para garantizar un tiempo de trabajo suficiente, insolubilidad en fluidos tisulares, adhesión adecuada con paredes del conducto y biocompatibilidad (Grossman, 1958).

La capacidad de sellado de los materiales de obturación radicular es importante para el éxito en el tratamiento de conducto. El material de obturación debe favorecer la reparación de los tejidos periapicales dañados, sin embargo, existe con frecuencia la filtración y extrusión de cemento hacia tejidos perirradiculares desencadenando una respuesta inmune en el organismo (Gomes-Filho *et al.*, 2012). Aunque no exista extrusión de los materiales en sí, los eluidos de los cementos selladores endodónticos tienen la capacidad de generar una lesión en los tejidos perirradiculares y retrasar el proceso de reparación (Schäfer *et al.*, 2007).

La respuesta inmune está regulada por una red de control y señalización altamente compleja. Entre estos componentes reguladores destacan las citocinas antiinflamatorias e inhibidores específicos de citocinas. En condiciones fisiológicas, estos inhibidores de citocinas sirven como elementos inmunomoduladores que limitan los efectos potencialmente nocivos de inflamación crónica exacerbada (Munoz *et al.*, 1991). Por otro lado, en condiciones patológicas estos mediadores antiinflamatorios pueden proporcionar un control insuficiente sobre las actividades proinflamatorias en enfermedades inmunoreguladas sobre compensando o inhibiendo la respuesta inmune del huésped (Kasai *et al.*, 1997).

Dentro de las diversas citocinas que actúan en la respuesta inmune se encuentra la interleucina 6 (IL-6), considerada un mediador soluble con un efecto pleiotrópico sobre la inflamación, respuesta inmune y hematopoyesis (Barton 1997). Los macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales son algunas de las células encargadas de la síntesis de IL-6 (Matsuki *et al.*, 1992) en respuesta a estímulos como infección, trauma y a cuerpos extraños (Kishimoto *et al.*, 1995).

Existen diferentes tipos de pruebas a través de los cuales se puede realizar la cuantificación de diversas moléculas siendo el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) uno de los más usados. Este ensayo utiliza el concepto básico de inmunología de un antígeno que se une a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos como proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos en una muestra de fluido (Gan *et al.*, 2013).

II. Antecedentes

Existen estudios a través de los cuales se han evaluado las propiedades que poseen los cementos selladores endodónticos a nivel celular. Jung *et al.* (2018) evaluó la biocompatibilidad a través de la viabilidad celular que presentaban células del ligamento periodontal posterior a su estimulación con eluidos de cementos selladores; dos cementos selladores a base de silicato de calcio (MTA-Fillapex y BioRoot-RCS) *versus* selladores comúnmente usados (AH-Plus, a base de resina epóxica y Pulp-Canal-Sealer, a base de Óxido de Zinc y Eugenol). Informaron que BioRoot-RCS presentó regeneración de las células del ligamento periodontal y su nivel más bajo de toxicidad fue al estar recién mezclado. MTA-Fillapex y el Pulp-Canal-Sealer presentaron citotoxicidad recién mezclados, así como en un estado posterior (24 horas, 7 y 21 días), mientras que AH-Plus era citotóxico en un estado recién mezclado, pero no una vez que fraguaba. A diferencia de los demás cementos selladores BioRoot-RCS demostró no solo ser un cemento biocompatible debido a su viabilidad celular, sino que indujo actividad proliferativa de las células ligamento periodontal a diferencia del cemento sellador Pulp Canal Sealer el cual presento mayor toxicidad en menor tiempo sugiriendo necrosis celular.

Chang *et al.* (2014) evaluaron la respuesta inflamatoria y capacidad osteogénica de 4 cementos selladores con diferentes composiciones químicas; a base de Hidróxido de Calcio (Sealapex), sellador a base de resina epóxica (ARS) y biocerámicos (MTA-Fillapex, iRoot SP). Utilizaron eluidos de estos cementos para estimular células del ligamento periodontal de humanos en intervalos de tiempo de 3, 7 y 14 días. Los resultados fueron evaluados a través de ELISA y MTT. Concluyeron que el cemento sellador MTA Fillapex e iRoot SP inducían menores concentración de mediadores inflamatorios y mejoraban significativamente la diferenciación osteoblástica de células del ligamento periodontal en comparación con el cemento sellador Sealapex.

Dimitrova-Nakov *et al.* (2015) en su estudio *in vitro* a través de la estimulación de células del ligamento periodontal humano con cementos selladores biocerámicos

demonstraron que se daba la producción de factores de crecimiento angiogénico y osteogénico. Por otro lado, también demostraron menor citotoxicidad que los cementos selladores convencionales y una mejor actividad antimicrobiana (Camps *et al.* 2015; Arias-Moliz y Camilleri, 2016).

Alsubait *et al.* (2018) evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores biocerámicos (EndoSequence BC y BioRoot RCS) *versus* un cemento sellador a base de resina epóxica (AH-Plus). Se utilizaron eluidos de estos cementos selladores para estimular células mesenquimales de médula ósea humana durante 1,3 y 7 días. Informaron que en todas las concentraciones de eluidos y días que se llevó a cabo el estudio el cemento sellador AH-Plus presentó mayor citotoxicidad debido a la reducción de número de células presentes sugiriendo necrosis, en comparación con los cementos selladores EndoSequence BC y BioRoot RCS los cuales no mostraron diferencias entre ellos en cuanto a viabilidad ni proliferación celular.

En 2018 se llevó a cabo otro estudio que demostró la citotoxicidad de cuatro cementos selladores endodónticos con diferentes composiciones químicas estimulando osteoblastos humanos. Se elaboraron eluidos de los cementos selladores Pulp Canal Sealer (Oxido de zinc y eugenol), AH-Plus (resina epóxica), BioRoot RCS y MTA-Fillapex (biocerámicos) recién mezclados y una vez completamente fraguados. Las células fueron estimuladas durante 24 horas, 7, 14 y 21 días con los eluidos. Concluyeron que el cemento sellador AH-Plus era citotóxico en un estado recién mezclado, pero no una vez que fraguaba completamente. Los cementos selladores MTA-Fillapex y Pulp-Canal-Sealer presentaron igual toxicidad recién mezclados, así como una vez completamente fraguados y el cemento sellador BioRoot-RCS mostró la toxicidad más baja en ambos estados; siendo el único que en el cual se observó regeneración celular (Jung *et al.* 2018).

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Cementos Selladores

Grossman en 1958, enumeró por primera vez las propiedades ideales que un cemento sellador endodóntico debería poseer. Entre estas propiedades se destacaron la estabilidad dimensional al fraguado, ser bactericida o bacteriostático, la resistencia cohesiva para mantener unida la obturación, no pigmentar la superficie dentaria, sellado hermético tridimensional, no dañar o irritar los tejidos perirradiculares, poseer partículas muy finas para que puedan mezclarse fácilmente y ser fácil de introducir al conducto radicular.

Cementos a base de óxido de zinc y eugenol

Los cementos selladores a base de óxido de zinc-eugenol han sido utilizados con éxito durante mucho tiempo. Estos cementos selladores han sido reconocidos por haber experimentado reabsorción en extrusión a los tejidos perirradiculares (Augsburger y Peters, 1990). Tienen un tiempo de fraguado largo, sin embargo, se contraen al fraguar, con la consecuencia de teñir la estructura dental y tienen como principal ventaja su actividad antimicrobiana (Al-Khatib *et al.*, 1990).

Rickert y Dixon en 1933, introdujeron uno de los primeros cementos selladores a base de óxido de Zinc-eugenol. El polvo contiene óxido de zinc adicionado de pequeñas cantidades de resina blanca que reducían la fragilidad del cemento y acetato de zinc como reactor y promotor de mayor resistencia para de la reacción de endurecimiento. El vehículo de la mezcla para estos materiales es el eugenol extraído de aceite de clavo, el cual proporcionaba el efecto antimicrobiano

Pulp Canal Sealer es un cemento sellador compuesto por Óxido de zinc (sin arsénico) 34%, plata precipitada 25%, Oleorresinas 30% y Yoduro de timol 11%, aceite de clavo de olor, 78% y Bálsamo de Canadá 22% (Biven *et al.*, 2015).

Una de las principales desventajas que poseen este tipo de cementos es su grado de toxicidad cuando se encuentran en contacto con tejidos vitales (Ørstavik, 2005).

