



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Especialidad en Endodoncia

“CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- $\alpha$  PRODUCIDA POR CÉLULAS  
MONONUCLEARES HUMANAS ESTIMULADAS POR CEMENTOS SELLADORES  
ENDODÓNTICOS”

**Tesis**

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

**Presenta:**

Lic. En Odont. Gabriela Hernández Valdez

**Dirigido por:**

C.D.E.E María Yolanda Elisa López Gómez

**Co-dirigido por:**

M. en C. María Laura González Dávalos

C.D.E.E María Yolanda Elisa López Gómez  
Presidente

\_\_\_\_\_

M. en C. María Laura González Dávalos  
Secretaria

\_\_\_\_\_

C.D.E.E Miguel Ángel Almanza Vega  
Vocal

\_\_\_\_\_

D. en C. Rosa Martha Pérez Serrano  
Suplente

\_\_\_\_\_

D. en C.E.E. Rubén A. Domínguez Pérez  
Suplente

\_\_\_\_\_

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Mayo 2020  
México

## RESUMEN

**Introducción:** La endodoncia tiene el objetivo de prevenir y curar la periodontitis apical, por medio de la limpieza, conformación y obturación de los conductos radiculares. Los cementos selladores independiente de su composición química, además de ser biocompatibles, deben estimular una mínima respuesta inmuno-inflamatoria para evitar complicaciones postoperatorias como dolor y retraso en la cicatrización de lesiones periapicales, relacionado con la producción de citocinas pro-inflamatorias a cargo de las células mononucleares. **Objetivo:** Determinar la concentración de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) producida por células mononucleares humanas estimuladas con los eluidos de los cementos selladores endodónticos, Pulp Canal Sealer, AH Plus, Bio Root RCS y MTA Fillapex. **Material y métodos:** Estudio experimental *in vitro* con células mononucleares humanas estimuladas a las 3, 6, 12 y 24 horas con eluidos obtenidos de los diferentes cementos selladores endodónticos, evaluando las concentraciones mediante Kit comercial ELISA. **Resultados:** Existieron diferencias al comparar la concentración del TNF- $\alpha$  producida a las 3, 6 y 12 horas, no así para el periodo de 12 y 24 horas. En el caso de los cuatro cementos selladores endodónticos probados, no existieron diferencias entre ellos. Todos los eluidos de los cementos selladores estimularon producción de citocinas sin diferencias marcadas. **Conclusiones:** Los eluidos de cementos selladores endodónticos estudiados independiente a su composición química estimulan la producción TNF- $\alpha$  en células mononucleares humanas, registrando una producción mayor a las primeras horas.

(**Palabras clave:** Biocerámicos, TNF- $\alpha$ , cementos selladores, endodoncia)

## SUMMARY

**Introduction:** Endodontics has the objective of preventing and curing apical periodontitis, by cleaning, shaping and filling the root canals. The endodontic sealers independent of their chemical composition, in addition to being biocompatible, must present a minimal immunoinflammatory response to avoid postoperative complications such as pain and delayed healing of periapical lesions, related to cytokine expression pro-inflammatory mediated by mononuclear cells. **Objective:** To determine the concentration of TNF- $\alpha$  produced by human mononuclear cells stimulated with eluates from endodontic sealers cements, Pulp Canal Sealer, AH Plus, Bio Root RCS and MTA Fillapex. **Material and methods:** In vitro experimental study with human mononuclear cells stimulated at 3, 6, 12 and 24 hours with eluates obtained from the different endodontic sealers, evaluating the concentrations using the commercial ELISA kit. **Results:** There were statistically significant differences when comparing the concentration of TNF- $\alpha$  produced at 3, 6 and 12 hours, however from 12 to 24 hours they were not significant. All eluates from the endodontic sealers stimulated cytokine production without statistically significant difference. **Conclusions:** The eluates of endodontic sealers studied independently of their chemical composition stimulate TNF- $\alpha$  production in human mononuclear cells, presenting a higher production in the first hours.

**Key words:** Bioceramics, TNF- $\alpha$ , endodontic sealers, endodontics.

## DEDICATORIA

Lo dedico a Dios por ser inspiración y amor.

Lo dedico a mi familia por su apoyo y amor brindado cada día, son mi pilar.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, a mis padres Ofelia Valdez e Ignacio Hernández, por su amor y apoyo incondicional en cada una de mis decisiones y proyectos, porque gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, son mi tesoro más grande. A mis hermanas Luz María y Verónica por su apoyo moral, por confiar en mí, por acompañarme en este camino profesional. También lo dedico a José Zarraga por su apoyo incondicional, por su amor y su paciencia. A todos les tengo un amor infinito.

Quiero expresar mi gratitud a los docentes del Posgrado de Endocrinología de la UAQ, por compartir sus conocimientos y apoyo. Al coordinador Santiago Andaracua, por ser un apoyo para todos los alumnos, a mi Directora de Tesis., Dra. María Yolanda E. López Gómez, por ser una amiga, por sus consejos y su apoyo en el desarrollo de este trabajo, así como a la Dra. Rosa Martha Pérez Serrano por su apoyo en este proyecto.

Agradezco al Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM en especial a la M. en C. María Laura González Dávalos por su apoyo en el desarrollo de mi investigación y Dra. Ofelia Mora Izaguirre 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 en la investigación.

Finalmente agradezco al Dr. Rubén A. Domínguez Pérez por su apoyo incondicional en este proyecto de Investigación, pero sobre todo por su apoyo en el posgrado, por su preocupación de nuestro desarrollo, crecimiento en todos los aspectos, porque inspira y tiene mi profundo respeto.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	i
<b>Summary</b>	ii
<b>Dedicatorias</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice</b>	v
<b>Índice de cuadros</b>	vi
<b>Abreviaturas y siglas</b>	vii
<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Antecedentes</b>	3
<b>III. Fundamentación teórica</b>	5
III.1 Obturación de los conductos radiculares	5
III.2 Cementos selladores	6
III.3 Interacción con tejidos periapicales	10
III.4 TNF- $\alpha$ en endodoncia	12
III.5 Ensayo de inmunoabsorción de enzimas (ELISA)	13
<b>IV. Hipótesis</b>	15
IV.1 Hipótesis de trabajo	15
IV.2 Hipótesis nula	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	17
VI.3 Tamaño de muestra	17
VI.3.1 Criterios de selección	17

VI.3.2 Variables estudiadas	18
VI.4 Procedimiento	20
VI.5 Análisis estadístico	25
VI.6. Consideraciones éticas	25
<b>VII. Resultados</b>	26
<b>VIII. Discusión</b>	27
<b>IX. Conclusiones</b>	30
<b>X. Propuestas</b>	31
<b>XI. Bibliografía</b>	32

### Índice de cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
VII.1	26

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

PMN	Polimorfonucleares
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF	Factor de necrosis tumoral
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-4	Interleucina 4
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTT	Ensayo de viabilidad celular
Células PDL	Células humanas del ligamento periodontal
LDH	Ensayo nivel de lactato deshidrogenasa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
LPS	Lipopolisácaridos
NK	Células Natural Killer
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
LPD	Lipopolisácaridos
PBS	Buffer fosfato salino
RPM	Revoluciones por minuto
CMN	Células mononucleares humanas
NaClO	Hipoclorito de Sodio
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
ABTS	Ensayo de decoloración con el radical catiónico
HOB	Osteoblastos humanos primarios
Monocitos THP1	Línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda.



