



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Especialidad en Endodoncia

“CUANTIFICACIÓN DE IL-10 PRODUCIDA POR CÉLULAS MONONUCLEARES  
HUMANAS ESTIMULADAS POR CUATRO CEMENTOS SELLADORES  
ENDODÓNTICOS”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la  
Especialidad en Endodoncia

**Presenta:**

M. E. Samantha Nayely Castillo Valdés

**Dirigido por:**

C.D.E.E. César López Cruz

**Co-dirigido por:**

M. en C. María Laura González Dávalos

Dr. César López Cruz  
Presidente

\_\_\_\_\_

Dra. María Laura González Dávalos  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dr. Rosa Martha Pérez Serrano  
Vocal

\_\_\_\_\_

Dr. María Yolanda Elisa López Gómez  
Suplente

\_\_\_\_\_

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez  
Suplente

\_\_\_\_\_

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Marzo 2020, México

## Resumen

El objetivo del tratamiento de conductos es la limpieza, conformación y obturación del sistema de conductos radicular, con la finalidad de prevenir y curar periodontitis apical. Para ello se utilizan materiales durante la obturación del sistema de conductos, por lo general un núcleo (gutapercha) y cemento sellador. Si bien su uso es de manera intraconducto, puede ocurrir casos en los cuales de manera involuntaria estos puedan estar en contacto con los tejidos perirradiculares. Por ello, los materiales a utilizar deben ser biocompatibles, ya que al estar en contacto con los tejidos perirradiculares pueden alterar la respuesta inmune y de esta manera intervenir en la correcta reparación. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de diferentes cementos selladores en células mononucleares humanas mediante la producción de la Interleucina 10 (IL-10). **Material y métodos:** Se utilizaron células mononucleares humanas las cuales fueron estimuladas con eluidos obtenidos de los cementos selladores BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer y Ah Plus. Se recuperó el sobrenadante de los cultivos a las 3, 6, 12 y 24 horas de estimulación y mediante ELISA se cuantificó la producción y liberación de IL-10 en el medio. **Resultados:** En todos los cementos selladores se observó la producción de IL-10, sin diferencia significativa. Se observó una diferencia significativa en la producción de IL-10 en todos los grupos a través de los tiempos, siendo mayor la producción a las 3 horas. **Conclusiones:** Este estudio *in vitro* mostró que todos los cementos selladores evaluados, estimularon a las células mononucleares humanas a producir IL-10, principalmente durante las primeras horas. Considerando la importancia del rol por parte de la IL-10 en la reparación y cicatrización, se piensa que su producción estimulada por estos materiales puede ser benéfica.

(**Palabras clave:** IL-10, cemento sellador, células mononucleares humanas)

## Summary

The main objective of root canal treatment is the cleaning, conformation, and filling of the root canal system, in order to prevent and heal apical periodontitis. For that purpose, materials are used during the sealing of the root canal system, usually a core (gutta-percha) and a cement sealer. Although its use is intracanal, it may be cases in which the cement sealer may involuntarily come into contact with the periradicular tissues. Therefore, the materials to be used must be biocompatible, considering that its contact with the periradicular tissues can modify the immune response and thus intervene in the correct healing. **Objective:** The aim of this study was to know the effect of different cement sealers in human mononuclear cells through the production of Interleukin 10 (IL-10). **Material and methods:** Human mononuclear cells were used, which were stimulated with eluates obtained from BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer y Ah Plus. 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-10 in the medium. **Results:** IL-10 production was observed in all cement sealers, without significant differences. A significant difference in IL-10 production was observed in all groups over time, with production being higher at 3 hours. **Conclusions:** This *in vitro* study showed that all the cement sealers evaluated, stimulated human mononuclear cells to produce IL-10, mainly during the first hours. Considering the importance of the role of IL-10 in repair and healing, it is thought, that its production stimulated by these materials its beneficial.

(Keywords: IL-10, cement sealers, human mononuclear cells)

## **Dedicatorias**

A mis padres, este logro es de ellos también, sin ellos este anhelo no hubiera sido posible. Los amo infinitamente.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Agradecimientos

-A Dios, por esos maravillosos pilares y guías que me dio, mis padres. Por permitirme llegar a este momento que parecía muy lejano, cumpliendo el anhelo de mi corazón, su mano me ha sostenido y guiado en todo tiempo. Dios ha sido fiel.

-A mis padres, a quienes les debo todo, muchísimas gracias por estar en todo momento, por su amor, por sus palabras de aliento, por su apoyo incondicional, por su tiempo, por su esfuerzo, por motivarme cada día a ser mejor, en fin gracias por tanto. Soy muy afortunada al tenerlos como mis padres.

-A mi Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme dado un lugar en sus aulas y permitirme formar parte del programa de la especialidad de Endodoncia.

-A mis maestros, gracias por sus enseñanzas, regaños, consejos, paciencia, por compartir su conocimiento con gusto, por los momentos de convivencia y por toda la ayuda brindada.

- A mi asesor de Tesis el Dr. César López Cruz, gracias por sus aportaciones y disposición durante la elaboración de este trabajo. También agradecimiento al Dr. Rubén Domínguez Pérez, primeramente por su paciencia y por sus conocimientos brindados junto con la Dra. Rosa Martha Pérez Serrano, gracias por su apoyo.

- Agradezco toda su disposición en apoyarme a la Dra. Ofelia Mora Izaguirre y a la M. en C. María Laura González Dávalos del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM; así como a la M. en C. Adriana González Gallardo por apoyo técnico de la Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM.

-Agradezco al Comité Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por concederme una beca, siendo de gran apoyo económico para mis estudios y la realización de este proyecto de investigación.

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	i
<b>Summary</b>	ii
<b>Dedicatorias</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice</b>	v
<b>Abreviaturas y siglas</b>	vii
<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Antecedentes/estado del arte</b>	3
<b>III. Fundamentación teórica</b>	5
III.1 Cementos Selladores	5
III.2 Interacción biológica con tejidos perirradiculares	10
III.3 IL-10 en Endodoncia	12
III.4. Ensayo de ELISA	13
<b>IV. Hipótesis</b>	15
<b>V. Objetivos</b>	16
V.1 General	16
V.2 Específicos	16
<b>VI. Material y métodos</b>	17
VI.1 Tipo de investigación	17
VI.2 Población o unidad de análisis	17
VI.3 Tamaño de muestra	17
VI.3.1 Criterios de Selección	17
VI.3.2 Variables Estudiadas	18
VI.4 Procedimientos	20
VI.4.1 Análisis Estadístico	25
VI.4.2 Consideraciones éticas	25
<b>VII. Resultados</b>	27

<b>VIII. Discusión</b>	29
<b>IX. Conclusiones</b>	35
<b>X. Propuestas</b>	36
<b>XI. Bibliografía</b>	37

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Abreviaturas y

### Siglas

IL-10	Interleucina 10
MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5- difeniltetrazolio
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Células PDL	Células del Ligamento Periodontal
MTA	Mineral Trióxido Agregado
ZOE	Óxido de Zinc y Eugenol
IL-4	Interleucina 4
IL-13	Interleucina 13
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-1b	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina 6
Células Tr1	Célula Treg 1
Células Th1	Células T helper 1
Células Th17	Células T helper 17
IL-12	Interleucina 12
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IL-1ra	Antagonista del receptor de Interleucina 1
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa$ B
mL	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
pg	Picogramo
pH	Potencial de hidrogeno
PBS	Buffer fosfato salino

DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
SFB	Suero fisiológico bovino
RPM	Revoluciones por minuto
LPS	Lipopolisacáridos
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
NaClO	Hipoclorito de Sodio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
nm	nanómetro

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## I. INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica tiene como objetivo la eliminación de los productos residuales de descomposición del tejido pulpar y los microorganismos presentes dentro del sistema del conducto radicular, seguido de la obturación del sistema de conductos, lo que impide la colonización o recolonización por microorganismos orales (de Oliveira Mendes *et al.*, 2010; Bin *et al.*, 2012).

El éxito se basa en parte en la capacidad de la obturación y del sistema sellador para bloquear la filtración de bacterias y subproductos bacterianos a través de la obturación del sistema de conductos (Williamson *et al.*, 2005).

Por tanto, la obturación estándar es la combinación de un cemento sellador con un núcleo central, el cual hasta ahora ha sido casi de manera exclusiva la gutapercha (Ørstavik, 2005). Estos cementos, se han desarrollado para su uso de forma intraconducto pero sucede que de manera involuntaria estos pueden ser extruidos por medio del foramen apical y estar en contacto con los tejidos periapicales (Van Landuyt *et al.*, 2012) estimulando la producción de citocinas (Covo Morales *et al.*, 2016).