Cementos selladores a base de Resina epóxica

Los cementos selladores a base de resina epóxica fueron introducidos en la práctica endodóntica por sus características favorables, como la adhesión a la estructura dentaria, adecuado tiempo de trabajo, facilidad de manipulación y buen sellado (Carvalho-Junior *et al.* 2007; Borges *et al.* 2012; Franceschini *et al.* 2016).

AH Plus es un cemento sellador a base de resina epóxica caracterizado por sus excelentes propiedades mecánicas, alta radiopacidad, poca contracción a la polimerización, baja solubilidad y, no menos importante, un alto grado de estabilidad durante el almacenamiento (Tyagi *et al.*, 2013). A pesar de la toxicidad y mutagenicidad que ha sido documentada en los cementos selladores a base de resina epóxica en especial de AH-Plus (Azar, 2000), se ha revelado un potencial de citotoxicidad más bajo en comparación con AH26 aunque ambos selladores causen un aumento en la genotoxicidad dependiente de la dosis (Huang *et al.*, 2002).

Leonardo *et al.* (2000) informaron que el cemento a base de resina epóxica AH-Plus era capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de diversas colonias bacterianas, tales como *Estafilococo áureo*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* o *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, se ha descrito que los materiales endodónticos que presentan una fuerte actividad antimicrobiana, frecuentemente son mutagénicos, sobre todo aquéllos que liberan formaldehído (Geurtsen y Leyhausen, 1997; Leonardo *et al.*, 1999).

Al-Hiyasat *et al.*, (2010) demostraron en un estudio *in vitro*, estimulando fibroblastos humanos con eluídos de cementos selladores a base de resinas epóxicas que todos los cementos incluidos en el estudio afectaban la viabilidad

celular e informaron cemento sellador a base de resina epóxica AH Plus era el menos citotóxico en comparación a los demás.

Cementos selladores biocerámicos

En la actualidad los cementos selladores más recientes son los cementos biocerámicos. Éstos contienen alúmina, zirconio, vidrio bioactivo, vidrios cerámicos, hidroxiapatita y fosfatos de calcio reabsorbibles (Brave *et al.*, 2012). Dentro de sus características más sobresalientes demostradas esta su capacidad de producir hidroxiapatita durante su proceso de fraguado, generando un enlace químico entre la dentina y el material de obturación además de un pH alcalino durante las primeras 24 horas de fraguado con elevada actividad antibacteriana (Ciasca *et al.*, 2012). Malhotra *et al.* (2014) informó que estos cementos selladores eran estables en ambientes biológicos y no sufrían contracción de fraguado; todo lo contrario, poseían una expansión de 0.002 mm y no se reabsorben. Existen estudios que mencionan que los biocerámicos no producirían una respuesta inflamatoria significativa en caso de que ocurriera una extrusión durante la obturación (Russell, 2009).

El desarrollo de nuevos tipos de selladores endodónticos que contienen Silicato de Calcio se basa en la búsqueda de selladores con buena biocompatibilidad que inducen la formación de tejido mineralizado y propiedades físicas, tasa de flujo, capacidad de sellado, manipulación y fraguado más rápido (Morgental *et al.*, 2011; Salles *et al.*, 2012).

El MTA Fillapex es un cemento sellador endodóntico a base de silicato tricálcico que combina las ventajas probadas del mineral trióxido agregado (MTA) con un material de obturación intraconducto (Viapiana *et al.*, 2014). Tiene fluidez adecuada, buen sellado y baja solubilidad, además de rápida reparación de tejidos sin causar reacción inflamatoria, alta radiopacidad, liberación de iones calcio y resulta fácil de remover en caso de retratamiento endodóntico (Gandolfi *et al.*, 2016). Este cemento sellador contiene partículas de silicato tricálcico (MTA), dióxido de

silicón, óxido de bismuto (Flores *et al.*, 2011), resina de salicilato, resina diluyente, resina natural, trióxido de bismuto, sílice nanoparticulada y pigmentos (Braga *et al.*, 2014).

Otro cemento sellador biocerámico es el cemento sellador BioRoot RCS. Su composición consta de polvo a base de silicato tricálcico, povidona y óxido de zirconio y el líquido es una solución acuosa de cloruro de calcio y policarboxilato (Siboni, 2017). Su uso ha sido recomendado para la técnica de cono único, o condensación lateral en frío (Prüllage *et al.*, 2016). Existen reportes de estudios *in vitro* con el cemento sellador BioRoot RCS en los cuales se demuestra la producción de factores de crecimiento angiogénicos y osteogénicos en células del ligamento periodontal humano, además, tiene menor citotoxicidad que los selladores convencionales y que cuenta con la capacidad de producir depósito de tejido duro además de su alta actividad antimicrobiana gracias a su liberación de iones de calcio (Collado-González *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2016; Dimitrova-Nakov *et al.*, 2015).

Respuesta inmune: citocinas

Toda respuesta inmune del huésped implica el reclutamiento de citocinas y quimiocinas (Stashenko y Yu, 1987). Entre las citocinas, aquellas que promueven la cascada de inflamación se consideran mediadores proinflamatorios como lo son la interleucina uno beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las quimiocinas, las familias de interferón, etc. Las citocinas antiinflamatorias como interleucina uno (IL-1), interleucina 4 (IL-4), IL-6, IL-10, interleucina 11 (IL-11) e interleucina 13 (IL-13) son producidas para regular el proceso de respuestas expresadas por citocinas proinflamatorias (Dinarello, 2000).

Las citocinas son transmisores de comunicación célula-célula en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Estos mediadores multifuncionales modulan muchos procesos biológicos esenciales. Son péptidos sintetizados por una gran variedad de tipos de células y son capaces de regular las reacciones hematopoyéticas, la inflamación, y principalmente el crecimiento y la diferenciación

celular, que actúan generalmente de una manera paracrina o autocrina (Junming, 1987). La liberación de citocinas puede ser desencadenada de forma directa mediante contacto antigénico o indirecta mediante moléculas de señalización expresadas por células inmunes antígeno-reactivas (Elias *et al.*, 1992; Dongari-Bagtzoglou y Ebersole, 1996) que actúan regulando las células endoteliales y las moléculas de adhesión leucocitarias, hecho imprescindible para que los leucocitos abandonen los vasos sanguíneos y se infiltren en los tejidos circundantes (Okada y Murakami, 1998; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002).

IL-6 y su rol en la periodontitis apical

La etiología y patogenia de la periodontitis apical genera cambios histológicos en el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento (Cohen, 2011). La periodontitis apical es una enfermedad inflamatoria de origen endodóntico (Ørstavik y Ford, 2008), su persistencia da lugar a la progresión de lesiones crónicas destruyendo estructuras óseas como consecuencia de la incapacidad de los mecanismos de defensa del huésped para erradicar la infección (Gazivoda *et al.*, 2009).

La primera detección de IL-6 en lesiones periapicales humanas se realizó en un estudio donde las concentraciones de IL-6 fueron examinados a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en pulpas humanas sanas, pulpas inflamadas y lesiones periapicales de origen endodóntico. Este estudio constato que los concentraciones de IL-6 eran significativamente mayores en lesiones periapicales y tejido pulpar inflamado en comparación con el tejido pulpar sano (Barkhordar *et al.*, 1999). Las lesiones periapicales sintomáticas poseen concentraciones más altas de IL-6 que las lesiones asintomáticas debido a su mayor contenido de células polimorfonucleares y lesiones epitelizadas (Radics *et al.*, 2003).

Las lesiones sintomáticas representan una etapa inmunológicamente activa de la enfermedad, se produce un aumento en el número de osteoclastos derivados

de macrófagos de granulocitos, formadores de colonias que generan resorciones óseas (Balto *et al.*, 2001; Huang *et al.* 2001), de igual manera se ha demostrado que dicha interleucina interfiere con la apoptosis en neutrófilos (Kawashima y Stashenko 1999); a diferencia de las lesiones asintomáticas que parecen ser el punto a partir del cual el proceso avanza hacia la reparación (Brekalo Pršo *et al.*, 2007). Se ha concluido que con lesiones periapicales crónicas IL-6 puede servir como marcador de actividades inflamatorias patológicas (Abdolsamadi *et al.*, 2008), como mediador inespecífico en el mantenimiento del hueso en proceso de reabsorción, en la activación y proliferación de linfocitos T, así como a la diferenciación de linfocitos B (De Sá *et al.*, 2007).