## I. INTRODUCCIÓN

La endodoncia tiene como objetivo específico: curar y prevenir la periodontitis perirradicular, mediante la limpieza, conformación y obturación del sistema de los conductos radiculares (Kenneth y Louis, 2011; Ørstavik y Pitt Ford, 1998).

La inflamación es una respuesta de defensa del organismo destinado a destruir, diluir o evitar un agente ofensivo que conduce a la reparación de tejidos (Baumann y Gauldie, 1994). Los cementos selladores endodónticos pueden afectar los tejidos periapicales cuando se extruyen fuera del conducto radicular (Haji-Hassani *et al.*, 2015), en tal condición podrían causar no sólo la degeneración del tejido, si no también podrían retrasar la cicatrización de periodontitis apical y generar reacciones inflamatorias agudas en tejidos periapicales (Bernáth y Szabó, 2003; Tai *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos materiales dentales pueden modular la respuesta inflamatoria para iniciar los eventos regenerativos por la expresión de factor de crecimiento, la proliferación celular y frenar la migración de células para regenerar los tejidos perdidos (Giraud *et al.*, 2018; Lin y Rosenberg, 2011).

Varias composiciones químicas para cementos selladores endodónticos se han desarrollado y empleado con el propósito de lograr propiedades fisicoquímicas más deseables, así como la mejora de la biocompatibilidad con los tejidos periapicales (Al-Hiyasat *et al.*, 2010). Entre estos se incluyen materiales a base de Óxido de Zinc y Eugenol, Hidróxido de Calcio, resinas sintéticas, Ionómero de Vidrio, resinas polivinílicas, cementos de policarboxilatos, siliconas y más recientemente biocerámicos (José y Goldberg, 2002; Anusavice *et al.*, 2004; Kenneth y Louis, 2011).

El reclutamiento de células inflamatorias e inmunitarias y la liberación de mediadores proinflamatorios ocurre en la región periapical (de Brito *et al.*, 2012). Células como polimorfonucleares (PMN) y monocitos pueden provocar la progresión del sistema inmune del huésped por su capacidad para liberar mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas (Velard *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2013).

Las citocinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia la región de infección y lesión, favoreciendo la cicatrización apropiada de la herida, pero la

producción exacerbada de citocinas proinflamatorias a partir de la lesión puede manifestarse sistémicamente con una inestabilidad hemodinámica o con disturbios metabólicos. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) a niveles bajos, puede promover la cicatrización de heridas mediante la estimulación indirecta de inflamación y el aumento de los factores de crecimiento de macrófagos. Sin embargo, en concentraciones superiores, especialmente durante períodos prolongados de tiempo, el TNF- $\alpha$  tiene un efecto perjudicial sobre la curación (Barrientos *et al.*, 2008). En una revisión de la literatura, Vassali observó que el TNF puede actuar como un protector o un agente que daña, dependiendo de sinergismo con otras citocinas, la cantidad liberada y tiempo de exposición (Vassalli, 1992).

La cuantificación de la concentración de citocinas puede ser determinado por el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual es un método analítico cuantitativo que muestra reacciones antígeno-anticuerpo e identifica la presencia y concentración de moléculas en fluidos biológicos o celulares (Aydin, 2015).

La correlación entre los biomarcadores inflamatorios con características clínicas y radiográficas es de interés para el establecimiento del diagnóstico y tratamiento. Clínicamente, el dolor a percusión y el dolor a palpación son parámetros indicativos de la presencia de inflamación en los tejidos periapicales (Martinho *et al.*, 2012). La presencia de dolor a palpación se asoció positivamente con TNF- $\alpha$  e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), así mismo la presencia de un área radiolúcida en los tejidos periapicales es indicativa de destrucción ósea, un mayor tamaño de la destrucción ósea (> 3 mm) está relacionado con TNF- $\alpha$  y asociado negativamente con niveles más altos de Interleucina 4 (IL-4) (Martinho *et al.*, 2015).

Conocer cuál eluido de cemento sellador endodóntico (Pulp Canal Sealer, AH Plus, BioRoot RCS o MTA Fillapex), estimula una mayor o menor producción de citocinas como TNF- $\alpha$  en la respuesta inmuno-inflamatoria es de importancia clínica para el beneficio del paciente en el tratamiento de conductos radiculares, ya que con base a la composición química que cada uno presenta se seleccionará para la práctica clínica el mismo que confiera un equilibrio en sus reacciones inmuno-inflamatorias, reflejándose en la ausencia de dolor postoperatorio o favoreciendo la cicatrización en los tejidos periapicales.

## I. ANTECEDENTES

Recientemente en endodoncia, se han desarrollado nuevos tipos de selladores que contienen agregado de Trióxido Mineral (MTA) y Silicato de Calcio (BioRoot RCS, Iroot), lo que ha aumentado el interés en estudiarlos y compararlos con otros materiales.

Chang *et al.*, (2014) evaluaron la biocompatibilidad, respuesta inflamatoria y capacidad osteogénica de 4 cementos selladores; Sealapex (Sybron Kerr), AH Plus (Dentsply), MTA Fillapex (Angelus) y iRoot SP (BioCreamix Inc) en células humanas del ligamento periodontal (PDL). Utilizaron el ensayo de viabilidad celular (MTT) y el ensayo ELISA posterior a la exposición de los cementos selladores durante 3, 7 y 14 días. Concluyeron que MTA Fillapex e iRoot SP inducían una más baja concentración de mediadores inflamatorios y promovieron la diferenciación osteoblástica de células de ligamento periodontal en comparación con el cemento Sealapex y AH Plus.

Jung *et al.*, (2018a) evaluaron la biocompatibilidad de dos cementos selladores que contienen Silicato de Calcio (MTA-Fillapex y BioRoot-RCS) y selladores populares (Pulp Canal Sealer y AH Plus), en células PDL. Los selladores se mezclaron de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes y se aplicaron en moldes de silicona para homogenizar las muestras. Posteriormente, realizaron eluidos de cada cemento sellador a diferentes tiempos (24 horas, 7, 14, y 21 días), mismos que fueron añadidos a las células PDL, también fueron colocados recién mezclados para simular un escenario clínico real. La viabilidad de las células PDL se analizó por recuento celular, ensayo-MTT y tinción con la técnica “vivo/muerto”; la citotoxicidad fue determinada por el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) y se registraron los cambios celulares por la prueba de tinción Richardson. Los resultados mostraron que BioRoot-RCS fue biocompatible y bioactivo, ya que registró una influencia positiva sobre el metabolismo de las células PDL. En el caso del Pulp Canal Sealer y MTA-Fillapex no mostraron biocompatibilidad en contacto con las células PDL. El AH Plus recién mezclado fue el menos biocompatible en células PDL que en estado de fraguado.