Es de vital importancia para la endodoncia moderna, tener presente que el efecto biológico de estos materiales puede jugar un papel importante en los fenómenos fisiológicos de la inflamación (Covo Morales *et al.*, 2016).

Para el presente estudio se eligió evaluar la citocina IL-10. Una citocina antiinflamatoria, dada su importancia en el control del grado y la duración de la reacción inflamatoria (Bazzoni *et al.*, 2010) y que además, promueve la cicatrización y la reparación (Cai *et al.*, 2015). Para evaluar la concentración de citocinas producidas en un momento determinado, se utiliza el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Este método es sofisticado y en condiciones experimentales proporciona una evidencia inmunológica sobre el grado de

biocompatibilidad a nivel bioquímico de los materiales de obturación evaluados (Huang *et al.*, 2005).

Lo anterior, permite al clínico conocer las posibles reacciones que el material a utilizar puede estimular o inducir en el paciente. De esta manera podrá considerar las opciones del material a elegir, que cumpla con las características necesarias requeridas para cada caso, que produzca menos reacciones adversas en los tejidos periapicales y cause menos molestias post operatorias.

Dirección General de Bibliotecas UNO

## II. ANTECEDENTES

Chang *et al.* (2014) compararon la citotoxicidad, la respuesta inflamatoria, el efecto osteogénico, y el mecanismo de señalización de 4 cementos selladores, Sealapex (Sybron Kerr, WA), ARS (Dentsply), MTA Fillapex (Angelus) y iRoot SP (BioCreamix Inc) en células del ligamento periodontal de humanos. Se utilizó el ensayo MTT (Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazolio) y ELISA luego de exponer las células a los cementos selladores durante 3, 7, 14 días, concluyendo que ARS, MTA Fillapex e iRoot SP inducen una expresión menor de mediadores inflamatorios y promueve la diferenciación osteoblástica de células de ligamento periodontal en comparación con Sealapex.

Jung *et al.* (2018 a) evaluaron la biocompatibilidad de dos cementos selladores relativamente nuevos que contienen Silicato de Calcio (MTA Fillapex y BioRoot RCS) con dos selladores populares (AH-Plus, a base de resina epóxica y Pulp Canal Sealer, a base de Óxido de Zinc y Eugenol) en células humanas del ligamento periodontal (PDL). Se realizaron eluidos de cada cemento sellador a diferentes tiempos (24 horas, 7, 14, y 21 días) que fueron añadidos a las células PDL. Se observó que con el BioRoot RCS hubo regeneración de las células con el tiempo, además mostró baja toxicidad en estado recién mezclado. El MTA Fillapex y el Pulp Canal Sealer eran citotóxicos recién mezclados, y también después de fraguados, mientras que el AH Plus era citotóxico en un estado recién mezclado, pero no en estado fraguado. El BioRoot RCS resultó biocompatible y bioactivo, ya que parece tener una influencia positiva sobre el metabolismo de las células PDL. El Pulp Canal Sealer y MTA Fillapex no mostraron biocompatibilidad en contacto con las células PDL y el AH Plus recién mezclado fue el menos biocompatible en estado de fraguado.

Alsubait *et al.* (2018) realizaron un estudio para evaluar el efecto dependiente de la dosis/citotoxicidad en células troncales mesenquimales de médula ósea de los selladores BioRoot RCS y Endosequence BC en comparación

con AH Plus. Los cultivos celulares fueron expuestos ante eluidos de los cementos selladores con diferentes diluciones. Se observó que la cantidad de células en el grupo expuesto a AH Plus fue significativamente menor que el grupo control. No se detectó ninguna diferencia significativa en viabilidad celular entre el sellador Endosequence BC y el control en cualquiera de los tiempos examinados. En BioRoot RCS, la proliferación fue significativamente menor que el control. Concluyendo que los eluidos de los selladores BioRoot RCS y Endosequence BC son menos tóxicos para las células mesenquimales humanas en comparación con AH Plus. Sin embargo, a concentraciones más altas, BioRoot RCS tenía menos citocompatibilidad que Endosequence BC.

En otro estudio realizado por Jung *et al.* (2018 b) evaluaron la citotoxicidad de cuatro cementos selladores diferentes (Pulp Canal Sealer, AH Plus, BioRoot RCS, MTA Fillapex) en dos estados, recién mezclados y fraguados. Utilizaron eluidos de los cementos y fueron expuestos ante osteoblastos humanos durante 24 horas, 7, 14 y 21 días. Concluyeron que AH Plus presentó toxicidad únicamente recién mezclado pero no una vez fraguado. Pulp Canal Sealer y MTA Fillapex mostraron toxicidad en ambos estados y BioRoot RCS presentó la menor citotoxicidad en ambos estados, además que se observó indicios de regeneración celular, una influencia positiva en el metabolismo celular y biocompatibilidad.

### III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### III.1 Cementos Selladores

Los cementos selladores endodónticos se utilizan en la obturación del sistema de conductos radiculares para lograr un sellado hermético en todo el conducto, incluido el foramen apical, irregularidades y discrepancias menores entre la pared dentinaria del conducto radicular y el núcleo del material de obturación (Branstetter y Von Fraunhofer, 1982).

El cemento sellador endodóntico ideal debe ser biocompatible, dimensionalmente estable, capaz de inducir osteogénesis y cementogénesis, fácil de preparar y de manipular, estéril, radiopaco y económico (Grossman, 1976; Torabinejad *et al.*, 1993; Gomes-Filho *et al.*, 2009). Además, los materiales de obturación deben ser ligeramente insolubles para prevenir su disolución ante fluidos en el conducto radicular. Si el cemento sellador o los componentes de su eluido llega a estar en contacto directo con los tejidos radiculares dependiendo del tiempo-concentración puede tener efectos en el metabolismo y regeneración del hueso (Jung *et al.*, 2018 b).

Hoy en día, hay varios tipos de cementos selladores endodónticos disponibles, incluidos selladores a base de ionómero de vidrio, óxido de zinc-eugenol, resina, hidróxido de calcio, silicona y selladores de conductos radiculares a base de biocerámicos (Zhou *et al.*, 2013).

#### Generalidades del AH Plus

AH Plus es un sellador a base de resina epoxi ampliamente utilizado en endodoncia (Bin *et al.*, 2012). Los cementos a base de resina surgieron con el propósito de perfeccionar las características adhesivas de los selladores, que incluye selladores a base de resina epóxica, como el AH Plus, y a base de metacrilato, como el EndoRez (Proust y Sealer, 1985). Por mucho el más exitoso de estos cementos a base de resina es de la serie AH (Ørstavik, 2005).

La fórmula original epoxi amina de AH 26 ha sido mantenida, sin embargo, se han utilizado aminas recientemente desarrolladas. Como resultado de varias innovaciones, con AH Plus fue posible por primera vez desarrollar un sellador termoplástico de conductos radiculares que permita la eliminación del material en caso de ser necesario. Otra ventaja de AH Plus es su forma de aplicación: un sistema de pasta y pasta, que asegura un rápida mezcla (Plus *et al.*, 2005).

Estos selladores hidrófobos se usan sin ningún tratamiento de la superficie de la dentina o adhesivo y son capaces de activar grupos amino expuestos en el colágeno para formar enlaces covalentes (Al-Khatib *et al.*, 1990).

El AH Plus ha ganado popularidad a pesar de su bien documentada toxicidad y mutagenicidad (Azar *et al.*, 2000). Ha revelado un potencial de citotoxicidad más bajo en comparación con AH26, pero ambos selladores causan un aumento en la genotoxicidad dependiente de la dosis (Huang *et al.*, 2002).

### Composición

Pasta epóxica: Diepóxido, Tungsteno de calcio, Óxido de circonio, Aerosil y Pigmento.

Pasta amina: 1-adamantano amina, N, N'-dibencil-5-oxa-nonandiamina-1,9, TCD-Diamina. Tungsteno de calcio, Óxido de circonio, Aerosil y Aceite de silicona (Plus *et al.*, 2005).

### Propiedades

AH Plus se caracteriza 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 (Plus *et al.*, 2005). Tiene un tiempo de trabajo de unas 4 horas y de fraguado de 8 horas (Kenneth y Louis, 2011).