Ensayo de ELISA

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, utiliza un sistema enzimático para mostrar la combinación de un antígeno con su anticuerpo. Es un método para cuantificar un antígeno inmovilizado sobre una superficie sólida. ELISA usa un anticuerpo específico con una enzima acoplada covalentemente. La cantidad de anticuerpo que se une al antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno presente, que se determina midiendo espectrofotométricamente la conversión de una sustancia clara en un producto coloreado por la enzima acoplada (Gan *et al.*, 2013). Es una técnica de ensayo basada en placa que se utiliza para detectar y cuantificar sustancias como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. Una enzima conjugada con un anticuerpo reacciona con sustrato incoloro para generar un producto coloreado. Tal sustrato se llama cromogénico sustrato (Perlmann *et al.*, 1971).

IV. HIPÓTESIS

IV.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cemento endodóntico MTA-Fillapex estimula una menor producción de IL-6 en células mononucleares humanas *in vitro* en comparación con la producción que estimulan los cementos selladores Pulp Canal Sealer, BioRoot, AH Plus.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál de los cuatro cementos selladores endodónticos; BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer o AH Plus estimula la menor producción de IL-6 en células mononucleares humanas *in vitro*.

V.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Cuantificar la concentración de IL-6 posterior a la estimulación de células mononucleares humanas con eluidos de cemento sellador BioRoot RCS.
- Cuantificar la concentración de IL-6 posterior a la estimulación de células mononucleares humanas con eluidos de cemento sellador MTA Fillapex.
- Cuantificar la concentración de IL-6 posterior a la estimulación de células mononucleares humanas con eluidos de cemento sellador Pulp Canal Sealer.
- Cuantificar la concentración de IL-6 posterior a la estimulación de células mononucleares humanas con eluidos de cemento sellador AH Plus.
- Comparar los valores de concentración de IL-6 producida por las células mononucleares humanas estimuladas con eluidos de cementos selladores BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer y AH Plus.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 DISEÑO

Experimental *in vitro*

VI.2 POBLACIÓN

Cultivo de células mononucleares humanas expuestas a eluidos de cementos selladores AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemania), Pulp Cabal Sealer (Kerr, Scafati, Italia), MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brasil), y BioRoot RCS (Septodont, St. Maur-des-Fosses, Francia).

VI.3 TAMAÑO DE MUESTRA

48 pozos de placas de cultivo de 24 pozos con 500,000 células cada uno. Cada placa de 24 pozos con células mononucleares humanas procedentes de un individuo sano (dos individuos para los 48 pozos). Divididos de acuerdo al cemento sellador y a los grupos control, así como también de acuerdo a las horas de exposición al eluido de cada cemento.

VI.3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión del paciente donador de monocitos

Clínicamente sano, sin tratamiento de antiinflamatorios tanto AINES o esteroideos.

Criterios de Exclusión del paciente donador de monocitos

Personas que estén bajo tratamiento antimicrobiano, analgésico y antiinflamatorio.

Criterios de Eliminación del paciente donador de monocitos

Personas que decidan retirar su muestras e información biológica obtenida del experimento.

Criterios de Inclusión de los cultivos celulares

Cultivos celulares que cumplan con viabilidad celular

Criterios de Exclusión de los cultivos celulares

Cultivos que no cumplan con criterios de calidad

Criterios de Eliminación de los cultivos celulares

Todas las muestras que durante el procesamiento sufrieron algún daño, contaminadas y/o mal etiquetadas

VI.3.2 VARIABLES ESTUDIADAS

Independiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Eluido Cemento Sellador BioRoot	Medio de cultivo que ha sido expuesto al cemento sellador y ha absorbido compuestos químicos que son liberados después del fraguado.	Mezcla del cemento sellador según fabricante. Elaboración de Eluidos	Cuantitativa	Continua	μ l
Eluido Cemento Sellador MTA Fillapex	Medio de cultivo que ha sido expuesto al cemento sellador y ha absorbido compuestos químicos que son liberados después del fraguado.	Mezcla del cemento sellador según fabricante. Elaboración de Eluidos	Cuantitativa	Continua	μ l

Eluido Cemento Sellador Pulp Canal Sealer	Medio de cultivo que ha sido expuesto al cemento sellador y ha absorbido compuestos químicos que son liberados después del fraguado.	Mezcla del cemento sellador según fabricante. Elaboración de Eluidos	Cuantitativa	Continua	μl
Eluido Cemento Sellador AH Plus	Medio de cultivo que ha sido expuesto al cemento sellador y ha absorbido compuestos químicos que son liberados después del fraguado.	Mezcla del cemento sellador según fabricante. Elaboración de Eluidos	Cuantitativa	Continua	μl

Dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Concentración IL-6	Cantidad de citocina secretada por células mononucleares humanas en cultivo y cuantificada.	Cuantificación de IL-6 por medio de Kit ELISA ABTS Catalog #900-M16	Cuantitativa	Continua de Razón	Pg/ml

VI.5 PROCEDIMIENTO

La fase experimental del estudio se dividió en cinco fases:

Fase I: Obtención de células mononucleares humanas a partir de sangre venosa periférica de un sujeto sano.

Fase II: Preparación de Eluidos Cementos Selladores.

Fase III: Estimulación de las células con los eluidos.

Fase IV: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Fase V: Análisis de los resultados.

Fase I:

Toma de sangre por punción venosa.

Se obtuvieron 25ml de sangre periférica de un individuo para cada uno de los ensayos, participando en total dos individuos a través de la siguiente técnica:

- 1- Se colocó el brazo izquierdo del individuo sobre la mesa de trabajo mientras este se encontraba sentado. Se palpó la vena para identificar la zona de posible punción y se procedió a colocar un torniquete.
- 2- Se desinfectó la zona, y se procedió a realizar la punción ingresando la aguja paralelamente al curso de la vena elegida con el bisel de la aguja hacia arriba.
- 3- Inmediatamente después de haber punccionado la vena y empezara a salir sangre se introdujeron uno a uno 5 tubos vacutainer de 5 ml cada uno con anticoagulante y los cuales fueron etiquetados adecuadamente.
- 4- Durante la toma del último tubo, se retiró el torniquete y se colocó un algodón sobre la zona de punción. Se desechó tanto la aguja como el algodón en los contenedores adecuados, y se pidió al sujeto que presionara el algodón durante unos min.

Aislamiento de Células Mononucleares Humanas por gradiente de Ficoll.

Una vez recolectados los tubos con sangre se llevó a cabo siguiente protocolo dentro del laboratorio:

- 1.- Con una pipeta serológica se colocaron 3 mL de Ficoll-1077 en un tubo cónico de 15 mL.
2. Se mezcló gentilmente la muestra de sangre entera contenida en el vacutainer hasta homogeneizarla.
3. Se retiró la tapa del vacutainer y con una pipeta serológica de 10 mL se dispensaron 5 mL de sangre entera anticoagulada hacia un tubo cónico de 15 mL previamente cargado con 5 mL de PBS, pH 7.4 estéril.
4. Se homogeneizó gentilmente por inversión la mezcla de sangre y PBS.
5. Utilizando la misma pipeta serológica de 10 mL se tomaron 10 mL de la mezcla de sangre entera y PBS y se colocó cuidadosamente sobre la superficie del Ficoll-1077 sin perturbar la interfase escurriendo la mezcla lentamente por la pared del tubo inclinado. Al terminar este paso el tubo cónico presentó dos estratos, uno inferior con Ficoll-1077 y uno superior con la mezcla de sangre y PBS.
6. Los tubos con dos estratos fueron colocados en la centrifuga durante 20 min. a 1,500 RPM. Se retiraron de la centrifuga con cuidado de no perturbar los estratos que se han formado. En este momento existían cuatro estratos diferentes: el primero, de abajo hacia arriba, contenía eritrocitos y granulocitos, el inmediatamente superior contenía Ficoll-1077, el inmediatamente superior al Ficoll es el estrato más discreto y contenía tanto a las células mononucleares humanas como a las plaquetas y, por último, el estrato superior que contenía el plasma.
- 7.- Empleando una micropipeta de hasta 1000 μ l se transfirió el estrato correspondiente a las células mononucleares humanas a un tubo de cultivo de fondo redondo de 12 mL. Se aforaron los tubos de cultivo de fondo redondo a 10 mL con PBS, pH 7.4 y se homogeneizaron gentilmente por inversión.

8.- Se colocaron los tubos de cultivo de fondo redondo en la centrifuga y se centrifugaron a 760 RPM, 10 min.