Jung *et al.*, (2018b) evaluaron los efectos de citotoxicidad de los cementos selladores Pulp Canal Sealer, AH-Plus, BioRoot RCS, MTA-Fillapex expuestos a osteoblastos humanos, probando los cementos selladores a dos tiempos de trabajo, recién mezclados y completamente fraguados (eluidos). Se estimularon a los osteoblastos durante 24 horas, 7, 14 y 21 días. Concluyeron que AH plus presentó toxicidad únicamente recién mezclado pero no fraguado. Pulp canal Sealer y MTA Fillapex mostraron toxicidad en todos los tiempos y BioRoot RCS; no presentó indicio de citotoxicidad y se observaron indicios de regeneración celular y biocompatibilidad.

Alsubait *et al.*, (2018) realizaron una evaluación de citotoxicidad en células troncales mesenquimales de médula ósea de los selladores BioRoot RCS y Endosequence BC en comparación con el AH Plus. Los cementos selladores endodónticos se prepararon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, obteniendo eluidos y posteriormente expuestos ante los cultivos celulares. Se observó que la cantidad de células en AH Plus fue significativamente menor que el grupo control; Endosequence BC no tuvo diferencia con el grupo control y los cementos biocerámicos presentaron menor proliferación de células, así como menor nivel de toxicidad atribuyéndolo a su composición química.

En la investigación de Perassi *et al.*, (2004) utilizaron los cementos selladores endodónticos Endometasona y Sealapex, los cuales fueron preparados conforme a las instrucciones del fabricante y se almacenaron por 48 horas para permitir su fraguado. Se prepararon soluciones a diversas concentraciones (25, 50 y 100 mg/mL) utilizando esos materiales que fueron pulverizados y pesados en una balanza de precisión y diluidos en polietilenglicol. La cuantificación de TNF se realizó mediante el ensayo ELISA. De los cementos selladores utilizados el Endometasona causó una mayor liberación de TNF que Sealapex, concluyeron que entre mayor concentración de TNF liberado por la estimulación de cementos selladores endodónticos hay un mayor efecto citotóxico inmediato sobre el cultivo celular. Encontraron también que el Endometasona y Sealapex causaron una disminución de TNF al aumento de las concentraciones, lo que sugiere que los macrófagos en contacto con altas concentraciones de estos selladores liberan menos TNF, probablemente debido a un efecto de tolerancia inmunológica.

### III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La endodoncia es el campo de la odontología que estudia la morfología de la cavidad pulpar, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención y el tratamiento de alteraciones pulpares y de sus repercusiones sobre los tejidos periapicales (José y Goldberg, 2002; Ørstavik y Pitt Ford, 1998).

#### III.1 Obturación de los conductos radiculares

De los principales objetivos, la obturación del sistema de conductos radiculares, es evitar la infección o reinfección de los conductos radiculares tratados promoviendo la reparación de los tejidos periodontales y manteniendo estable las condiciones periapicales (Wolcott *et al.*, 1997; Siqueira, 2005; Bergenholtz *et al.*, 2011). De acuerdo con Laurichesse *et al.*, (1986), dentro de la obturación puede distinguirse un objetivo técnico y otro biológico:

El objetivo técnico consiste en rellenar de forma hermética la totalidad del sistema de conductos radiculares con un material que sea estable y que se mantenga de forma permanente, sin sobrepasar sus límites, es decir, sin alcanzar el periodonto (Laurichesse *et al.*, 1986).

El objetivo biológico se considera cuando los productos tóxicos no llegan al periápice, presentando condiciones apropiadas para mantener la integridad y/o lograr una reparación del tejido periapical. Los propios medios de defensa del organismo podrán, por lo general, eliminar las bacterias, componentes antigénicos y restos hísticos necróticos que se encuentren junto al ápice y completar la reparación (Laurichesse *et al.*, 1986).

Varios materiales han sido recomendados para la obturación; estos deben de presentar la mayor biocompatibilidad con los tejidos para promover una correcta reparación. Se clasifican en relación a sus propiedades físicas como sólidos y semisólidos o plásticos (Anusavice *et al.*, 2004).

Sólidos: El método más común de obturación hoy en día incluye gutapercha como material de núcleo (Grossman, 1976; Anusavice *et al.*, 2004; Garg y Garg, 2010; Willershausen *et al.*, 2011). La gutapercha es un material ampliamente utilizado debido a las propiedades que posee. Al ser un polímero cristalino, a temperatura ambiente, presenta un estado sólido, pero si se aumenta su temperatura esta se plastifica y se hace amorfo, lo cual permite acceso a espacios más pequeños. Su función inicial es la de ocupar la mayor cantidad de espacio dentro del conducto radicular para evitar la filtración de material indeseado. Cuenta con una radiopacidad aceptable, facilitando al operador distinguir zonas con un relleno deficiente (Tyagi *et al.*, 2013)

Semisólidos: Para la obturación del sistema de conductos radiculares además de la gutapercha, se utilizan cementos selladores que presentan un estado físico semisólido tras la mezcla de sus componentes obteniendo una pasta. El objetivo de los cementos es sellar la interfase existente entre el material núcleo de la obturación y las paredes dentinarias del conducto radicular, con la finalidad de conseguir una obturación del mismo en las 3 dimensiones del espacio, de forma hermética y estable (José y Goldberg, 2002; Lyon, 2001; Anusavice *et al.*, 2004).

### **III.2 Cementos selladores**

Los cementos selladores son los materiales que sirven para unir el material de núcleo entre sí y éste a la pared dentinaria (Grossman, 1976). Se encargan de cubrir y rellenar espacios inaccesibles al material de relleno principal, al igual que los espacios que quedan entre un cono de gutapercha, irregularidades del conducto radicular, los conductos laterales y accesorios, y los espacios que quedan entre las puntas de gutapercha usadas en la compactación lateral. Los cementos selladores actúan además como lubricantes durante el proceso de obturación (Kenneth y Louis, 2011; Tyagi *et al.*, 2013).

Grossman (1976) enumeró 11 requisitos que debe reunir un cemento sellador óptimo de conductos radiculares, a los que Ingle y West (1994) añadieron dos más. Pueden citarse, por tanto, los siguientes requisitos:

1. Debe ser pegajoso, una vez mezclado, para adherirse tanto al material de núcleo como a las paredes de la dentina.
2. Ha de proporcionar un sellado hermético a los conductos radiculares obturados.
3. Conviene que sea suficientemente radiopaco para poder visualizarse en las radiografías.
4. Las partículas del cemento deben ser muy finas para poder mezclarse bien con el líquido.
5. No debe contraerse al endurecer o fraguar.
6. Es conveniente que no tiña los tejidos dentales.
7. Debe ser bacteriostático.
8. Debe fraguar con suficiente lentitud, para poder realizar la técnica de obturación con los ajustes necesarios.
9. Ha de ser insoluble en los fluidos hísticos.
10. Debe ser biocompatible, es decir, bien tolerado por los tejidos vitales.
11. Tiene que poder solubilizarse en los solventes habituales, para poder eliminarlo de los conductos radiculares si fuera necesario (Grossman, 1976).
12. No ha de generar una reacción inmunitaria al ponerse en contacto con el tejido periapical.
13. No debe ser mutagénico, ni carcinogénico. (Ingle *et al.*, 1994)

#### Tipos cementos selladores

El grado de citotoxicidad de los cementos selladores depende de la composición química y de las propiedades físicas de los mismos (Zimmerman *et al.*, 1989) por lo tanto, la elección del cemento sellador puede estar directamente relacionada con el pronóstico del tratamiento endodóntico (José y Goldberg, 2002; Anusavice *et al.*, 2004; Kenneth y Louis, 2011).