## Generalidades del Pulp Canal Sealer

Los cementos selladores a base de óxido de zinc eugenol (ZOE) se han utilizado durante muchos años, a pesar de los reportes sobre la liberación de eugenol en concentraciones potencialmente citotóxicas (Lindqvist y Otteskog, 1980). Estos cementos tienen actividad antibacteriana, pero suele provocar cierto grado de toxicidad cuando está en contacto directo con tejidos vitales (Ørstavik, 2005). Estudios *in vitro* atribuyen esta toxicidad a los iones de zinc y eugenol que se liberan al formarse la mezcla eugenolato de zinc (Zhou *et al.*, 2013).

Cuando el eugenol se mezcla con óxido de zinc, se produce una reacción de quelación y se forma eugenolato de zinc. El cemento de óxido de zinc y eugenol, examinado estructuralmente, consiste en granos de óxido de zinc cubiertos por una matriz de eugenolato de zinc. Debido a que las unidades de eugenolato de zinc separadas se mantienen unidas por las fuerzas de van der Waals y partículas entrelazadas, estos cementos son mecánicamente débiles (Wilson *et al.*, 1973).

El éxito clínico, de estos cementos, en endodoncia se debe a la eliminación de microorganismos y otros materiales antigénicos del espacio pulpar (Cohen y Burns, 2002).

## Composición

Polvo: Óxido de zinc, Polvo de plata, Yoduro de timol y Resina de ácido dimérico

Líquido: 4-alil-2-metoxifenol, resina balsámica y agua (Siboni, 2017) .

## Propiedades

El eugenol es antibacterial, sin embargo una pequeña cantidad de ZOE en el vértice de la raíz presenta una concentración de eugenol lo suficientemente alto como para ser tóxico para las bacterias y el huésped. Por otra parte, el área periapical recibe una menor dosis de eugenol, donde el efecto resulta un tanto antiinflamatorio y analgésico (Markowitz *et al.*, 1992).

### Generalidades MTA Fillapex

La terapia endodóntica ha sido grandemente beneficiada por los cementos a base de silicato tricálcico, más comúnmente conocidos como cementos a base de MTA (Mineral Trióxido Agregado). Estos materiales son hidrofílicos, requieren agua para endurecer y tener buena biocompatibilidad y habilidad para la formación de apatita (Gandolfi *et al.*, 2013, 2015).

El MTA Fillapex es un sellador endodóntico basado en el MTA, desarrollado por Angelus (Londrina/Parana/Brazil) y lanzada comercialmente en el 2010. Es un producto que combina las ventajas probadas del MTA con un material de obturación intraconducto. Su fórmula en sistema pasta/pasta permite una obturación completa del sistema de conductos, incluyendo los conductos accesorios lateral y accesorios, además, está indicado para su uso en técnicas de obturación de calor y frío (Sealer, 2011; Viapiana *et al.*, 2014).

Se introdujo en el mercado en un intento de combinar las propiedades fisicoquímicas de un sellador del conducto radicular con las propiedades biológicas del MTA, sin embargo, se ha mostrado que la asociación del cemento sellador de conductos con MTA no mejoró las propiedades biológicas del MTA Fillapex (Braga *et al.*, 2014).

### Composición

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).

### Propiedades

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 (Sealer, 2011; Vitti *et al.*, 2013; Gandolfi *et al.*, 2016). Tiene un tiempo de trabajo de 23 minutos y

un tiempo medio de fraguado de 130 minutos (2 horas y 10 minutos), con una variación de  $\pm 10$  minutos (Moreira, 2010).

### Generalidades del BioRoot RCS

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 adecuadas incluyendo la tasa de flujo, la capacidad de sellado, la manipulación y fraguado más rápido (Morgental *et al.*, 2011; Salles *et al.*, 2012).

El BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maur-des Fosses, France) es un cemento a base de silicato tricálcico hidráulico en polvo/líquido, se encuentra en el mercado desde Febrero 2015 y se recomienda su uso para la técnica de cono único, o condensación lateral en frío (Gilles y Oliver, 2012).

Parece ser un material endodóntico bastante prometedor porque es significativamente menos citotóxico y genotóxico en comparación con otros selladores, además, induce un resultado bioactivo (Vouzara *et al.*, 2018). El silicato tricálcico es el ingrediente principal de BioRoot RCS, que se ha encontrado que aumenta la proliferación celular y promueve la diferenciación osteogénica (Bjerre *et al.*, 2008).

### Composición

El polvo contiene silicato tricálcico, povidona y óxido de zirconio; el líquido es una solución acuosa de cloruro de calcio y policarboxilato (Siboni, 2017).

### Propiedades

Se ha reportado que el BioRoot RCS induce *in vitro* la producción de factores de crecimiento angiogénicos y osteogénicos en células del ligamento periodontal humano, además, tiene menor citotoxicidad que los selladores convencionales, puede inducir el depósito de tejido duro y tiene actividad

antimicrobiana (Camps *et al.*, 2015; Dimitrova-Nakov *et al.*, 2015; Arias-Moliz y Camilleri, 2016). Presenta un tiempo óptimo de trabajo de 10 minutos y un tiempo máximo de fraguado de 4 horas (Camps *et al.*, 2015).

Algunos estudios mencionan que los biocerámicos no producirán una respuesta inflamatoria significativa en caso de que ocurriera una extrusión durante la obturación (Russell, 2009).

### **III.2 Interacción biológica con tejidos perirradiculares**

Aunque los selladores y los materiales de obturación están destinados a estar contenidos dentro del espacio del conducto radicular, la obturación del conducto da como resultado una interfaz íntima y compleja entre los materiales de obturación y los tejidos perirradiculares, que pueden extruirse a través de la constricción apical (Al-Hiyasat *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2019).

Los productos de degradación de los selladores endodónticos pueden pasar a los tejidos circundantes (Diomedede *et al.*, 2014). Como resultado, la respuesta inmune periapical podría verse afectada por la presencia de cementos selladores del conducto radicular (de Oliveira Mendes *et al.*, 2010).

La inflamación es un proceso dinámico que dura desde unos pocos minutos hasta años, dependiendo de la extensión de la lesión, el tipo de lesión y la vascularización del tejido, siendo una respuesta fisiológica normal y es crucial para mantener la homeostasis (Van Der Waal *et al.*, 2015), esta respuesta inflamatoria debe ser de corta duración y dar como resultado la respuesta protectora deseada, si es excesiva o prolongada puede provocar daños en los tejidos (Schmidt-Bleek *et al.*, 2015).

En la inflamación aguda, las células principalmente involucradas son neutrófilos, otros granulocitos y fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos). La inflamación crónica ocurre cuando una inflamación aguda no se resuelve, puede

durar un tiempo ilimitado y puede exacerbarse en episodios de inflamación aguda (Van Der Waal *et al.*, 2015). Durante la fase crónica, también se encuentran linfocitos T y B, células natural killer y células plasmáticas (Silva *et al.*, 2008).

Por otra parte, la respuesta del huésped es compleja e implica el reclutamiento de células inflamatorias y la participación de una extensa red de mecanismos inmunológicos que incluyen la generación de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión a la superficie celular y la producción de moléculas quimiotácticas como las quimiocinas (De Rossi *et al.*, 2008).

Las citocinas son pequeñas moléculas de señalización que median las respuestas del huésped en la infección, la inflamación, la hematopoyesis y el trauma. Trabajan en conjunto en una red de regulación homeostática para prevenir el estado constante de inflamación (Parolia, 2015). Actúan como factores de transferencia de información entre las células y son los factores rectores de la inflamación y su progresión a necrosis tisular y, en general, excelentes marcadores de inflamación (Ashida *et al.*, 2011; Elsalhy *et al.*, 2013; Matsuzaki *et al.*, 2016).

Las citocinas proinflamatorias inician y/o promueven la inflamación sistémica, mientras que las citocinas antiinflamatorias reducen la inflamación y favorecen la curación (Hahn y Liewehr, 2007). La presentación adecuada de las citocinas antiinflamatorias, interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) e IL-10, por ejemplo, puede resolver la inflamación prolongada y la transición de la respuesta inflamatoria para expresar factores pro-angiogénicos (Schmidt-Bleek *et al.*, 2015).

La reparación de los tejidos periapicales después del tratamiento del conducto radicular parece estar regulada a través de la señalización de la matriz celular y las interacciones moleculares que son promovidas por una serie de citocinas y otros factores de crecimiento (Martinez *et al.*, 2007). Por lo tanto, la curación exitosa de los tejidos periapicales después del tratamiento del conducto radicular depende en parte de la composición química de los materiales de relleno

y del grado de degradación y liberación de componentes de estos selladores en los tejidos periapicales (Brackett *et al.*, 2009; Diomedea *et al.*, 2014).