9.- Se retiraron tus tubos de la centrifuga y se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.5%.

10.- Se resuspendieron las células mononucleares humanas en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. Se aforó el tubo a 10 mL con PBS, pH 7.4 nuevamente y se homogeneizó gentilmente por inversión.

11.- Se colocaron nuevamente los tubos de cultivo de fondo redondo en la centrifuga y se centrifugaron a 760 RPM por 10 min.

12. Se retiraron de la centrífuga y se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5%.

13. Se resuspendieron las células mononucleares humanas en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. Y se agregó a cada tubo con células mononucleares humanas 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y se resuspendieron a las células mononucleares humanas con golpeteo digital.

14.- Se procedió a realizar el conteo celular e identificación de viabilidad celular, para lo que la suspensión de células mononucleares humanas fue mezclada con una solución al 0.4% de azul tripán antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de un hemocitómetro de Neubauer.

Fase II:

Preparación de Eluidos Cementos Selladores.

Se utilizaron los siguientes selladores: AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemania), Pulp Cabal Sealer (Kerr, Scafati, Italia), MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brasil), y BioRoot RCS (Septodont, St. Maur-des-Fosses, Francia).

1.- Todos los selladores se mezclaron según la instrucción de los fabricantes y fueron aplicados en 4 moldes de silicona cada uno (diámetro 4 mm, altura 1.5 mm). Para garantizar el fraguado completo de todos los cementos selladores, las muestras se sumergieron en solución fisiológica (solución salina equilibrada de Hank) a 37 °C. durante 48 horas.

2.- Después del fraguado, los materiales fueron pesados tres veces y se registró el peso promedio. Los pesos promedio fueron: AH Plus 47.6 mg, MTA-Fillapex 31.6 mg, Pulp Canal Sealer 49.4 mg y para BioRoot RCS 37.3 mg. Cada "pastilla" de material sin el molde de silicona fue colocada en una placa de 48 pozos y se le agregó 1ml de medio de cultivo RPMI sin suplementos ni antibióticos.

3.- La placa de cultivo con todos los cementos fue incubado a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.

4.- Una vez concluido el tiempo, se recuperó el medio de cultivo (eluído) utilizando una micropipeta. Esta solución fue filtrada y centrifugada a 10,000 RPM durante 5 min y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso.

Fase III:

Estimulación de las células con los eluídos

1.- Se realizaron dos ensayos de estimulación por separado (dos individuos donadores), y cada uno por duplicado en cajas de cultivo de 24 pozos.

2.- En cada pozo se sembraron 500,000 células inmediatamente después de haber sido aisladas junto con 960 µl de medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomina y 40 µl de cada uno de los eluídos o 40 µl de LPS para el caso de los controles.

3.- La placa fue colocada en incubación a 37°C con 5% de CO₂ y se extrajo de la incubadora al cumplir 3 horas. El sobrenadante correspondiente a 3 horas de exposición fue recuperado utilizando una micropipeta y colocado en microtubos

previamente rotulados. Todos los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

4.- Concluidas 6, 12 y 24 horas de exposición se recuperaron los sobrenadantes de los pozos restantes y todos fueron almacenados.

Fase IV:

Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se utilizó el Kit comercial ELISA ABTS developmet kit (Peprotech, EU) para cuantificación de IL-6 y su correspondiente kit de soluciones amortiguadoras siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante:

1.- Se diluyó el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de $1.0\ \mu\text{g/ml}$. Inmediatamente se agregaron $100\ \mu\text{l}$ a cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos proporcionada en el mismo kit. Se selló la placa y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

2. Al día siguiente, se aspiró cada uno de los pozos para remover el líquido y se lavó cada uno cuatro veces utilizando $300\ \mu\text{l}$ de solución de lavado en cada ocasión.

3.- Se diluyó la solución estándar desde 1ng/ml a cero utilizando solución diluyente e inmediatamente se agregaron $100\ \mu\text{l}$ de la solución estándar de cada una de las muestras en un pozo previamente identificado.

4.- Se incubó a temperatura ambiente por al menos 2 horas.

5.- Se aspiró y lavó la placa cuatro veces y se diluyó el anticuerpo en diluyente a una concentración de $0.50\ \mu\text{g/ml}$.

6.- Se agregaron $100\ \mu\text{l}$ por pozo y se incubaron a temperatura ambiente por al menos 2 horas.

7.- Se aspiró y lavó cada pozo cuatro veces y se diluyó la alícuota de $5.5\ \mu\text{l}$ de Avidin Peroxidasa en una proporción 1:2000 en diluyente para obtener un volumen total de 11ml y se agregaron $100\ \mu\text{l}$ a cada pozo.

8.- Se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y se aspiró y lavo cada pozo cuatro veces.

9.- Se agregaron 100 μ l de solución de ABTS a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente hasta observar cambio de color.

10.- El cambio de color se monitoreó constantemente y se llevó a un lector de placas programado a 405 nm de longitud de onda.

11.- Se realizaron lecturas cada 5 min durante 30 min, los valores de densidad óptica fueron almacenados en una hoja de Excel para su posterior análisis.

Fase V:

Análisis de los resultados.

Se realizó la importación de valores de absorbancia a una base de datos de Excel, en donde se analizaron los datos y se calcularon medias, desviaciones estándar y se obtuvieron rangos, además de realizar graficas.

VI.5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de los eluidos y del tiempo de exposición sobre la producción de la IL-6, fue determinado a través del análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos vías) con el análisis Post hoc de Tukey. Esto corresponde a un modelo factorial completo (se realizaron todas las posibles combinaciones entre valores y variables) y completamente al azar (los grupos se formaron mediante asignación completamente aleatoria). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Grap Pad Prism y se consideró significancia estadística cuando p fue ≤ 0.05

VI.5.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se obtuvo el consentimiento informado de los sujetos sanos que donaron 25ml de sangre periférica venosa. La extracción de esta sangre se realizó siguiendo estrictos estándares de calidad, asepsia y antisepsia que garantizaron la seguridad del mismo. La información personal del paciente está protegida y se respeta la privacidad de la misma. Todos los desechos biológicos e infecto-contagiosos derivados de esta investigación se desecharon en contenedores adecuados para ese fin.

VII. RESULTADOS

En la figura 1 se representa la comparación de la concentración de IL-6 cuantificada por medio del análisis de las placas del ELISA en los sobrenadantes de las células mononucleares humanas estimuladas con los eluidos de los diferentes cementos selladores en los cuatro distintos tiempos experimentales.

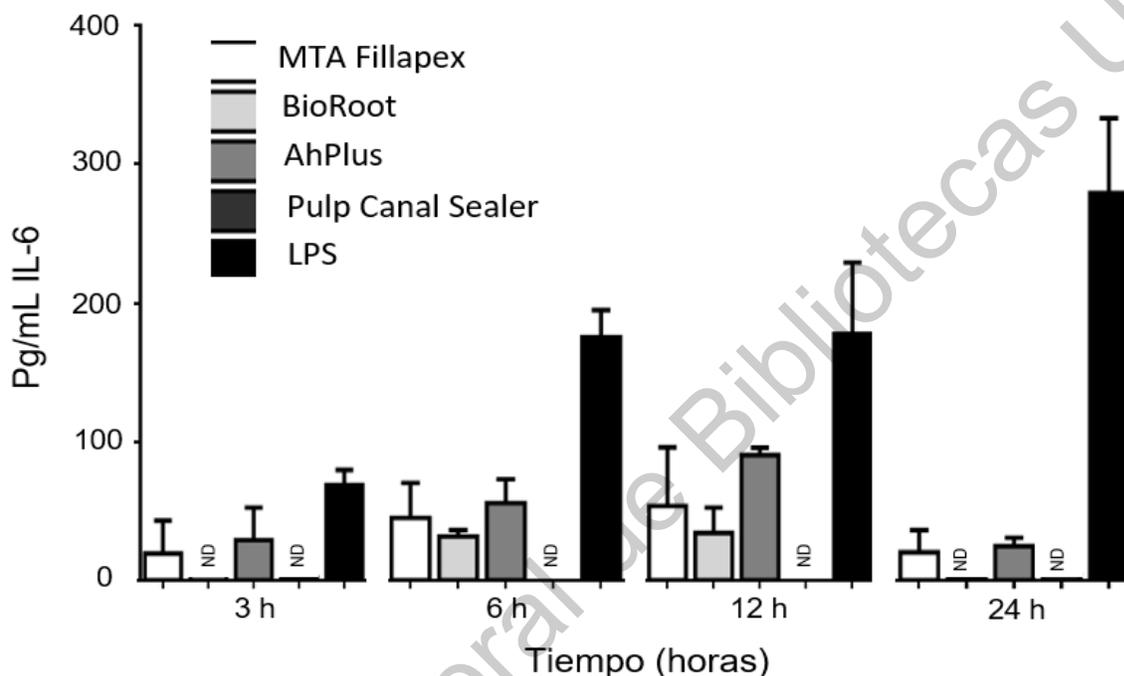


Figura 1. Comparación de la concentración de IL-6 producida por las CMN tras la estimulación con eluidos de los 4 cementos selladores en los 4 tiempos experimentales. ND: No detectable, $n=2$, $p<0.05$

En la tabla 1 se muestra la comparación entre los eluidos de los cementos selladores utilizados para la estimulación de las células mononucleares humanas que mostraron significancia estadística ($p<0.05$). Se puede observar que a las 3 y 24 horas no existieron diferencias al compararlos entre sí ($p>0.05$).