#### Óxido de zinc y eugenol

Rickert y Dixon (1931) introdujeron uno de los primeros cementos selladores con Óxido de Zinc Eugenol, estos han dominado los últimos 70 a 80 años.

Nombres comerciales como, Pulp Canal Sealer (Kerr, Scafati, Italia) contiene en polvo: Óxido de Zinc (sin arsénico) 34%, Plata (molecular) 25%, Oleorresinas 30% y Yoduro de timol 11%, y en líquido: Aceite de clavo de olor 78% y Bálsamo de Canadá 22% (Biven *et al.*, 1972).

Estos cementos selladores presentan varias consecuencias como la reabsorción si pasan a los tejidos periapicales (Augsburger y Peters, 1990), un tiempo de fraguado largo, se contraen al fraguar, se pueden disolver (Kazemi *et al.*, 1993; Peters, 1986) y pueden teñir la estructura dental (Van der Burgt *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 2002). Una ventaja de los cementos selladores de este grupo es su actividad antimicrobiana (Barkhordar, 1989; Al-Khatib *et al.*, 1990; Heling y Chandler, 1996; Mickel *et al.*, 2003), pero también exhibirán cierta toxicidad cuando se coloca directamente sobre los tejidos vitales (Friedman *et al.*, 1995; Schäfer y Zandbiglari, 2003).

#### Base de resina

El prototipo fue desarrollado hace 50 años por Andre Schroeder en Suiza (Schroeder, 1954), proporcionan adhesión y no contienen Eugenol (Pallares *et al.*, 1995).

Estos selladores hidrófobos se usan sin ningún tratamiento de la superficie de la dentina o adhesivo dentinal y son capaces de activar grupos amino expuestos en el colágeno para formar enlaces covalentes (Al-Khatib *et al.*, 1990). La resistencia de la unión a la dentina de AH Plus se ha reportado que es incluso mayor en comparación con los selladores con base de resina de endurecimiento dual (Spångberg *et al.*, 1993; Koch, 1999).

El AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemania) es una fórmula modificada del AH-26 que no libera formaldehído (Leonardo *et al.*, 1999). Su composición, de pasta epóxica: Resina Epóxica, Tungstenato de calcio, Óxido de Zirconio, Aerosol y Óxido de Hierro y pasta amina: 1-adamantano amina, N, N'-dibencil-5-oxa-nonandiamina-1,9, TCD-Diamina. Tungsteno



de Calcio, Óxido de Zirconio, Aerosol y Aceite de silicón. Tiene un tiempo de trabajo de unas 4 horas y de fraguado de 8 horas (Kenneth y Louis, 2011).

### Biocerámicos

Recientemente, se han introducido nuevos selladores endodónticos a base de Silicatos de Calcio, tales como MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brasil). Según el fabricante, se compone de pasta base: Resina Salicilato, Resina Natural, Tungstato de Calcio, Sílica Nanoparticulada, pigmentos; y pasta catalizadora: Resina Diluyente, Mineral Trióxido Agregado, Sílica Nanoparticulada, pigmentos (Flores *et al.*, 2011).

Su composición después de la mezcla es básicamente MTA, resina Salicilato, resina natural, Óxido de Bismuto y Sílice. También se afirma por el fabricante que MTA Fillapex tiene una excelente radiopacidad, fácil manejo y buen tiempo de trabajo (Zoufan *et al.*, 2011). MTA Fillapex mostró un tiempo de trabajo de 23 min y un tiempo medio de fraguado de 130 min (2 horas y 10 minutos), con una variación de  $\pm 10$  minutos (Moreira, 2010).

Estos selladores endodónticos recientemente introducidos (MTA Fillapex y BC Sealer) contienen Silicato de Calcio, que es biocompatible (Gong *et al.*, 2014) y reacciona con el agua para generar una fase de Hidrato de Silicato de Calcio durante el fraguado (Darvell y Wu, 2011). 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).

BioRoot RCS (Septodont, St. Maur-des-Fosses, Francia) ha sido desarrollado específicamente para cemento sellador, a base de Silicato Tricálcico. Es un cemento sellador de conductos radiculares mineral bioactivo, basado en la innovadora tecnología de Biosilicato Activo (Active Biosilicate Technology) patentada por Septodont, que contiene microagregados minerales. BioRoot RCS ofrece las siguientes propiedades:

- Formulación con minerales de alta pureza y libre de monómeros.

- Formación de hidroxiapatita en la interfase diente-sellador y mineralización de la estructura dentinaria.

- Antimicrobiano.
- Hermético.
- Radiopaco.
- Fácil manipulación.
- Puede retirarse.

Según el fabricante, este material se presenta como un polvo y un líquido. El polvo se compone de Silicato Tricálcico, Óxido de Zirconio (para radiopacidad) y excipientes. La solución acuosa se hace de Cloruro de Calcio y Policarboxilato presenta un tiempo óptimo de trabajo de 10 minutos y un tiempo máximo de fraguado de 4 horas (Camps *et al.*, 2015).

Materiales basados en Silicato Tricálcico se reconocen como materiales bioactivos a través de su capacidad para inducir la formación de tejido duro tanto en la pulpa dental y el hueso (Camps *et al.*, 2015).

### **III.3 Interacción con tejidos periapicales**

La reacción de los tejidos periapicales después del tratamiento de conductos radiculares y/o la obturación puede estar influida por varios factores, incluyendo enfermedad preexistente, la eliminación de tejido de la pulpa, la conformación y la limpieza del sistema de conductos radiculares, la infección bacteriana, la técnica de obturación y la naturaleza química del cemento sellador endodóntico (Block *et al.*, 1976).

Los cementos selladores están diseñados para el contacto directo con los tejidos vitales. Aunque el área de contacto es pequeña, siempre hay preocupación sobre las reacciones adversas por el tejido lo que puede afectar a los procesos de curación en los tejidos periapicales y retrasar la resolución de las lesiones (Langeland, 1974; Ørstavik, 2005).

Al momento de realizar un tratamiento de conductos radiculares, el operador está expuesto a cometer errores que tienen como consecuencia el comprometer el pronóstico del diente tratado. Estos errores pueden ser cometidos durante el acceso al diente, la instrumentación o la fase de obturación del conducto radicular como la sobreobturación o extrusión de cementos selladores (Duigou, 2004).

Se ha demostrado que todos los materiales de obturación empleados en endodoncia presentan cierto grado de citotoxicidad (Lin *et al.*, 1991). Por lo anterior, en casos de sobreobturación se produce una irritación química a nivel de los tejidos periradiculares que se traduce en una inflamación aguda de carácter transitorio, que puede persistir (inflamación crónica) dependiendo de las características químicas del material utilizado (Nair, 2004).

### Respuesta inmuno- inflamatoria

La producción de citocinas por células mononucleares desempeña un papel central en las respuestas inflamatorias destructivas y cicatrización de heridas en el ápice radicular (Brackett *et al.*, 2011; Brackett *et al.*, 2009).

Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, intervienen en la comunicación intercelular con un amplio espectro de propiedades inflamatorias, hematopoyéticas, metabólicas e inmunomoduladoras, junto con sus receptores asociados forman una compleja red funcional de estricto control biológico (Bascones y Moles, 2003; Górska *et al.*, 2003). 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. En tejidos clínicamente sanos, se ha observado la presencia en baja concentraciones de citocinas proinflamatorias como Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL-6) y TNF- $\alpha$ , ya que la concentración de citocinas debe ser adecuada para mantener la homeostasis de los tejidos (Okada y Murakami, 1998; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2002). Sin embargo, las citocinas proinflamatorias e inmunorreguladoras en condiciones patológicas puede presentar un desequilibrio y adoptar patrones proinflamatorios destructivos como periodontitis apical (Čolić *et al.*, 2009; Dongari-Bagtzoglou y Ebersole, 1996).

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 (Dongari-Bagtzoglou y Ebersole, 1996; Elias *et al.*, 1992). La inducción de mediadores primarios tales como Interleucina 1 (IL-1) o TNF estimula la producción de mediadores secundarios, incluyendo las quimioquinas, que actúan como citocinas quimiotácticas. Esto produce una amplificación de la respuesta inflamatoria, la inducción de enzimas que degradan el tejido conectivo y la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos. También se ha discutido el impacto de las citocinas sobre la muerte celular programada o apoptosis de los fibroblastos, ya que la pérdida de dichos fibroblastos puede limitar la reparación del tejido conectivo dañado (Graves *et al.*, 2001).

#### **III.4 TNF- $\alpha$ en endodoncia**

El TNF fue descubierto por el científico Lloyd, el cual describió su capacidad de inducir, *in vivo* e *in vitro*, la necrosis de algunos tumores de ratón que se podría atribuir a un factor (identificado rápidamente como una proteína) presente en la sangre después de la inyección de Lipopolisácaridos (LPS) (Old, 1985; Vassalli, 1992). La superfamilia de TNF está formada por 20 proteínas o ligandos, entre los que se incluye TNF- $\alpha$  cuya acción principal se desarrolla en el sistema inmune, modulando tanto la inmunidad innata como adquirida, aunque también se han descrito funciones no inmunológicas (Locksley *et al.*, 2001).

Su principal función es el reclutamiento y estimulación de neutrófilos y células mononucleares, junto con la inducción y regulación de mediadores de la inflamación, ya que desempeña un importante papel en la protección frente a la infección bacteriana (Gamble *et al.*, 1985). A pesar de su vida media plasmática sea de 20 minutos, es suficiente para provocar cambios metabólicos y hemodinámicos importantes, y activar distalmente otras citocinas (Curfs *et al.*, 1997; Raeburn *et al.*, 2002).

TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria e inmunomoduladora producida por un amplio espectro de células como mononucleares, macrófagos, linfocitos B y T, naturales Killer (NK),

así como células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos. El aumento de su síntesis se ha detectado en periodontitis, y está asociado a la destrucción y reabsorción ósea (Artese *et al.*, 1991; Gemmell *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1997; Safavi y Rossomando, 1991; Tyler *et al.*, 1999). Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve a la destrucción tisular la actividad de TNF- $\alpha$  debe ser regulada. Esta actividad se lleva a cabo gracias a las citocinas antiinflamatorias, como IL -10, IL-4 y las formas solubles de sus receptores. Estas citocinas antagonistas o inmunoreguladoras inhiben la unión del ligando con los receptores por concurrencia competitiva, bloqueando su acción e impidiendo su desarrollo de señalización intercelular (Stewart y Marsden, 1995).

Se ha evaluado la presencia de TNF- $\alpha$  en granulomas apicales y quistes radiculares (Artese *et al.*, 1991), así como en pulpas sanas, en pulpitis irreversibles, que a medida que avanza la inflamación hacia un proceso de necrosis pulpar, disminuye la concentración de dicha citocina (Pezelj-Ribaric *et al.*, 2002). Dentro de las lesiones periapicales también se ha evaluado la presencia de TNF, relacionado la concentración con las características clínicas y radiográficas distintivas de estas lesiones periapicales (de Brito *et al.*, 2012; Kawashima y Stashenko, 1999; Márton y Kiss, 2014; Stashenko *et al.*, 1998).

Se ha considerado TNF como criterio para probar la citotoxicidad de selladores endodónticos por la inducción de oxígeno y nitrógeno reactivos intermedios por los macrófagos, resultando que entre mayor es la cantidad de TNF- $\alpha$ , mayor será el efecto citotóxico local inmediato (Zimmerman *et al.*, 1989; Aggarwal *et al.*, 1985).

### **III.5 Ensayo de inmunoadsorción de enzimas (ELISA)**

Es un método analítico cuantitativo que muestra reacciones antígeno-anticuerpo a través del cambio de color usando un conjugado ligado a enzima y la enzima sustrato que sirven para identificar la presencia y concentración de moléculas en fluidos biológicos o celulares (Aydin, 2015).

Moléculas de baja concentración, tales como proteínas, hormonas, vitaminas y fármacos muestran un alto nivel de especificidad contra anticuerpos o antígenos desarrollados para ellos, esto se debe a que es casi imposible para un anticuerpo unirse a alguna otra molécula que a su propio antígeno (Aydin, 2015; Leinikki *et al.*, 1979). Por lo tanto, este método puede ser usado para medir sustancias, incluso en concentraciones muy bajas con casi ningún riesgo de interferencia (Aydin, 2015).

Esta técnica presente ventajas tales como; la larga vida útil de los reactivos utilizados, siendo libre de radiación y riesgos asociados con las sustancias de desecho, lo que permite el análisis de múltiples muestras en un periodo de tiempo corto para diagnóstico e investigación de laboratorio a bajo costo (Aydin, 2015).

## **IV. HIPÓTESIS**

### **IV.1 Hipótesis de trabajo**

La concentración de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares humanas estimuladas por eluido de cemento sellador endodóntico BioRoot RCS será menor que la estimulada por los cementos selladores Pulp Canal Sealer, AH Plus y MTA-Fillapex.

### **IV.2 Hipótesis nula**

La concentración de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares humanas estimuladas por eluidos de cementos selladores endodónticos (BioRoot RCS Pulp Canal Sealer, Ah Plus y MTA-Fillapex) será similar para todos los casos.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del eluido de cemento sellador endodóntico (BioRoot RCS, Pulp Canal Sealer, AH Plus, o MTA Fillapex) sobre la producción de TNF- $\alpha$  en células mononucleares humanas.

### **V.2 Objetivos específicos**

1. Cuantificar la concentración de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares humanas estimuladas por eluidos de cementos selladores endodónticos Pulp Canal Sealer, AH Plus, BioRoot RCS y MTA Fillapex
2. Comparar la concentración de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares humanas estimuladas por eluidos de cementos selladores endodónticos, Pulp Canal Sealer, AH Plus, BioRoot RCS y MTA Fillapex.



## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VI.1 Tipo de Investigación**

Estudio experimental *in vitro*.

### **VI.2 Población**

Cultivo de células mononucleares humanas, obtenido de sangre venosa de dos sujetos sanos, expuestos a eluidos de cementos selladores endodónticos AH Plus (Dentsply), Pulp Cabal Sealer (Kerr), MTA Fillapex (Angelus), y BioRoot RCS (Septodont).