### **III.3 IL-10 en Endodoncia**

La IL-10 es una citocina tipo II, que tiene la actividad antiinmune y antiinflamatoria más potente de todos los miembros de la familia. Es el principal inhibidor de la síntesis de citocinas y la actividad de macrófagos, también modula la producción de las citocinas proinflamatorias como Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1b) e interleucina 6 (IL-6) en varios tipos de células (Mosser y Zhang, 2008; Elsalhy *et al.*, 2013) además promueve la cicatrización y la reparación (Cai *et al.*, 2015).

Es secretada principalmente por linfocitos y macrófagos activados; otras fuentes celulares son las células T-helper tipo 2 (Th2), subconjuntos de células T reguladoras designadas células Treg tipo 1 (Tr1), T-helper tipo 1 (Th1) y T-helper 17 (Th17), T CD8+ , monocitos y macrófagos, células dendríticas, células B, y eosinófilos. Además de las células inmunes están los queratinocitos, las células epiteliales e incluso las células tumorales (Hahn y Liewehr, 2007; Mosser y Zhang 2008).

Sus efectos biológicos se pueden enumerar de la siguiente manera: supresión de la proliferación y secreción de citocinas de las células T, supresión de la función de macrófagos y producción de interleucina 12 (IL-12), supresión de la producción de citocinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1), IL-6 e interleucina 8 (IL- 8), supresión de la síntesis de óxido nítrico y prostaglandina y producción de interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), aumento de la diferenciación y proliferación de células B, aumento de la producción del antagonista del receptor de Interleucina 1 (IL-1ra) y reducción de la proliferación de preosteoclastos para inhibir la pérdida ósea (Bıçakcı *et al.*, 2016).

Además, no toda la bioactividad de IL-10 produce una supresión de las respuestas inmunes, puede estimular la activación de las células B, prolongar la supervivencia de las células B, estimular la proliferación de células natural killer y la producción de citocinas; también actúa como un factor de crecimiento para estimular la proliferación de ciertos subconjuntos de células T CD8, la IL-10 es importante para la maduración óptima de las células T CD8 + de memoria (Mosser y Zhang 2008; Laidlaw *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado el papel de la IL-10 en las lesiones periapicales, las enfermedades periodontales y en la lesión endodóntica persistente (Sette-Dias *et al.*, 2016). Puede desempeñar un papel relevante en la cicatrización de heridas al disminuir la respuesta inflamatoria después de una lesión pulpar (Williamson *et al.*, 2005).

En la enfermedad periapical, la IL-10 inhibe la activación osteoclástica contra el aumento de la resorción ósea alveolar observada en la periodontitis que puede ser causada por el aumento de la producción de osteoprotegerina y la reducción de la producción del ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL) (de Oliveira Mendes *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006), además, afecta directamente a los precursores de osteoclastos e inhibe la generación y activación de osteoclastos (Menezes *et al.*, 2008).

Algunos estudios han mencionado que la IL-10 retrasa el desarrollo de periodontitis apical, esto sugiere que los investigadores deben desarrollar regímenes terapéuticos que puedan regular negativamente la respuesta proinflamatoria y aumentar la respuesta antiinflamatoria (Araujo-Pires *et al.*, 2014; Azuma *et al.*, 2018).

#### **III.4. Ensayo de ELISA**

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) 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.

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).

El ensayo inmunoasorbente ligado a enzimas utilizado para evaluar la expresión de citocinas es muy sofisticado (Huang *et al.*, 2005).

## **IV. HIPOTESIS**

### Hipótesis de trabajo

El cemento sellador BioRoot RCS estimula una menor producción de IL-10 en células mononucleares humanas en comparación con la estimulación que provocan el MTA Fillapex, el AH Plus o el Pulp Canal Sealer.

### Hipótesis nula

El cemento sellador BioRoot RCS estimula una mayor producción de IL-10 en células mononucleares humanas en comparación con la estimulación que provocan el MTA Fillapex, el AH Plus o el Pulp Canal Sealer.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 OBJETIVO GENERAL**

Conocer el efecto de diferentes cementos selladores en células mononucleares humanas mediante la producción de IL-10.

### **V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cuantificar la producción de IL-10 luego de exponer células mononucleares humanas ante el cemento sellador BioRoot RCS.
- Cuantificar la producción de IL-10 luego de exponer células mononucleares humanas ante el cemento sellador MTA Fillapex.
- Cuantificar la producción de IL-10 luego de exponer células mononucleares humanas ante el cemento sellador Pulp Canal Sealer.
- Cuantificar la producción de IL-10 luego de exponer células mononucleares humanas ante el cemento sellador AH Plus.
- Comparar los valores de IL-10 producida por las células mononucleares humanas expuestas ante BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer y AH Plus.

## VI. MATERIAL Y METODOS

### VI.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Experimental *In Vitro*

### VI.2 POBLACION

Cultivo de células mononucleares humanas obtenidas de sangre venosa periférica de un individuo sano.

### VI.3 TAMAÑO DE MUESTRA

48 pozos de placas de cultivo de 24 pozos (2 placas) con 500,000 células mononucleares cada uno. 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

Cultivos celulares que cumplan con viabilidad celular

##### Criterios de Exclusión

Cultivos que no cumplan con criterios de calidad

##### Criterios de Eliminación

Todas las muestras que durante el procesamiento sufrieron algún daño y/o fueron contaminadas.

## VI.3.2 VARIABLES ESTUDIADAS

### Independientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Eluido Cemento Sellador BioRoot RCS	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 el fabricante. Elaboración de eluidos.	Cuantitativa	Continua	μl
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 el fabricante. Elaboración de eluidos.	Cuantitativa	Continua	μl
Eluido Cemento	Medio de cultivo que ha sido expuesto al cemento sellador y ha absorbido	Mezcla del cemento sellador según	Cuantitativa	Continua	μl

Sellador AH Plus	compuestos químicos que son liberados después del fraguado.	el fabricante. Elaboración de eluidos.			
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 el fabricante. Elaboración de eluidos	Cuantitativa	Continua	μl

Dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Concentración IL-10	Cantidad de citosina secretada por células mononucleares humanas en cultivo y cuantificada	Cuantificación de IL-10 por medio de KIT ELISA ABTS Catalog #900-M21	Cuantitativa	Continua de Razón	Pg/mL

## VI.4 PROCEDIMIENTOS

### **Primera Fase.**

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

#### Toma de sangre por punción venosa.

Se obtuvieron 25 mililitros (mL) de sangre periférica de un individuo sano mediante la siguiente técnica:

1. Se colocó el brazo izquierdo sobre la mesa de trabajo mientras el sujeto se encontraba sentado. Se palpó la vena para identificar la zona de posible punción y se procedió a colocar el torniquete.
2. Se desinfectó la zona, y se procedió a la punción ingresando la aguja paralelamente al curso de la vena elegida, y con el bisel hacia arriba.
3. Posteriormente se introdujeron uno a uno 5 tubos Vacutainer de 5mL cada uno y con anticoagulante, mismos que fueron etiquetados adecuadamente.
4. Durante la toma del último tubo, se quitó 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 presione el algodón durante unos minutos.

#### Aislamiento de Células Mononucleares Humanas por gradiente de Ficoll.

1. Con una pipeta serológica se dispensaron 3mL de Ficoll-1077 en un tubo cónico de 15mL.
2. Se mezcló la muestra de sangre contenida en el Vacutainer hasta homogeneizarla.

3. Se retiró la tapa del Vacutainer y con una pipeta serológica se dispensaron 5mL de sangre anticoagulada hacia un tubo cónico de 15mL conteniendo 5mL de buffer fosfato salino (PBS), potencial de hidrogeno (pH) 7.4 estéril.
4. El tubo se homogeneizó por inversión.
5. Utilizando la misma pipeta serológica, se tomaron 10mL de la mezcla de sangre y PBS y se colocó cuidadosamente sobre la superficie del Ficoll-1077 sin perturbar la interfase dispensando 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. El tubo con la mezcla de Ficoll-1077, sangre y PBS, se centrifugó a 1,500 revoluciones por minuto (RPM) por 20 minutos, 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 microlitros ( $\mu$ l) se transfirió el estrato correspondiente a las células mononucleares humanas a un tubo de cultivo de fondo redondo de 12mL. Se aforaron los tubos de cultivo de fondo redondo a 10mL 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 minutos.
9. Se retiraron los tubos de la centrifuga y se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) 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 10mL 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 minutos.
12. Se retiraron de la centrífuga y se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 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 1mL de medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y se resuspendieron las células mononucleares con golpeteo digital.
14. Se procedió a realizar el conteo celular e identificación de viabilidad celular; para esto, la suspensión de células mononucleares humanas se mezcló con una solución al 0.4% de azul tripán y se colocó en un hemocitómetro de Neubauer para posteriormente observarlas bajo el microscopio invertido.