En el grupo de 6 horas de exposición, el eluido del cemento sellador AH Plus estimuló la mayor producción de IL-6, mientras que el de Pulp Canal Sealer la menor (por debajo del rango detectable del ensayo), existiendo diferencias entre ellos ($p<0.05$).

A las 12 horas de estimulación el eluido del cemento sellador Pulp Canal Sealer continuó por debajo del rango de detección, y junto con el BioRoot fueron los que

menos producción de IL-6 estimularon, mientras que al AH Plus y el MTA Fillapex fueron los que más lo hicieron, existiendo diferencias entre ellos ($p<0.05$).

En casi todos los casos, el Control Positivo (LPS) estimuló una mayor producción de IL-6 comparado con la concentración obtenida por todos los cementos selladores estudiados ($p<0.05$).

Tabla 1. Diferencias significativas ($p<0.05$) en la comparación entre eluidos de los selladores endodónticos y entre eluidos y el control positivo en cada tiempo experimental.

Comparación entre cementos selladores	3 h	6 h	12 h	24 h
MTA Fillapex Vs. BioRoot	-	-	-	-
MTA Fillapex Vs. AH Plus	-	-	-	-
MTA Fillapex Vs. Pulp CS	-	-	*	-
BioRoot Vs. AH Plus	-	-	*	-
BioRoot Vs. Pulp CS	-	-	-	-
AH Plus Vs. Pulp CS	-	*	*	-
Comparación entre cementos selladores y control (LPS)				
MTA Fillapex Vs. LPS	-	*	*	*
BioRoot Vs. LPS	*	*	*	*
AH Plus Vs. LPS	-	*	*	*
Pulp CS Vs. LPS	*	*	*	*

*Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$)

Al analizar el efecto del tiempo sobre la producción de IL-6 al estimular con cada cemento sellador (tabla 2), se pudo observar que para el MTA Fillapex, el BioRoot y el Pulp Canal Sealer no existen diferencias de producción en ningún tiempo experimental ($p>0.05$), mientras que para el AH Plus se observó un incremento a las 12 horas y disminución a las 24 horas ($p<0.05$).

Por otro lado, en la estimulación realizada con el control positivo si se observó un aumento gradual a través del tiempo ($p<0.05$).

Tabla 2. Diferencias significativas en la comparación entre los distintos tiempos experimentales para cada sellador endodóntico y el control positivo.

	MTA Fillapex	BioRoot	AH Plus	Pulp Canal Sealer	Control (LPS)
3 h vs. 6 h	-	-	-	-	*
3 h vs. 12 h	-	-	*	-	*
3 h vs. 24 h	-	-	-	-	*
6 h vs. 12 h	-	-	-	-	-
6 h vs. 24 h	-	-	-	-	*
12 h vs. 24 h	-	-	*	-	*

*Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$)

VIII. DISCUSIÓN

Los cementos selladores endodónticos son utilizados en la obturación del sistema de conductos radiculares (Williamson *et al.*, 2005). De manera inadvertida estos materiales o sus eluidos pueden llegar a estar en contacto con los tejidos perirradiculares (Covo-Morales *et al.*, 2016). Estudios con menores tasas de éxito por sobre obturaciones han sido reportados sugiriendo que esto podría estar asociado a la citotoxicidad de los cementos selladores endodónticos, la reacción a un cuerpo extraño, su solubilidad en fluidos tisulares y su susceptibilidad a fagocitosis (Ricucci y Loghin, 2016).

La citotoxicidad de los cementos selladores endodónticos ha sido ampliamente evaluada a través de diferentes modelos de estudios (Camargo *et al.* 2014; Zhang, Li, and Peng 2010; Alsubait *et al.* 2018) demostrando su mayor grado de toxicidad cuando se encuentran recién mezclados, a diferencia del presente estudio en el cual se dejaron fraguar completamente los cementos selladores.

Estudios previos (Jung *et al.* 2018 y 2019; Alsubait *et al.*, 2018) evaluaron la citotoxicidad de cementos selladores AH plus, Pulp canal sealer, BioRoot RCS y MTA Fillapex estimulando diferentes tipos celulares. En estos modelos de estudio se contemplaron dos variables importantes de los cementos selladores. Se estimularon las células con eluidos de cementos selladores recién mezclados y una vez completamente fraguados. Demostraron que los eluidos de los cementos selladores recién mezclados eran más citotóxicos que los eluidos de los cementos selladores completamente fraguados, los cuales con el paso del tiempo en el que se evaluaron disminuían su citotoxicidad. En el presente estudios se utilizaron eluidos de cementos selladores completamente fraguados para poder simular cuando un cemento sellador extruido permanece en el organismo. Los resultados obtenidos fueron consistentes con estudios previos en los cuales la citotoxicidad era menor con el paso del tiempo y en este caso la producción de interleucinas disminuyó gradualmente con el tiempo.

Diferentes tipos de células en estudios *in vitro* han sido utilizados para estudiar la biocompatibilidad de materiales dentales. Los cementos selladores a base de óxido de zinc y eugenol han presentado altos índices de citotoxicidad cuando se encuentran en contacto con tejidos vitales (Ørstavik, 2005). En el presente estudio en los períodos de prueba experimental de 6 y 12 h el cemento sellador Pulp Canal sealer no estimuló producción de IL-6 en las células lo cual podría sugerir que los niveles de toxicidad de este cemento pudieran haber inducido a una necrosis celular, siendo estos resultados consecuentes con el estudio de Brackett en cual demuestra que el cemento sellador Pulp Canal Sealer suprimió significativamente la actividad mitocondrial de los monocitos, incluso después de 12 h (Brackett *et al.*, 2009).

Estudios en células mesenquimales (Alsubait *et al.*, 2018), osteoblastos (Jung *et al.*, 2018) y células de ligamento periodontal (Jung *et al.*, 2018) estimuladas con elúidos de cemento sellador AH Plus confirman que este cemento sellador fue altamente citotóxico coincidiendo con los resultados presentados en este estudio en cual se demostró que fue el cemento sellador que producía mayor cantidad de IL-6 en los diferentes intervalos de tiempo.

Los cementos selladores BioRoot y MTA Fillapex han demostrado ser más biocompatibles y menos citotóxicos en comparación a otros cementos selladores (Garc, 2017; Eldeniz *et al.* 2016; Jung *et al.* 2018). Vouzara (2018) demostró que el cemento sellador MTA Fillapex era menos citotóxico que otros cementos selladores a base de resina pero más citotóxico que otros selladores a base de silicato tricálcico (Vouzara *et al.*, 2018); estos hallazgos parecen ser consecuentes con resultados de este estudio en el cual el cemento sellador MTA fillapex produjo mayor producción de IL-6 que el cemento sellador BioRoot en todos los intervalos de tiempo de prueba a pesar de no haber diferencia entre ellos.

Estudios previos asocian el exceso de iones de calcio con la necrosis y apoptosis celular (Zhivotovsky y Orrenius 2011). Dentro de las propiedades más destacadas del cemento sellador BioRoot se encuentra su capacidad de inducir factores de crecimiento angiogénicos y osteogénicos relacionada a su liberación

gradual de iones calcio (Collado-González *et al.*, 2017). Esto pudo ser observado en el presente estudio a través de producción de IL-6 con el eluido del cemento sellador BioRoot el cual tuvo picos de producción en las 6 y 12 h, pero disminuyó considerablemente a las 24 h.