### **VI.3 Tamaño de Muestra**

2 placas de 24 pozos de cultivo, con 500,000 células mononucleares cada pozo. Se distribuyeron para los 4 cementos selladores endodónticos y para el grupo control de Lipopolisácaridos (LPS), así como también de acuerdo a las horas de exposición al eluido de cada cemento sellador endodóntico (3, 6, 12 y 24 horas).

#### **VI.3.1 Criterios de Selección**

##### Criterios de Inclusión del paciente donador de células mononucleares

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

##### Criterios de Exclusión del paciente donador de células mononucleares

Personas que estén bajo tratamiento antimicrobiano, analgésico y antiinflamatorio.

##### Criterios de Eliminación del paciente donador de células mononucleares

Personas que decidan retirar su muestra 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**

#### Independientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Eluido de 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 según el fabricante. Elaboración de eluidos.	Cuantitativa	Continua	µl
Eluido de 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 según el fabricante. Elaboración de eluidos.	Cuantitativa	Continua	µl

Eluido de 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 según el fabricante. Elaboración de eluidos.	Cuantitativa	Continua	μl
Eluido de 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 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 TNF-α.	Cantidad de citocina secretada en cada pozo de cultivo con células mononucleares humanas y su cuantificación.	Cuantificación TNF-α con el Kit comercial ELISA ABTS Prepotech®	Cuantitativa	Continúa de razón.	Pg/mL.

## VI.4 PROCEDIMIENTO

Para el estudio la fase experimental se dividió en cinco fases:

### **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 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 5 mL 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 min.

#### Aislamiento de Células Mononucleares Humanas (CMN) por gradiente de Ficoll.

Las muestras de sangre fueron transportadas para su procesamiento a 37 °C.

El protocolo para el aislamiento celular fue el siguiente:

1.- Con una pipeta serológica se colocaron 3 mL de Ficoll-1077 en un tubo cónico de 15 mL.

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 5 mL de sangre anticoagulada hacia un tubo cónico de 15 mL conteniendo 5 mL de buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4 estéril.

4. El tubo se homogeneizó por inversión.

5. Utilizando la misma pipeta serológica, se tomaron 10 mL de la mezcla de sangre y PBS y se colocó cuidadosamente sobre la superficie del Ficoll-1077 sin perturbar la interfase dispersando 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 centrífuga 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 CMN de fondo redondo en la centrífuga y se centrifugaron a 760 RPM, 10 minutos.

7.- Se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 0.5%.

8.- Se resuspendieron las CMN 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 por inversión.

9.- Se colocaron nuevamente los tubos de cultivo de fondo redondo en la centrífuga y se centrifugaron a 760 RPM por 10 minutos.

10. Se descartó el sobrenadante por decantación hacia una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 0.5%.

11. Se resuspendieron las CMN en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. Se agregó a cada tubo con CMN 1 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se resuspendieron con golpeteo digital.

12.- Se realizó el conteo celular e identificación de viabilidad celular, para esto, la suspensión de CMN se mezcló con una solución al 0.4% de azul tripán y se colocó en un hemocitómetro de Neubauer para posteriormente observarlas bajo microscopio invertido.

## **Segunda Fase.**

### Preparación de Eluidos de los 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. 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 se pesaron tres veces y se registró el peso promedio. Los pesos usados 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 1 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sin suplementos ni antibióticos.

3.- La placa de cultivo con todos los cementos fue incubada a 37 °C y 5 % de 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 almacenó 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 960 µl de medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomicina y 40 µl de cada uno de los eluidos o 40 µl de 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). Terminado el tiempo de incubación, el sobrenadante fue recuperado utilizando una micropipeta y colocado en microtubos 0.6 mL 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 ABTS Preprotech® para cuantificación de TNF-α y su correspondiente kit de soluciones amortiguadoras siguiendo las indicaciones del fabricante:

1.- Se diluyó el anticuerpo de captura en buffer fosfato salino (PBS) a una concentración de 1.0 µg/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 300  $\mu$ 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  $\mu$ l 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 0.50  $\mu$ g/mL.

6.- Se agregaron 100  $\mu$ 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  $\mu$ l de Avidin Peroxidasa en una proporción 1:2000 en diluyente para obtener un volumen total de 11 mL y se agregaron 100  $\mu$ l a cada pozo.

8.- La placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se aspiró y lavó cada pozo cuatro veces.

9.- Se agregaron 100  $\mu$ l de solución de ensayo de decoloración con el radical catiónico (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 minutos durante 30 minutos, los valores de densidad óptica fueron almacenados en una hoja de Excel para su posterior análisis.



## **VI.5 Análisis estadístico**

Se realizó la importación de valores de absorbancia a una base de datos de Excel, en donde se analizaron. Se calcularon medias, desviaciones estándar y se obtuvieron rangos, además de realizar gráficas. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Pad Prism. Se aplicó el ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. Se consideró significancia estadística cuando  $p$  fue  $\leq 0.05$ .

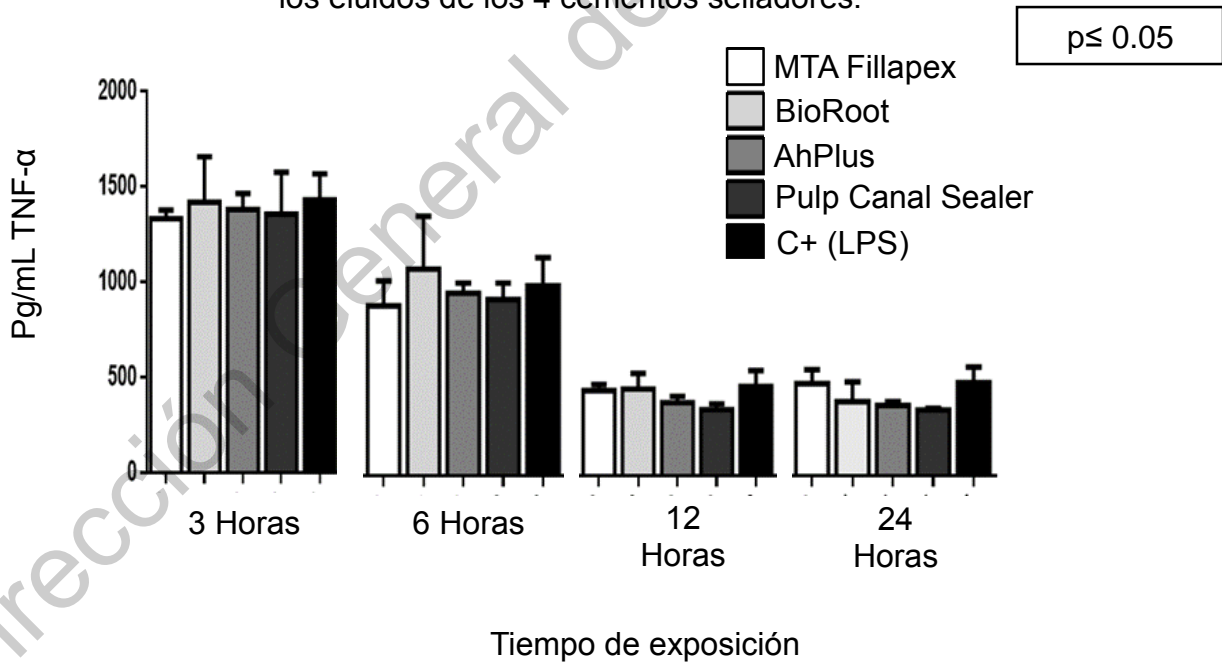
## **VI.6 Consideraciones éticas**

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se obtuvo el consentimiento informado de un sujeto sano que donó 25 mL 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

No existieron diferencias ( $p > 0.05$ ) al comparar la concentración del TNF- $\alpha$  producida por los diferentes eluidos en ninguno de los periodos estudiados. Por otro lado, se puede observar que, con todos los eluidos evaluados, incluido en el control, existió una mayor producción de TNF- $\alpha$  a las 3 horas de exposición, esta concentración fue disminuyendo notablemente a las 6 horas y después a las 12 horas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, para las 24 horas se pudo observar que la producción fue muy similar ( $p > 0.05$ ) en comparación con lo registrado a las 12 horas (Gráfica 1).