## **Segunda Fase.**

### Preparación de Eluidos Cementos Selladores

Se utilizaron los siguientes selladores:

AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemania),

Pulp Canal 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 colocado en una placa de 48 pozos y se le agregó 1mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sin suplementos ni antibióticos.
3. La placa de cultivo con todos los cementos fue incubado a 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 24 horas.
4. Una vez concluido el tiempo, se recuperó el medio de cultivo (eluido) utilizando una micropipeta, esta solución se filtró y se centrifugó a 10,000 RPM durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **Tercera Fase.**

#### Estimulación de las células con los eluidos.

1. Se realizaron dos ensayos de estimulación por separado, y cada uno por duplicado en cajas de cultivo de 48 pozos.
2. En cada pozo se sembraron 500,000 células inmediatamente después de haber sido aisladas junto con 960µl de medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomina y 40µl de cada uno de los eluidos o 40 µl de lipopolisacáridos (LPS) para el caso de los controles.
3. La placa se colocó en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante los tiempos establecidos (3, 6, 12 y 24 horas). Terminando el tiempo de incubación, el sobrenadante fue recuperado utilizando una micropipeta y colocado en

microtubos 0.6mL previamente identificados. Todos los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

#### **Cuarta Fase.**

##### Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se utilizó el Kit comercial ELISA Development kit para cuantificación de IL-10 y su correspondiente kit de soluciones amortiguadoras siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante (ELISA ABTS Catalog #900-M16, PeproTech):

1. Se diluyó el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de 1.0µg/mL. Inmediatamente se agregaron 100µl 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 300µl de solución de lavado en cada ocasión.
3. Se diluyó la solución estándar desde 1000pg/mL a cero utilizando solución diluyente e inmediatamente se agregaron 100µl de la solución estándar o 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 0.50µg/mL.
6. Se agregaron 100µl 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 5.5µl de Avidin Peroxidasa en una proporción 1:2000 en diluyente para obtener un volumen total de 11mL y se agregaron 100µl a cada pozo.

8. La placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se aspiró y lavo cada pozo cuatro veces.
9. Se agregaron 100µl de solución de ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) 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 nanómetros (nm) de longitud de onda.
11. Se realizaron lecturas cada 5 minutos durante 30 minutos, los valores de densidad óptica fueron almacenados en una hoja de Excel para su posterior análisis.

#### **Quinta Fase**

##### 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 gráficas.

#### VI.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Grap Pad Prism. Se aplicó el ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. Se consideró significancia estadística cuando  $p$  fue  $\leq 0.05$ .

#### VI.4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se obtuvo el consentimiento informado de un sujeto sano que donó 25mL de sangre periférica venosa. La extracción de esta sangre se realizó siguiendo estrictos estándares de

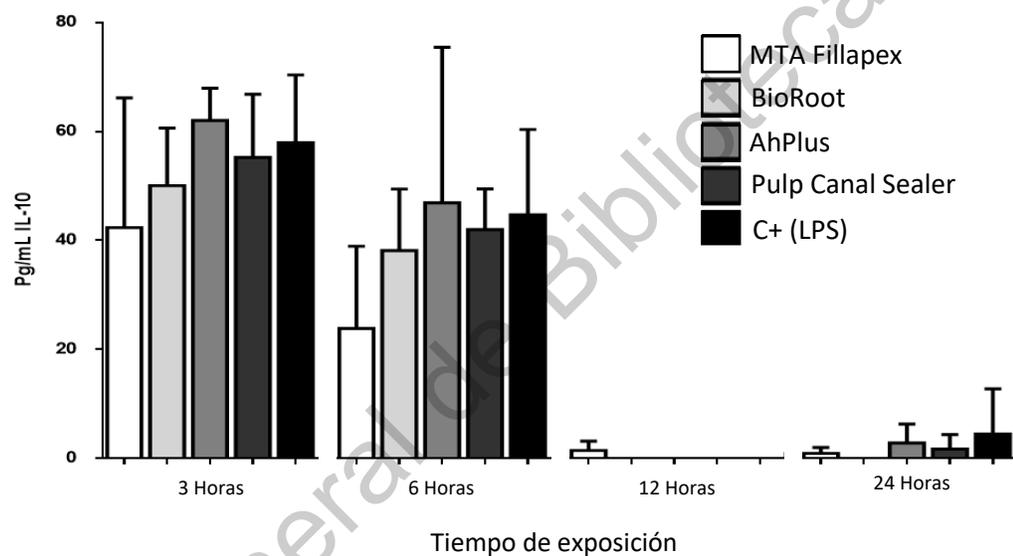
calidad, asepsia y antisepsia que garantizaron la seguridad del mismo. La información personal del paciente está protegida y se respeta la privacidad de la misma. Todos los desechos biológicos e infecto contagiosos derivados de esta investigación se desecharon en contenedores adecuados para ese fin.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## VII. RESULTADOS

En la gráfica 1 se muestra la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de las células estimuladas con los diferentes cementos selladores en los cuatro distintos tiempos experimentales.

Gráfica 1. Comparación de la concentración de IL-10 inducida por la exposición a los eluidos de los 4 cementos selladores.



No existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar la concentración de la interleucina producida por los diferentes materiales y el LPS a las tres horas. Tampoco se encontró significancia estadística al comparar la concentración detectada a las 6, 12 ni 24 horas.

Se puede observar que en todos los cementos evaluados, incluido en el control, existió una mayor producción de IL-10 a las tres horas de exposición, esta concentración disminuyó notablemente a las 6 horas, no siendo estadísticamente significativa en ninguno de los casos.

Para las 12 y 24 horas la disminución fue notoria para todos los casos. Tanto a las 12 horas como 24 horas si se observa una disminución estadísticamente significativa en todos los casos, siendo en varios de ellos indetectable la concentración de la citocina de interés.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## VIII. DISCUSIÓN

Los cementos selladores son utilizados con frecuencia en la práctica endodóntica al momento de realizar el sellado hermético del sistema de conductos radicular. El éxito se basa, en parte, en la capacidad de obturación del sistema sellador para bloquear la filtración de bacterias y subproductos bacterianos y así evitar el acceso al periapice (Williamson *et al.*, 2005). De manera inadvertida estos materiales o sus eluidos pueden llegar a estar en contacto con los tejidos perirradiculares. La respuesta tisular ante algunos componentes del cemento sellador, puede desencadenar la producción y liberación de citocinas (Brackett *et al.*, 2009; Covo Morales *et al.*, 2016).

Las reacciones inflamatorias no controladas, por causa de la extrusión del material de obturación del conducto a la zona periapical, es una complicación frecuente durante el tratamiento del conducto radicular (Yamaguchi y Matsunaga, 2007). Por ello, se han realizado múltiples investigaciones con el fin de conocer la interacción entre los diferentes tipos de cementos selladores y la respuesta por parte del huésped. Estos estudios han llevado, a lo largo del tiempo, a crear diferentes tipos de cementos selladores y realizar modificaciones en los mismos para mejorar sus características y propiedades, y así brindar un mejor pronóstico.

Un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Brackett *et al.* (2009) el cual trabajó con monocitos debido a su importante papel central en la dirección de procesos inflamatorios para la curación apropiada o la inflamación destructiva. El efecto de los selladores endodónticos en la función monocítica es importante, ya que las respuestas inflamatorias aberrantes, suprimidas o innecesarias impiden la curación periapical.

Es por tanto importante conocer los efectos biológicos y químicos que los materiales dentales tienen sobre las células (Kamalak *et al.*, 2018). Para el presente estudio se eligió evaluar la IL-10, ya que, induce la homeostasis tisular, es capaz de regular la actividad de las células inflamatorias (linfocitos y monocitos) y la curación

de heridas (fibroblastos); conduce a la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias por las células T y los macrófagos activados por IL-10 (Beucken *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2014), además, su producción se asocia con la síntesis de colágeno y la proliferación celular (Kawashima y Stashenko, 1999).

Con el fin de proveer más información de la interacción entre los cementos selladores y la respuesta del huésped, esta investigación fue diseñada para conocer el efecto de diferentes cementos selladores (BioRoot RCS, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer y Ah Plus) en células mononucleares humanas mediante la producción de IL-10.