La cuantificación de citocinas producidas por células mononucleares humanas posterior a su estimulación con eluidos de cementos selladores a través de ELISA, ha sido reportada en una única ocasión (Souza *et al.* 2019), mostrando diferencia significativa entre cementos selladores a base de resina epóxica y biocerámicos, reflejando discrepancia con nuestro estudio el cual no encontró diferencias entre los cementos selladores.

Souza *et al.* 2019 en su grupo control no obtuvo diferencias en comparación a los grupos de los eluidos de los cementos selladores, en cambio en el presente estudio se obtuvieron diferencias entre el grupo control y los grupos de los eluidos de los cementos selladores. Esta diferencia estaría relacionada a que en el estudio previo el grupo control no utilizó ningún estimulante y en este estudio se utilizaron LPS para el grupo control. En el estudio de Souza fueron utilizados únicamente cementos selladores a base de resinas epóxicas y biocerámicos a diferencia del presente estudio en el cual se incluyeron más variables, como tres composiciones químicas diferentes de 4 selladores endodónticos reconocidos por su capacidad de no ser reabsorbidos en su totalidad por el organismo. En ambos estudios fueron utilizadas células mononucleares humanas, puesto que son células capaces de liberar mediadores de inflamación (Velard *et al.* 2009) ante una agresión como es la extrusión de materiales hacia el espacio perirradicular (Kaplan *et al.* 1996). Sin embargo, hasta ahora existe muy poca información de la respuesta de estas células cuando son estimuladas con estos cementos selladores.

IL-6 es una citocina pro y anti inflamatoria presente en muchos procesos biológicos (Elsalhy *et al.*, 2013). Basados en las diferencias obtenidas del grupo control y del grupo de eluidos de cementos selladores en este estudio sugiere que

los componentes de los cementos selladores podrían no activar la respuesta proinflamatoria en los monocitos a diferencia de los LPS.

IX. CONCLUSIONES

El presente estudio *in vitro* mostró que todos los cementos selladores estimularon la producción de interleucina IL-6 en todos los intervalos de tiempo de prueba teniendo un pico de mayor producción a las 12 h que disminuyó considerablemente a las 24 h en todos los cementos selladores.

La defensa del huésped conlleva una respuesta inflamatoria que se encuentra modulada por la producción de diversas citocinas y quimiocinas. La IL-6 es una citocina anti y proinflamatoria necesaria para el inicio del proceso de regeneración y reparación de los tejidos, sin embargo, la sobre estimulación de esta citocina puede llegar a sobre compensar o inhibir la respuesta inmune del huésped. Se requiere más estudios que contemplen otras citocinas, diferentes células y tiempos experimentales para lograr comprender de mejor manera la influencia de estos materiales en el organismo.

X. PROPUESTAS

Se recomienda realizar más estudios con mayor diversidad, tipo, clase de citocinas, un rango más amplio de tiempos experimentales, diferentes concentraciones de eluidos y diversos cementos selladores. Estudios *in vitro* que involucren diferentes células que se encuentran presentes en la respuesta inmune para tratar de similar una respuesta *in vivo*. De igual manera se recomienda considerar la realización de estudios *in vivo* para evaluar la producción de diversas citocinas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdolsamadi, Hamid Reza, Mohammad Vahedi, Farzad Esmaeili, Shahrzad Nazari, and Shermin Abdollahzadeh. 2008. "Serum Interleukin-6 as a Serologic Marker of Chronic Periapical Lesions: A Case-Control Study." *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects* 2 (2): 43.
- Al-Khatib, Zuhair Z, Robert H Baum, Donald R Morse, Cemil Yesilsoy, Satish Bhambhani, and M Lawrence Furst. 1990. "The Antimicrobial Effect of Various Endodontic Sealers." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 70 (6): 784–90.
- Al-Hiyasat, A S, M Tayyar, and H Darmani. 2010. "Cytotoxicity Evaluation of Various Resin Based Root Canal Sealers." *International Endodontic Journal* 43 (2): 148–53.
- Alsubait, Sara A., Reem Al Ajlan, Hala Mitwalli, Nour Aburaisi, Amer Mahmood, Manikandan Muthurangan, Randa Almadhri, Musaad Alfayez, and Sukumaran Anil. 2018. "Cytotoxicity of Different Concentrations of Three Root Canal Sealers on Human Mesenchymal Stem Cells." *Biomolecules* 8 (3).
- Anusavice, Kenneth J, José dos Santos, and Chiayi Shen. 2004. *Phillips Ciencia de Los Materiales Dentales*. Elsevier,.
- Arias-Moliz, M T, and J Camilleri. 2016. "The Effect of the Final Irrigant on the Antimicrobial Activity of Root Canal Sealers." *Journal of Dentistry* 52: 30–36.
- Augsburger, Robert A, and Donald D Peters. 1990. "Radiographic Evaluation of Extruded Obturation Materials." *Journal of Endodontics* 16 (10): 492–97.
- Azar, Nasim Gheshlaghi, Mahnaz Heidari, Zahra Samadi Bahrami, and Fazel Shokri. 2000. "In Vitro Cytotoxicity of a New Epoxy Resin Root Canal Sealer." *Journal of Endodontics* 26 (8): 462–65.
- Balto, Khaled, Hajime Sasaki, and Philip Stashenko. 2001. "Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction." *Infection and Immunity* 69 (2): 744–50.
- Barkhordar, R A, C Hayashi, and M Z Hussain. 1999. "Detection of Interleukin-6 in Human Dental Pulp and Periapical Lesions." *Dental Traumatology* 15 (1): 26–27.
- Barton, Beverly E. 1997. "IL-6: Insights into Novel Biological Activities." *Clinical Immunology and Immunopathology* 85 (1): 16–20.
- Biven, Glen M, M S Bapna, and Michael A Heuer. 2015. "Effect of Eugenol and Eugenol-Containing Root Canal Sealers on the Microhardness of Human Dentin," 1602–9.

- Borges, R P, M D Sousa-Neto, M A Versiani, F A Rached-Júnior, G De-Deus, C E S Miranda, and J D Pécora. 2012. "Changes in the Surface of Four Calcium Silicate-containing Endodontic Materials and an Epoxy Resin-based Sealer after a Solubility Test." *International Endodontic Journal* 45 (5): 419–28.
- Brackett, Martha Goël, Aksana Marshall, Petra E Lockwood, Jill B Lewis, Regina L W Messer, Serge Bouillaguet, and John C Wataha. 2009. "Inflammatory Suppression by Endodontic Sealers after Aging 12 Weeks in Vitro." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 91 (2): 839–44.
- Braga, J. M., R. R. Oliveira, R. C. Martins, and A. P. Ribeiro Sobrinho. 2014. "The Effects of a Mineral Trioxide Aggregate-Based Sealer on the Production of Reactive Oxygen Species, Nitrogen Species and Cytokines by Two Macrophage Subtypes." *International Endodontic Journal* 47 (10): 909–19.
- Brave, Dennis, A Ali Nasseh, and Ken Koch. 2012. "A Review of Bioceramic Technology in Endodontics." *Roots* 4 (4): 6–12.
- Brekalo Pršo, Ivana, Willy Kocjan, Hrvoje Šimic, Gordana Brumini, Sonja Pezelj-Ribaric, Josipa Borcic, Silvio Ferreri, and Ivana Miletic Karlovic. 2007. "Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions." *Mediators of Inflammation* 2007.
- Camargo, Carlos Henrique R, Tatiana R Oliveira, Gleyce O Silva, Sylvia B Rabelo, Marcia C Valera, and Bruno N Cavalcanti. 2014. "Setting Time Affects in Vitro Biological Properties of Root Canal Sealers." *Journal of Endodontics* 40 (4): 530–33.
- Camps, Jean, Charlotte Jeanneau, Ikbale El Ayachi, Patrick Laurent, and Imad About. 2015. "Bioactivity of a Calcium Silicate-Based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro." *Journal of Endodontics* 41 (9): 1469–73.
- Carvalho-Junior, J R, Lourenço Correr-Sobrinho, A B Correr, M A C Sinhoreti, S Consani, and Manoel Damião de Sousa-Neto. 2007. "Radiopacity of Root Filling Materials Using Digital Radiography." *International Endodontic Journal* 40 (7): 514–20.
- Chang, Seok Woo, So Youn Lee, Soo Kyung Kang, Kee Yeon Kum, and Eun Cheol Kim. 2014. "In Vitro Biocompatibility, Inflammatory Response, and Osteogenic Potential of 4 Root Canal Sealers: Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex, and Iroot SP Root Canal Sealer." *Journal of Endodontics* 40 (10): 1642–48.
- Ciasca, Maria, Anita Aminoshariae, Ge Jin, Thomas Montagnese, and Andre Mickel. 2012. "A Comparison of the Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Production of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot Mineral

Trioxide Aggregate in Human Osteoblast Cell Culture Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction." *Journal of Endodontics* 38 (4): 486–89.