Gráfica 1. Concentración de TNF- $\alpha$  inducida por la exposición a los eluidos de los 4 cementos selladores.



## VIII. DISCUSIÓN

Ricucci y Loghin (2016) en un estudio retrospectivo evaluaron los casos de extrusiones apicales no intencionales de cementos selladores; encontraron que ninguno de ellos es capaz de influir en el resultado del tratamiento, independientemente del tiempo de absorción o degradación del mismo. Otros estudios, no muestran influencia del tipo de cemento sellador en el resultado del tratamiento (Ørstavik *et al.*, 2004; Waltimo *et al.*, 2001), estando en consonancia con resultados similares a los de la presente investigación *in vitro* que tuvo como objetivo cuantificar la concentración de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares humanas estimuladas por eluidos de cementos selladores endodónticos con diferente composición química como Pulp Canal Sealer, AH Plus, Bio Root RCS y MTA Fillapex para valorar la respuesta inmuno-inflamatoria, mismos resultados sin diferencias significativas entre la composición química.

Aunque la presencia extrarradicular del material de relleno endodóntico puede no estar directamente asociado con la enfermedad post-tratamiento de endodoncia, se ha sugerido que la presencia de selladores endodónticos en los tejidos periapicales puede retrasar el proceso de curación en los dientes con periodontitis apical (Ricucci y Loghin, 2016), sin embargo, con el presente estudio no se puede determinar si la concentración de TNF- $\alpha$  impacta en las reacciones biológicas ya que estas actúa en interacción con otras citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias.

Previos estudios donde se usaron diferentes diseños experimentales confirmaron que la citotoxicidad de los selladores endodónticos disminuye con el tiempo, pues la mayoría de los selladores pierden sus componentes irritantes y se vuelven relativamente inerte (Brackett *et al.*, 2008; Pinna *et al.*, 2008; Langeland, 1974; Spångberg y Haapasalo, 2002). En el presente estudio se observó que en todos los grupos hubo una mayor producción de TNF- $\alpha$  a las 3 horas de exposición, disminuyendo de forma significativa a 6 y 12 horas, hasta las 24 horas, disminuyendo la respuesta al haber transcurrido mayor tiempo de exposición.

En estudios donde se utilizaron cementos selladores endodónticos recién mezclados demostraron que son uniformemente citotóxicos *in vitro* (Brackett *et al.*, 2008, 2010), mostrando un cambio en la expresión de mediadores inflamatorios difíciles de medir (Brackett *et al.*, 2009; Heil *et al.*, 2002; Wataha *et al.*, 2004). Por lo anterior, en el presente estudio se realizaron eluidos de diferentes cementos selladores endodónticos mezclando cada uno como lo indica el fabricante, hasta su fraguado, obteniendo finalmente eluidos, técnica relevante para la expresión de citocinas utilizada anteriormente por Jung *et al.*, (2018b) donde evaluaron el efecto de un cemento sellador endodóntico a base de resina Epóxica (AH-Plus), uno que contiene Eugenol Óxido de Zinc (Pulp Canal Sealer) y dos que contienen base Silicato de Calcio (MTA Fillapex y BioRoot-RCS), sobre los osteoblastos humanos primarios (HOB).

La producción de citocinas por células mononucleares desempeña un papel central en las respuestas inflamatorias destructivas y de cicatrización de heridas en el ápice radicular. Los selladores de endodoncia afectan a este proceso importante sobre las citocinas, sin embargo es poco conocido (Brackett *et al.*, 2011). Brackett *et al.*, (2009) se focalizaron en la capacidad de los selladores endodónticos para estimular la producción de citocinas a partir de monocitos. Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de monocitos y las respuestas inflamatorias a varios selladores endodónticos, AH-Plus, Pulp Canal Sealer, Resilón, Endo-Rez y un experimental Endo-Rez. Los colocaron inicialmente en solución salina durante 12 semanas para simular el uso *in vivo*, después los especímenes fueron colocados en contacto directo con los monocitos de línea derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda (THP1) durante 72 horas y se midió su citotoxicidad (MTT) y la capacidad de inducir o de suprimir la expresión de citocinas (ELISA; TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-56). Los resultados sugieren que los selladores endodónticos comunes no activan la expresión monocítica de TNF- $\alpha$ , IL-1b, y IL-6 *in vitro* por sí mismas, pero los productos de degradación de los selladores pueden suprimir la activación de los monocitos, lo que sugiere que estos materiales solo representan un riesgo relativamente bajo de respuestas inflamatorias crónicas, concordando con este estudio en los que utilizamos cementos selladores de composición química similar a base de resina Epóxica e Óxido de Zinc con Eugenol, no existiendo diferencias significativas entre la composición química de los cementos, además la expresión de TNF- $\alpha$  fue descendiendo en el transcurso de las horas, disminuyendo la capacidad

de generar inflamación crónica, sin embargo es complicado deducir la actividad biológica de modelos *in vitro* al rendimiento clínico y este trabajo no es una excepción.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## IX. CONCLUSIONES

El presente estudio *in vitro* mostró que todos los cementos selladores evaluados estimularon la producción de TNF- $\alpha$  sobre todo a las primeras 3 horas de exposición, disminuyendo la concentración a 6 y 12 horas, sin embargo a las 12 y 24 horas se observó una producción similar.

Al comparar los resultados obtenidos en relación a la composición química de los cementos selladores evaluados no existió diferencias estadísticamente significativas, por lo que la composición química del cemento sellador puede no influir en respuesta inflamatoria o de reparación de tejidos periapicales, como se esperaba en el estudio, sin embargo los datos obtenidos son insuficientes para determinar parámetros clínicos y biológicos.

Las reacciones biológicas inmuno-inflamatorias en relación con las citocinas son conocidos y bien aceptados, sin embargo, en endodoncia se desconoce si influyen en el resultado final del proceso cuando hay o no lesión periapical, si retrasa o no la cicatrización y si el dolor postoperatorio puede ser causa aislada solo de la extrucción de cemento sellador endodóntico.