Los resultados del presente estudio evidencian que a las 3 y 6 horas el cemento MTA Fillapex estimulo en menor grado la producción de IL-10. Sin embargo, fue el único que siguió estimulando a las 12 horas y 24 horas, esto en concordancia con estudios previos donde al estar en contacto con este material se estimulaba una mayor producción de IL-10 (Huang *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2014). Por otra parte, Bósio *et al.* (2014) mencionan en su estudio que aunque no hubo una diferencia significativa entre el grupo MTA Fillapex con los demás grupos, se observó una reacción inflamatoria que no se atenuaba con el tiempo.

Además, Vouzara *et al.* (2018) con base a lo observado en su estudio, menciona estar de acuerdo con investigaciones recientes en cuanto a una citotoxicidad por parte de MTA Fillapex similar o menor que otros selladores a base de resina, pero, más citotóxico que otros selladores a base de silicato.

La citotoxicidad demostrada por el MTA Fillapex puede ser consecuencia de los componentes de resina como es el salicilato presente en su composición (Eldeniz *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2018 b).

Por otra parte, el Ah Plus ha ganado popularidad a pesar de su bien documentada toxicidad y mutagenicidad (Azar *et al.*, 2000). En el presente estudio se observó que el cemento Ah Plus estimulo en mayor grado la producción de IL-10 a las 3 y 6 horas en comparación con los demás grupos. Estos resultados están en

concordancia con el estudio de Tavares *et al.* (2017) donde observo que el Ah Plus fue el que estimuló en mayor proporción en comparación con los otros cementos selladores de todos evaluados, produciendo una inflamación moderada, aunque sin diferencia significativa del resto de los grupos.

En el estudio de Silva-Herzog *et al.* (2011), el cemento Ah Plus registró una respuesta tisular severa, siendo el punto de irritación en la fase temprana de la evaluación y disminuyendo con el tiempo.

Silva *et al.* (2012) mencionan en su estudio que el Ah Plus causó efectos citotóxicos cuando se usó de manera indirecta, aunque todos los materiales mostraron algunos efectos citotóxicos; de igual manera, Jung *et al.* (2018 a) confirma la citotoxicidad de Ah Plus en su estudio con base en sus resultados.

Esto se puede deber, a que los materiales a base de resina continúan liberando cantidades mensurables de componentes del composite durante períodos de 24 horas, aunque la velocidad de liberación disminuye con el tiempo (Issa *et al.*, 2004).

En cambio, los resultados del estudio de Al-Hiyasat *et al.* (2010) muestran que los eluidos de todos los materiales estudiados eran citotóxicos, observando la menor toxicidad con el eluido del cemento Ah Plus.

El cemento sellador BioRoot RCS fue el cemento que estimuló en menor grado la producción de IL-10, solo superado por el MTA Fillapex. En el estudio de Jung *et al.* (2018 a) realizado en células de ligamento periodontal humano, se concluyó que el BioRoot RCS no fue citotóxico, tuvo una influencia positiva en el metabolismo celular y fue bioactivo. Sin embargo, en otro estudio realizado por Jung *et al.* (2018 b) en osteoblastos humanos, concluyeron que el cemento BioRoot RCS tuvo una influencia positiva en el metabolismo celular y fue ligeramente citotóxico.

Collado-González *et al.* (2017), reportaron que el BioRoot RCS presenta una excelente citocompatibilidad en términos de proliferación celular, viabilidad celular y migración celular. En un estudio *in vitro* en células madre de pulpa de ratón,

Dimitrova-Nakov *et al.* (2015) concluyeron que el BioRoot RCS no era citotóxico y preservaba las propiedades intrínsecas osteo-odontogénicas de las células madre derivadas de la pulpa.

Camps *et al.* (2015), concluyeron en su estudio que el cemento de silicato tricálcico, BioRoot RCS, es menos tóxico para las células del ligamento periodontal que Pulp Canal Sealer y potencialmente bioactivo.

Alsubait *et al.* (2018) concluyeron que los eluidos de los selladores BioRoot RCS y Endosequence BC son menos tóxicos para las células mesenquimales humanas en comparación con AH Plus. Sin embargo, a concentraciones más altas, BioRoot RCS tenía menos citocompatibilidad que Endosequence BC.

A partir de los resultados obtenidos con el cemento sellador BioRoot RCS, nuestra hipótesis queda rechazada debido a que no fue el cemento que estimuló en menor grado a las células mononucleares humanas a producir IL-10 en comparación con los demás cementos selladores, durante todos los tiempos evaluados.

Los selladores a base de óxido de zinc eugenol (ZOE) se han utilizado durante muchos años, pero liberan concentraciones de eugenol potencialmente citotóxicas (Lindqvist y Otteskog, 1980). El eugenol liberado puede participar en el desarrollo de inflamación periapical o la continuación de una lesión periapical preexistente (Ho *et al.*, 2006).

La inducción de respuestas inflamatorias del tejido apical después de la obturación con un sellador a base de ZOE puede deberse a la citotoxicidad (Chang *et al.*, 2010).

Los resultados del presente estudio muestran que el cemento sellador Pulp Canal Sealer, a base de ZOE, estimuló en mayor grado la producción de IL-10, solo superado por el BioRoot RCS.

Camps *et al.* (2015) mostraron una mayor toxicidad con Pulp Canal Sealer en comparación con BioRoot RCS, la disminución continua de células humanas del ligamento periodontal observada con Pulp Canal Sealer después de un tiempo prolongado confirma su toxicidad.

Siboni *et al.* (2017) mencionan que el Pulp Canal Sealer indujo la muerte celular incluso en presencia de una pequeña cantidad.

Una posible explicación para los resultados obtenidos en este estudio, con el Pulp Canal Sealer, es lo mencionado en el estudio de Brackett *et al.* (2009) donde el Pulp Canal Sealer suprimió significativamente la actividad mitocondrial de los monocitos, incluso después de 12 horas, además, mostró que incluso con una marcada supresión de la actividad mitocondrial, era posible un cambio en las respuestas de las citocinas.

Es preciso señalar que, en este estudio, el análisis *in vitro* se realizó con eluidos de cementos selladores aún en estado fresco. En nuestros resultados se observa que cada grupo presentó una mayor producción de IL-10 a las 3 y 6 horas significativamente mayor a la observadas a las 12 y 24 horas. Jung *et al.* (2018 a, b) concluyeron en su estudio, que Ah Plus era citotóxico en un estado recién mezclado, pero no cuando estaba fraguado, al igual que MTA Fillapex y Pulp Canal Sealer fueron citotóxicos tanto en estado fresco como fraguado y BioRoot RCS mostró la toxicidad más baja en ambos estados.

Por otra parte, se puede observar un ligero incremento de la producción de IL-10 a las 24 horas en cada grupo. Hahn y Liewehr (2007) mencionan que esta se reduce generalmente en la fase inicial y aumenta en la fase crónica tardía de la respuesta inmune.

La IL-10 puede desempeñar un papel relevante en la cicatrización de heridas al disminuir la respuesta inflamatoria después de una lesión pulpar (Williamson *et al.*, 2005). La evaluación de esta citocina nos permite tener un precedente de la respuesta inflamatoria, así como su relación con la

biocompatibilidad y la citotoxicidad, sin embargo, es importante mencionar que este estudio se realizó de manera *in vitro* y se enfocó en una sola citocina, considerando que para tener un conocimiento más amplio y fiable de la interacción entre los cementos selladores y la respuesta del huésped se deben evaluar otros parámetros.

Algunos estudios han mencionado que la IL-10 retrasa el desarrollo de periodontitis apical, esto sugiere que los investigadores deben desarrollar regímenes terapéuticos que puedan regular negativamente la respuesta proinflamatoria y aumentar la respuesta antiinflamatoria (Araujo-Pires *et al.*, 2014; Azuma *et al.*, 2018).

Dirección General de Bibliotecas UAG

## IX. CONCLUSIONES

El presente estudio *in vitro* mostró que todos los cementos selladores evaluados, estimularon la producción de interleucina IL-10, sobre todo durante las primeras horas de exposición y con un notable decremento al paso del tiempo. Después de 12 horas de exposición, la concentración de la citocina disminuye al grado de ser indetectable en varios de los casos.