Cohen, S. 2011. *Vías de La Pulpa*. 11th ed. MOSBY ELSEVIER.

Collado-González, M., D. García-Bernal, R. E. Oñate-Sánchez, P. S. Ortolani-Seltenerich, A. Lozano, L. Forner, C. Llena, and F. J. Rodríguez-Lozano. 2017. "Biocompatibility of Three New Calcium Silicate-Based Endodontic Sealers on Human Periodontal Ligament Stem Cells." *International Endodontic Journal* 50 (9): 875–84.

Costa, Fábio, Pedro Sousa Gomes, and Maria Helena Fernandes. 2016. "Osteogenic and Angiogenic Response to Calcium Silicate-Based Endodontic Sealers." *Journal of Endodontics* 42 (1): 113–19.

Covo Morales, Eduardo, Antonio Díaz Caballero, and Leonardo Padilla Correales. 2016. "Liberación de Citoquinas En El Periápice a Causa de Materiales de Obturación En Endodoncia. Revisión Sistemática." *Ciencia y Salud Virtual* 8 (2): 71–75.

Dimitrova-Nakov, Sasha, Emel Uzunoglu, Hector Ardila-Osorio, Anne Baudry, Gilles Richard, Odile Kellermann, and Michel Goldberg. 2015. "In Vitro Bioactivity of Bioroot™ RCS, via A4 Mouse Pulpal Stem Cells." *Dental Materials* 31 (11): 1290–97.

Dinarello, Charles A. 2000. "Proinflammatory Cytokines." *Chest* 118 (2): 503–8.

Dixon, C Merle, and U Garfield Rickert. 1933. "Tissue Tolerance to Foreign Materials." *Journal of the American Dental Association* 20 (8): 1458–72.

Dongari-Bagtzoglou, A I, and J L Ebersole. 1996. "Production of Inflammatory Mediators and Cytokines by Human Gingival Fibroblasts Following Bacterial Challenge." *Journal of Periodontal Research* 31 (2): 90–98.

Donnelly, Adam, Jeremy Sword, Yoshihiro Nishitani, Masahiro Yoshiyama, Kelli Agee, Franklin R Tay, and David H Pashley. 2007. "Water Sorption and Solubility of Methacrylate Resin-Based Root Canal Sealers." *Journal of Endodontics* 33 (8): 990–94.

Eldeniz, A. U., M. Shehata, C. Högg, and F. X. Reichl. 2016. "DNA Double-Strand Breaks Caused by New and Contemporary Endodontic Sealers." *International Endodontic Journal* 49 (12): 1141–51..

Elias, J A, R J Zitnik, and P Ray. 1992. "Fibroblast Immune-Effector Function. RP Phipps, Ed. Pulmonary Fibroblast Heterogeneity 295." CRC Press, Rochester.

Elsalhy, M., F. Azizieh, and R. Raghupathy. 2013. "Cytokines as Diagnostic Markers of Pulpal Inflammation." *International Endodontic Journal* 46 (6): 573–80.

- Flores, D S H, F J A Rached-Júnior, M A Versiani, D F C Guedes, M D Sousa-Neto, and J D Pécora. 2011. "Evaluation of Physicochemical Properties of Four Root Canal Sealers." *International Endodontic Journal* 44 (2): 126–35.
- Franceschini, Keila de Almeida, Yara Teresinha Corrêa Silva-Sousa, Fabiane Carneiro Lopes, Rodrigo Dantas Pereira, Regina Guenka Palma-Dibb, and Manoel Damião de Sousa-Neto. 2016. "Bond Strength of Epoxy Resin-based Root Canal Sealer to Human Root Dentin Irradiated with Er, Cr: YSGG Laser." *Lasers in Surgery and Medicine* 48 (10): 985–94.
- Gan, Stephanie D, Kruti R Patel, and Sandwich Elisa. 2013. "Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" 133 (9): e12-3.
- Gandolfi, M G, F Siboni, and C Prati. 2016. "Properties of a Novel Polysiloxane-Guttapercha Calcium Silicate-Bioglass-Containing Root Canal Sealer." *Dental Materials* 32 (5): e113–26.
- Garc, D. 2017. "Biocompatibility of Three New Calcium Silicate- Based Endodontic Sealers on Human Periodontal Ligament Stem Cells," 875–84..
- Gazivoda, Dragan, Tanja Dzopalic, Biljana Bozic, Zeljka Tatomirovic, Zlata Brkic, and Miodrag Colic. 2009. "Production of Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines by Inflammatory Cells from Periapical Lesions in Culture." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 38 (7): 605–11.
- Geurtsen, W, and G Leyhausen. 1997. "Biological Aspects of Root Canal Filling Materials–Histocompatibility, Cytotoxicity, and Mutagenicity." *Clinical Oral Investigations* 1 (1): 5–11.
- Gomes-Filho, João Eduardo, Jaqueline Viana Moreira, Simone Watanabe, Carolina Simonetti Lodi, Luciano Tavares Angelo Cintra, Eloi Dezan Junior, Pedro Felício Estrada Bernabé, Mauro Juvenal Nery, and José Arlindo Otoboni Filho. 2012. "Sealability of MTA and Calcium Hydroxidecontaining Sealers." *Journal of Applied Oral Science* 20 (3): 347–51.
- Grossman, L. I. 1958. "An Improved Root Canal Cement." *Journal of the American Dental Association (1939)* 56 (3): 381–85. PORQUE EN MAYUSCULAS EL APELLIDO?
- Huang, F-M, K-W Tai, M-Y Chou, and Y-C Chang. 2002. "Cytotoxicity of Resin-, Zinc Oxide–Eugenol-, and Calcium Hydroxide-based Root Canal Sealers on Human Periodontal Ligament Cells and Permanent V79 Cells." *International Endodontic Journal* 35 (2): 153–58.
- Huang, George T-J, Michael Do, Margaret Wingard, Jin S Park, and Nadia Chugal. 2001. "Effect of Interleukin-6 Deficiency on the Formation of Periapical Lesions after Pulp Exposure in Mice." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 92 (1): 83–88.
- Jung, S., S. Sielker, M.R. Hanisch, V. Libricht, E. Schäfer, and T. Dammaschke. 2018. "Cytotoxic Effects of Four Different Root Canal Sealers on Human

Osteoblasts." *PLoS ONE* 13 (3): 1–14.

Jung, Susanne, Viktor Libricht, Sonja Sielker, Marcel R. Hanisch, Edgar Schäfer, and Till Dammaschke. 2019. "Evaluation of the Biocompatibility of Root Canal Sealers on Human Periodontal Ligament Cells Ex Vivo." *Odontology* 107 (1): 54–63.

Jung, Susanne, Viktor Libricht, Sonja Sielker, Marcel R Hanisch, Edgar Schäfer, and Till Dammaschke. 2018. "Evaluation of the Biocompatibility of Root Canal Sealers on Human Periodontal Ligament Cells Ex Vivo." *Odontology* 0 (0): 0.

Jung, Susanne, Sonja Sielker, Marcel R. Hanisch, Viktor Libricht, Edgar Schäfer, and Till Dammaschke. 2018. "Cytotoxic Effects of Four Different Root Canal Sealers on Human Osteoblasts." *PLoS ONE* 13 (3): 1–14..

Junming, L E. 1987. "Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1: Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities." *Lab. Invest.* 56: 234–48.

Kaplan, S S, R E Basford, M H Jeong, and R L Simmons. 1996. "Biomaterial-neutrophil Interactions: Dysregulation of Oxidative Functions of Fresh Neutrophils Induced by Prior Neutrophil-biomaterial Interaction." *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 30 (1): 67–75.

Kasai, Takeshi, Katsuya Inada, Telsuya Takakuwa, Yasuhiko Yamada, Yoshihiro Inoue, Tadashi Shimamura, Shigeru Taniguchi, Shigehiro Sato, Go Wakabayashi, and Shigeatsu Endo. 1997. "Anti-Inflammatory Cytokine Levels in Patients with Septic Shock." *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 98 (1): 34–42.