La respuesta inflamatoria es necesaria para la defensa del huésped y aunque la producción de citocinas proinflamatorias es benéfica en un inicio, la sobreproducción de las mismas puede ser perjudicial. Por el contrario, teniendo la IL-10 un rol importante en limitar la inflamación y siendo un marcador para iniciar el proceso de reparación y remodelación, se piensa que su producción estimulada por estos materiales es benéfica, ya que podría jugar un papel importante en prevenir y/o limitar el desarrollo de lesiones periapicales. Se requiere más estudios que contemplen otras citocinas, otras líneas celulares y otros tiempos experimentales para poder entender la influencia de estos materiales en este sistema complejo en donde muchas variables están involucradas.

## X. PROPUESTAS

Se recomienda realizar más estudios que incluyan más citocinas a evaluar, hay controversia de los resultados obtenidos en estudios *in vitro* por su traspolación al área clínica, por ello se debería considerar la realización de la evaluación de la expresión de citocinas mediante un estudio *in vivo*.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Khatib, Z. Z., Baum, R. H., Morse, D. R., Yesilsoy, C., Bhambhani, S., and M. L. Furst. 1990. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Or. Surg. Or. Med. Or. Pa.* 70(6).784–790.
- Al- Hiyasat, A. S., Tayyar, M, and H. Darmani. 2010. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int. Endod. J.* 43(2).148–153.
- Almeida, J. F. A., Ferraz, C. C. R., Gomes, B. P. F. A, and A. A. Zaia. 2012. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int. Endod. J.* 49–56.
- Alsubait, S., Al Ajlan, R., Mitwalli, H., Aburaisi, N., Mahmood, A., Muthurangan, M. and S. Anil. 2018. Cytotoxicity of Different Concentrations of Three Root Canal Sealers on Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomolecules.* 8(3). 68.
- Andrade, A. S., Silva, G. F., Camilleri, J., Cerri, E. S., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Cerri, P. S, and M. Tanomaru-Filho. 2018. Tissue Response and Immunoexpression of Interleukin 6 Promoted by Tricalcium Silicate–based Repair Materials after Subcutaneous Implantation in Rats. *J. Endod.* 44(3).458–463.
- Araujo-Pires, A. C., Francisconi, C. F., Biguetti, C. C., Cavalla, F., Aranha, A. M. F., Letra, A, and G.P. Garlet. 2014. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J. Appl. Oral Sci.* 22(4).336–346.
- Arias-Moliz, M. T, and J. Camilleri. 2016. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *J. Dent.* 52.30–36.
- Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M, and C. Sasakawa. 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 195(6).931–942.
- Azar, N. G., Heidari, M., Bahrami, Z. S, and F. Shokri. 2000. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J. Endod.* 26(8). 462–465.

- Azuma, M. M., Gomes-Filho, J. E., Ervolino, E., Cardoso, C. de B. M., Pipa, C. B., Kawai, T., and L. T. A. Cintra. 2018. Omega-3 Fatty Acids Reduce Inflammation in Rat Apical Periodontitis. *J. Endod.* 44(4).604–608.
- Bazzoni, F., Tamassia, N., Rossato, M., and M. A. Cassatella. 2010. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40(9).2360–2368.
- Beucken, J. J. J. P. Van Den, Walboomers, X. F., Vos, M. R. J., and N. A. J. M. Sommerdijk. 2006. Macrophage behavior on multilayered DNA-coatings in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 3–11.
- Bin, C. V., Valera, M. C., Camargo, S. E. A., Rabelo, S. B., Silva, G. O., Balducci, I., and C. H. R. Camargo. 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J. Endod.* 38(4).495–500.
- Bıçakcı, H., Çapar, İ. D., Genç, S., İhtiyar, A., and R. Sütçü. 2016. Influence of Rotary Instrumentation with Continuous Irrigation on Pain and Neuropeptide Release Levels: A Randomized Clinical Trial. *J. Endod.* 42(11).1613–1619.
- Bjerre, L., Bünger, C. E., Kassem, M., and T. Mygind. (2008). Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials.* 29(17).2616–2627.
- Bósio, C. C., Felipe, G. S., Bortoluzzi, E. A., Felipe, M. C. S., Felipe, W. T., and E. R. C. Rivero. 2014. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int. Endod. J.* 47(7).667–674.
- Brackett, M. G., Marshall, A., Lockwood, P. E., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Bouillaguet, S., and J. C. Wataha. 2009. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 91(2).839–844.
- Braga, J. M., Oliveira, R. R., Martins, R. C., 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. *Int. Endod J.* 47(10).909–919.

- Branstetter, J, and J. A. Von Fraunhofer. 1982. The physical properties and sealing action of endodontic sealer cements: a review of the literature. *J. Endod.* 8(7).312–316.
- Cai, J., Zhang, W., Yang, P., Wang, Y., Li, M., Zhang, C, and Q. Li. 2015. Identification of a 6-cytokine prognostic signature in patients with primary glioblastoma harboring M2 microglia/macrophage phenotype relevance. *PLoS One*, 10(5).
- Camps, J., Jeanneau, C., El Ayachi, I., Laurent, P, and I. About. 2015. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J. Endod.* 41(9).1469–1473.
- Chang, M. C., Lin, L. D., Chen, Y. J., Tsai, Y. L., Cheng, Y. A., Kuo, C. S, and J. H. Jeng. 2010. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int. Endod. J.* 43(3). 251–257.
- Chang, S. W., Lee, S. Y., Kang, S. K., Kum, K. Y., and E.C. 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. *J. Endod.* 40(10).1642–1648.
- Cohen, S, and R.C. Burns. 2002. Pathways of the pulp 8th ed. *St Louis Mosby*, 2.
- 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. *Int. Endod. J.* 50(9). 875–84.
- Covo Morales, E., Díaz Caballero, A, and L. Padilla Correales, L. 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.
- de Oliveira Mendes, S. T., de Brito, L. C. N., Rezende, T. M. B., de Oliveira Reis, R., Cardoso, F. P., Vieira, L. Q, and A. P. Ribeiro Sobrinho. 2010. A decrease in the innate immune response to infection in the presence of root canal sealers. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 109(2).315–323.

- De Rossi, A., Rocha, L. B., and M. A. Rossi. 2008. Interferon-gamma, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Chemokine Receptor 5, but not Interleukin-4, Attenuate the Development of Periapical Lesions. *J. Endod.* 34(1).31–38.
- Dimitrova-Nakov, S., Uzunoglu, E., Ardila-Osorio, H., Baudry, A., Richard, G., Kellermann, O, and M. Goldberg. 2015. In vitro bioactivity of Bioroot™ RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. *Dent. Mater.* 31(11).1290–1297.
- Diomedea, F., Caputi, S., Merciaro, I., Frisone, S., D'Arcangelo, C., Piattelli, A, and O.Trubiani. 2014. Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *Int. Endod. J.* 47(9).864–872.
- Eldeniz, A. U., Shehata, M., Högg, C, and F. X Reichl. 2016. DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. *Int. Endod. J.* 49(12).1141–1151.
- Elsalhy, M., Azizieh, F, and R. Raghupathy. 2013. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int. Endod. J.* 46(6).573–580.
- Flores, D. S. H., Rached-Júnior, F. J. A., Versiani, M. A., Guedes, D. F. C., Sousa-Neto, M. D, and J. D. Pécora. 2011. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int. Endod. J.* 44(2).126–135.
- Gandolfi, M. G., Parrilli, A. P., Fini, M., Prati, C, and P. M. H. Dummer. 2013. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with T hermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int. Endod. J.* 46(3).253–263.
- Gandolfi, M. G., Siboni, F., Botero, T., Bossù, M., Riccitiello, F, and C. Prati. 2015. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J. App. Biomater. Funct Mater.* 13(1).43–60.
- Gandolfi, M. G., Siboni, F, and C. Prati. 2016. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 32(5).113–126.
- Garc, D. 2017. Biocompatibility of three new calcium silicate- based endodontic

- sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int. Endod. J.* 875–884.
- Gilles, R, and M. Oliver. 2012. Dental material. Patent No. US 0270184 A1.
- Gomes-Filho, J. E., Watanabe, S., Gomes, A. C., Faria, M. D., Lodi, C. S, and S. H. Penha Oliveira. 2009. Evaluation of the Effects of Endodontic Materials on Fibroblast Viability and Cytokine Production. *J Endod.* 35(11).1577–1579.
- Grossman, L. I. 1976. Physical properties of root canal cements. *J. Endod.* 2(6). 166–175.
- Hahn, C. Lo, and F. R. Liewehr. 2007. Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. *J. Endod.* 33(7).773–781.
- Ho, Y., Huang, F, and Y. Chang. 2006. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int. Endod. J.* 39(5).389–393.
- Holland, G. R. 1994. A histological comparison of periapical inflammatory and neural responses to two endodontic sealers in the ferret. *Arch. Oral. Biol.* 39(7).539–544.
- Huang, F., Tai, K., Chou, M, and Y. Chang. 2002. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide–eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.*35(2).153–158.
- Huang, T. H., Yang, C. C., Ding, S. J., Yeng, M., Kao, C. T, and M. Y. Chou. 2005. Inflammatory Cytokines Reaction Elicited by Root-End Filling Materials. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 73(1)123–8
- Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M, and A. J. Duxbury. 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent. Mater.* 20(1).12–20.
- Jung, S., Libricht, V., Sielker, S., Hanisch, M. R., Schäfer, E, and T. Dammaschke. 2018 a. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. *Odontology.* 107(1).54-63.
- Jung, S., Sielker, S., Hanisch, M. R., Libricht, V., Schäfer, E, and T. Dammaschke. 2018 b. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PLoS ONE.* 13(3).1–14.
- Kamalak, H., Kamalak, A., Taghizadehghalehjoughi, A., Hacımüftüoğlu, A, and K.

- Alp 2018. Cytotoxic and biological effects of bulk fill composites on rat cortical neuron cells. *Odontology*. 106(4).377-388.
- Kawashima, N, and P. Stashenko. 1999. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch. Oral Biol.* 44(1).55–66.
- Kenneth M. H., Louis H. B, and S. Cohen. 2011. Cohen Vias De La Pulpa.
- Laidlaw, B. J., Cui, W., Amezcua, R. A., Gray, S. M., Guan, T., Lu, Y, and S. M. Kaech. 2015. Production of IL-10 by CD4 + regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* 16(8).871–879.
- Lindqvist, L., and P. E. R. Otteskog. 1980. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Eur. J. Oral. Sci.* 88(6).552–556.
- Liu, D., Yao, S, and G. E. Wise. 2006. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur. J. Oral. Sci.* 114(1).42–49.
- Lü, W. L., Wang, N., Gao, P., Li, C. Y., Zhao, H. S, and Z. T. Zhang. 2015. Effects of anodic titanium dioxide nanotubes of different diameters on macrophage secretion and expression of cytokines and chemokines. *Cell. Prolif.* 48(1).95–104.
- Markowitz, K., Moynihan, M., Kim, S, and C. N. York. 1992. Biologic properties of eugenol and zinc. *Or. Surg. Or. Med. Or. Pa.* 73.729-37.
- Martinez, Z. R. A., Naruishi, K., Yamashiro, K., Myokai, F., Yamada, T., Matsuura, K, and Y. Abiko. 2007. Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *J. Endod.* 33(8).936–943.
- Matsuzaki, E., Anan, H, and N. Matsumoto. 2016. Immunopathology of Apical Periodontitis and Refractory Cases. *J. Tissue. Sci. Eng.* 07(03).3–7.
- Menezes, R., Garlet, T. P., Trombone, A. P. F., Repeke, C. E., Letra, A., Granjeiro, J. M, and G. P. Garlet. 2008. The Potential Role of Suppressors of Cytokine Signaling in the Attenuation of Inflammatory Reaction and Alveolar Bone Loss Associated with Apical Periodontitis. *J. Endod.* 34(12).1480–1484.

- Moreira, J. V. 2010. Avaliação in vitro da infiltração apical dos cimentos endodônticos: MTA Fillapex, Endo-CPM-Sealer e Sealapex.
- Morgental, R. D., Vier-Pelisser, F. V., Oliveira, S. D. de, Antunes, F. C., Cogo, D. M, and P. M. Kopper. 2011. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int. Endod. J.* 44(12).1128–1133.
- Mosser, D. M., and X. Zhang. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 226(1).205–218.
- Ørstavik, D. A. G. 2005. Materials used for root canal obturation: technical , biological and clinical testing. *Endod. Topics.* 3.25–38.
- Parolia, A. 2015. Role of Cytokines, Endotoxins (LPS), and Lipoteichoic Acid (LTA) in Endodontic Infection. *J. Dent. Oral. Disord. Ther* 2(4).01–05.
- Perlmann, P., Engvall, E, and Elisa, A. 1971. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay ( ELISA ). *Protides of the biological fluids.*
- Plus, A. H., New Delivery, Film Thickness, Flow Behaviour and Study li. 2005. Introduction, Description of the AH Plus System, Properties of the Material.
- Proust, J., and P. C. Sealer. 1985. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Or. Surg. Or. Med. Or. Path.* 73(5).613-20.
- Russell, A. 2009. Bioceramic technology – the game changer in endodontics. *Endod. Prac.* April.13–17.
- Salles, L. P., Gomes-Cornélio, A. L., Guimarães, F. C., Herrera, B. S., Bao, S. N., Rossa-Junior, C, and M. Tanomaru-Filho. 2012. Mineral trioxide aggregate–based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J. Endod.* 38(7).971–976.
- Schmidt-Bleek, K., Kwee, B. J., Mooney, D. J, and G. N. Duda. 2015. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue. Eng. Part B Rev.* 21(4).354–364.
- Sealer, E. 2011. Mta Fillapex.
- Sette-Dias, A. C., Maciel, K. F., Abdo, E. N., Brito, L. C. N., Carvalho, M. A. R., Vieira, L. Q, and P. P. Magalhães. 2016. Cytokine Expression in Patients Hospitalized

- for Severe Odontogenic Infection in Brazil. *J. Endod.* 42(5).706–710.
- Siboni, F. 2017. Properties of BioRoot RCS , a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J.* 50.120–136.
- Silva-Herzog, D., Ramirez, T., Mora, J., Pozos, A. J., Silva, L. A. B., Silva, R. A. B., and P. Nelson-Filho. 2011. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int. Endod J.* 44(5).440–446.
- Silva, M. J. B., Vieira, L. Q, and A. P. R. Sobrinho. 2008. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral Radiol Endod.* 105(5).70–76.
- Silva, E. J. N. L., D. R. Herrera., J. F. A. Almeida., C. C. R. Ferraz., B. P. F. A. Gomes., and A. A. Zaia. 2012. Evaluation of Cytotoxicity and Up-Regulation of Gelatinases in Fibroblast Cells by Three Root Repair Materials. *Int. Endod. J.* 45(9): 815–20.
- Souza, G. L., Rosatto, C. M. P., Silva, M. J. B., Silva, M. V., Rocha Rodrigues, D. B, and C. C. G. Moura. 2019. Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. *Int. Endod. J.* 52(5).629–638.
- Tavares, L., Cintra, A., Benetti, F., Olinta, I., Queiroz, D. A., Ferreira, L. L, and P. De. Oliveira. 2017. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy – based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. *J. Endod.* 43(12).1–5.
- Torabinejad, M., Watson, T. F, and T. R. P. Ford. 1993. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate When Used As a Root End Filling Material. *J. Endod.* 19(12). 591–595.
- Van Der Waal, S. V., Lappin, D. F, and W. Crielaard. 2015. Does apical periodontitis have systemic consequences? the need for well-planned and carefully conducted clinical studies. *Br Dent J.* 218(9).513–516.
- Van Landuyt, K. L., Geebelen, B., Shehata, M., Furche, S. L., Durner, J., Van Meerbeek, B, and F. X. Reichl. 2012. No evidence for DNA double-strand

- breaks caused by endodontic sealers. *J. Endod.* 38(5).636–641.
- Viapiana, R., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M, and J. 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. *J. Endod.* 40(4).555–561.
- Vitti, R. P., Prati, C., Silva, E. J. N. L., Sinhoreti, M. A. C., Zanchi, C. H., e Silva, M. G. de S, and M. G. Gandolfi. 2013. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J. Endod.* 39(7).915–918.
- Vouzara, T., Dimosiari, G., Koulaouzidou, E. A, and N. Economides. 2018. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J, Endod.* 44(5).849–852.
- Williamson, A. E., Dawson, D. V., Drake, D. R., Walton, R. E, and E. M. Rivera. 2005. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: A coronal leakage evaluation. *J. Endod.* 31(8).599–604.
- Wilson, A. D., Clinton, D. J, and R. P. Miller. 1973. Zinc oxide-eugenol cements: IV. Microstructure and hydrolysis. *J. Dent. Res.* 52(2).253–260.
- Yamaguchi, K., and T. Matsunaga. 2007. Gross extrusion of endodontic obturation materials into the maxillary sinus : a case report. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 120.131–134.
- Zhou, H., Shen, Y., Zheng, W., Li, L, and Y. Zheng. 2013. Physical Properties of 5 Root Canal Sealers. *J Endod.* 39(10).1281–1286.