Kawashima, N., and P. Stashenko. 1999. "Expression of Bone-Resorptive and Regulatory Cytokines in Murine Periapical Inflammation." *Archives of Oral Biology* 44 (1): 55–66.

Kishimoto, Tadamitsu, Shizuo Akira, Masashi Narazaki, and Tetsuya Taga. 1995. "Interleukin-6 Family of Cytokines and Gp130." *Blood* 86 (4): 1243–54.

Leonardo, Mário Roberto, Léa Assed Bezerra Da Silva, Mário Tanomaru Filho, Kleber Cortês Bonifácio, and Izabel Yoko Ito. 2000. "In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics." *Journal of Endodontics* 26 (7): 391–94.

Leonardo, Mário Roberto, Léa Assed Bezerra da Silva, Mário Tanomaru Filho, and Roberto Santana da Silva. 1999. "Release of Formaldehyde by 4 Endodontic Sealers." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 88 (2): 221–25.

Malhotra, Sakshi, Mithra N Hegde, and Chitharanjan Shetty. 2014. "Bioceramic Technology in Endodontics." *British Journal of Medicine and Medical Research* 4 (12): 2446.

- Matsuki, Y, THARAK Yamamoto, and K Hara. 1992. "Detection of Inflammatory Cytokine Messenger RNA (MRNA)-Expressing Cells in Human Inflamed Gingiva by Combined in Situ Hybridization and Immunohistochemistry." *Immunology* 76 (1): 42.
- Morgental, Renata Dornelles, Fabiana Vieira Vier-Pelisser, Sílvia Dias de Oliveira, Fernanda C Antunes, Deborah Meirelles Cogo, and P M P Kopper. 2011. "Antibacterial Activity of Two MTA-based Root Canal Sealers." *International Endodontic Journal* 44 (12): 1128–33.
- Munoz, Carlos, Jean Carlet, Catherine Fitting, Benoit Misset, Jean Pierre Blériot, and Jean Marc Cavaillon. 1991. "Dysregulation of in Vitro Cytokine Production by Monocytes during Sepsis." *The Journal of Clinical Investigation* 88 (5): 1747–54.
- Okada, H, and S Murakami. 1998. "Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease." *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 9 (3): 248–66.
- Ørstavik, D A G. 2005. "Materials Used for Root Canal Obturation : Technical , Biological and Clinical Testing," no. 3: 25–38.
- Ørstavik, Dag, and T R Pitt Ford. 2008. *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. Am Dental Educ Assoc.
- Perlmann, Peter, Eva Engvall, and An Elisa. 1971. "Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)."
- Pezelj-Ribaric, Sonja, Ivica Anic, Ivana Brekalo, Ivana Miletic, Milena Hasan, and Marica Simunovic-Soskic. 2002. "Detection of Tumor Necrosis Factor α in Normal and Inflamed Human Dental Pulp." *Archives of Medical Research* 33 (5): 482–84.
- Prüllage, Raquel Kathrin, Kent Urban, Edgar Schäfer, and Till Dammaschke. 2016. "Material Properties of a Tricalcium Silicate–Containing, a Mineral Trioxide Aggregate–Containing, and an Epoxy Resin–Based Root Canal Sealer." *Journal of Endodontics* 42 (12): 1784–88.
- Radics, Tünde, C Kiss, I Tar, and I J Marton. 2003. "Interleukin-6 and Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor in Apical Periodontitis: Correlation with Clinical and Histologic Findings of the Involved Teeth." *Oral Microbiology and Immunology* 18 (1): 9–13.
- Ricucci, D, and K Langeland. 1998. "Apical Limit of Root Canal Instrumentation and Obturation, Part 2. A Histological Study." *International Endodontic Journal* 31 (6): 394–409.
- Ricucci, Domenico, and Simona Loghin. 2016. "Apically Extruded Sealers : Fate and Influence on Treatment," 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.11.020>.
- Ricucci, Domenico, John Russo, and Michael Rutberg. n.d. "A Prospective Cohort

Study of Endodontic Treatments of 1 , 369 Root Canals : Results after 5 Years.” *YMOE* 112 (6): 825–42.

- Ricucci, Domenico, José F. Siqueira, Anna L. Bate, and Thomas R. Pitt Ford. 2009. “Histologic Investigation of Root Canal-Treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-Four Patients.” *Journal of Endodontics* 35 (4): 493–502.
- Russell, Also. 2009. “Bioceramic Technology – the Game Changer in Endodontics,” no. April: 13–17.
- Sá, A R De, P R Moreira, G M Xavier, I Sampaio, E Kalapothakis, W O Dutra, and R S Gomez. 2007. “Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA Functional Gene Polymorphisms with Symptomatic Dental Abscesses.” *International Endodontic Journal* 40 (7): 563–72.
- Salles, Loise Pedrosa, Ana Livia Gomes-Cornélio, Felipe Coutinho Guimarães, Bruno Schneider Herrera, Sonia Nair Bao, Carlos Rossa-Junior, Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, and Mario Tanomaru-Filho. 2012. “Mineral Trioxide Aggregate–Based Endodontic Sealer Stimulates Hydroxyapatite Nucleation in Human Osteoblast-like Cell Culture.” *Journal of Endodontics* 38 (7): 971–76.
- Schäfer, E, and T Zandbiglari. 2003. “Solubility of Root-canal Sealers in Water and Artificial Saliva.” *International Endodontic Journal* 36 (10): 660–69.
- Siboni, F. 2017. “Properties of BioRoot RCS , a Tricalcium Silicate Endodontic Sealer Modified with Povidone and Polycarboxylate,” 120–36.
- Silva, Emmanuel J N L, Tiago P Rosa, Daniel R Herrera, Rogério C Jacinto, Brenda P F A Gomes, and Alexandre A Zaia. 2013. “Evaluation of Cytotoxicity and Physicochemical Properties of Calcium Silicate-Based Endodontic Sealer MTA Fillapex.” *Journal of Endodontics* 39 (2): 274–77.
- Souza, G L, C M P Rosatto, M J B Silva, M V Silva, and D B Rocha Rodrigues. 2019. “Evaluation of Apoptosis / Necrosis and Cytokine Release Provoked by Three Root Canal Sealers in Human Polymorphonuclears and Monocytes,” 629–38.
- Tyagi, Sanjeev, Priyesh Mishra, and Parimala Tyagi. 2013. “Evolution of Root Canal Sealers: An Insight Story.” *European Journal of General Dentistry* 2 (3): 199.
- Velard, Frédéric, Dominique Laurent-Maquin, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Abderrazzaq Belaaouaj, and Patrice Laquerriere. 2009. “Polymorphonuclear Neutrophil Response to Hydroxyapatite Particles, Implication in Acute Inflammatory Reaction.” *Acta Biomaterialia* 5 (5): 1708–15.
- Viapiana, Raqueli, Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, Mario Tanomaru-Filho, and Josette Camilleri. 2014. “Investigation of the Effect of Sealer Use on the Heat Generated at the External Root Surface during Root Canal Obturation Using

Warm Vertical Compaction Technique with System B Heat Source.” *Journal of Endodontics* 40 (4): 555–61.

Vouzara, Triantafyllia, Garyfallia Dimosiari, Elisabeth A. Koulaouzidou, and Nikolaos Economides. 2018. “Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer.” *Journal of Endodontics* 44 (5): 849–52.

Williamson, Anne E., Deborah V. Dawson, David R. Drake, Richard E. Walton, and Eric M. Rivera. 2005. “Effect of Root Canal Filling/Sealer Systems on Apical Endotoxin Penetration: A Coronal Leakage Evaluation.” *Journal of Endodontics* 31 (8): 599–604.

Yu, Siu Min, and Philip Stashenko. 1987. “Identification of Inflammatory Cells in Developing Rat Periapical Lesions.” *Journal of Endodontics* 13 (11): 535–40.

Zhang, W, Z Li, and B Peng. 2010. “Ex Vivo Cytotoxicity of a New Calcium Silicate–Based Canal Filling Material.” *International Endodontic Journal* 43 (9): 769–74.

Zhivotovsky, Boris, and Sten Orrenius. 2011. “Calcium and Cell Death Mechanisms: A Perspective from the Cell Death Community.” *Cell Calcium* 50 (3): 211–21.