## **X. PROPUESTA**

Se propone realizar líneas de investigación con diferentes tipos celulares que estén en relación con la respuesta biológica de los tejido periapicales, como fibroblastos, osteocitos o macrófagos, para valorar la biocompatibilidad y su respuesta inflamatoria o de cicatrización, con nuevas marcas comerciales de cementos selladores endodónticos, aumentando el número y tipos de proteínas a cuantificar, tanto citocinas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias proponiendo conocer más a fondo la interacción en conjunto de estas. Incluyendo métodos mediante eluidos y de contacto directo de los cementos selladores simulando eventos clínicos, valorando los resultados con ensayos MTT, ensayos ELISA, citometría de flujo o ARN.

Dirección General de Bibliotecas UFG

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., and Harkins, R. N. 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260(4):2345–2354.

Al-Hiyasat, A. S., Tayyar, M., and Darmani, H. 2010. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int. Endod. J.* 43(2):148–153.

Al-Khatib, Z. Z., Baum, R. H., Morse, D. R., Yesilsoy, C., Bhambhani, S., and Furst, M. L. 1990. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 70(6):784–790.

Alsubait, S. A., Al Ajlan, R., Mitwalli, H., Aburaisi, N., Mahmood, A., Muthurangan, M., and Anil, S. 2018. Cytotoxicity of different concentrations of three root canal sealers on human mesenchymal stem cells. *Biomolecules.* 8(3):68.

Anusavice, K. J., dos Santos, J., and Shen, C. 2004. *Phillips ciencia de los materiales dentales.* Elsevier.

Artese, L., Piattelli, A., Quaranta, M., Colasante, A., & Musani, P. 1991. Immunoreactivity for interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod.* 17(10):483–487.

Augsburger, R. A., and Peters, D. D. 1990. Radiographic evaluation of extruded obturation materials. *J. Endod.* 16(10):492–497.

Aydin, S. 2015. Peptides A short history , principles , and types of ELISA , and our laboratory experience with peptide / protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15.

Barkhordar, R. A. 1989. Evaluation of antimicrobial activity in vitro of ten root canal sealers on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 68(6):770–772.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair Regen.* 16(5): 585-601.

Bascones, A., and Moles, G. 2003. Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Av. en Periodoncia e Implantol. Oral.* 15(3):



121–138.

Baumann, H., and Gauldie, J. 1994. The acute phase response. *Immunol. Today*. 15(2):74–80.

Bergenholtz, G., Horsted-Bindslev, P., and Reit, C. 2011. *Endodoncia. Editorial El Manual Moderno*.

Bernáth, M., and Szabó, J. 2003. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int. Endod. J.* 36(4):256–261.

Biven, G. M., Bapna, M. S., and Heuer, M. A. 1972. Effect of eugenol and eugenol-containing root canal sealers on the microhardness of human dentin. *J Dent Res.* 51(6):1602–1609.

Block, R. M., Bushell, A., Rodrigues, H., and Langeland, K. 1976. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 42(5):656–678.

Brackett, M. G., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Lei, L., Lockwood, P. E., and Wataha, J. C. 2011. Dysregulation of monocytic cytokine secretion by endodontic sealers. *J. Biomed Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 97 B(1):49–57.

Brackett, M. G., Marshall, A., Lockwood, P. E., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Bouillaguet, S., and Wataha, J. C. 2008. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int. Endod. J.* 41(12):1072–1078.

Brackett, M. G., Marshall, A., Lockwood, P. E., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Bouillaguet, S., and Wataha, J. C. 2009. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *J. Biomed Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 91(2), 839–844.

Brackett, M. G., Messer, R. L. W., Lockwood, P. E., Bryan, T. E., Lewis, J. B., Bouillaguet, S., and Wataha, J. C. 2010. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J. Biomed Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 95(2):380–386.

Camps, J., Jeanneau, C., El Ayachi, I., Laurent, P., and About, I. 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, S. W., Lee, S. Y., Kang, S. K., Kum, K. Y., and Kim, E. C. 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.

Čolić, M., Gazivoda, D., Vučević, D., Vasiljić, S., Rudolf, R., and Lukić, A. 2009. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol. Immunol.* 47(1):101–113.

Curfs, J. H., Meis, J. F., and Hoogkamp-Korstanje, J. A. 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 10(4):742–780.

Darvell, B. W., and Wu, R. C. T. 2011. “MTA”—an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dent. Mater.* 27(5):407–422.

Davis, M. C., Walton, R. E., and Rivera, E. M. 2002. Sealer distribution in coronal dentin. *J. Endod.* 28(6):464–466.

de Brito, L. C. N., Teles, F. R. F., Teles, R. P., Totola, A. H., Vieira, L. Q., and Sobrinho, A. P. R. 2012. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J. Endod.* 38(4):481–485.

Dongari-Bagtzoglou, A. I., and Ebersole, J. L. 1996. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J. Periodontal Res.* 31(2):90–98.

Duigou, C. 2004. Discuss the prevention and management of procedural errors during endodontic treatment. *Aust. Endod. J.* 30(2):74–78.

Elias, J. A., Zitnik, R. J., and Ray, P. 1992. Fibroblast immune-effector function. RP Phipps, ed. *Pulmonary Fibroblast Heterogeneity* 295. CRC Press, Rochester.

Flores, D. S. H., Rached-Júnior, F. J. A., Versiani, M. A., Guedes, D. F. C., Sousa-Neto, M. D., and Pécora, J. D. 2011. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int. Endod. J.* 44(2):126–135.

Friedman, S., Löst, C., Zarrabian, M., and Trope, M. 1995. Evaluation of success

and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. *J. Endod.* 21(7): 384–390.

Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., and Vadas, M. A. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82(24):8667–8671.

Garg, N., and Garg, A. 2010. *Textbook of endodontics.* Boydell & Brewer Ltd.

Gemmell, E., Marshall, R. I., and Seymour, G. J. 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 14(1):112–143.

Giraud, T., Jeanneau, C., Bergmann, M., Laurent, P., and About, I. 2018. Tricalcium silicate capping materials modulate pulp healing and inflammatory activity in vitro. *J. Endod.* 44(11):1686–1691.

Gong, T., Wang, Z., Zhang, Y., Sun, C., Yang, Q., Troczynski, T., and Häfeli, U. O. 2014. Preparation, characterization, release kinetics, and in vitro cytotoxicity of calcium silicate cement as a risedronate delivery system. *J Biomed Mater Res Part A.* 102(7):2295–2304.

Górska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M., and Madaliński, K. 2003. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 30(12):1046–1052.

Graves, D. T., Oskoui, M., Voleinikova, S., Naguib, G., Cai, S., Desta, T., and Jiang, Y. 2001. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J. Dent. Res.* 80(10):1875–1879.

Grossman, L. I. 1976. Physical properties of root canal cements. *J. Endod.* 2(6):166–175.

Haji-Hassani, N., Bakhshi, M., and Shahabi, S. 2015. Frequency of iatrogenic errors through root canal treatment procedure in 1335 charts of dental patients. *J. Int. oral Heal JIOH.* 7: 14.

Heil, T. L., Volkmann, K. R., Wataha, J. C., and Lockwood, P. E. 2002. Human

peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *J. Oral Rehabil.* 29(5):401–407.

Heling, I., and Chandler, N. P. 1996. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J. Endod.* 22(5):257–259.

Ingle, J. I., Beveridge, E. E., Glick, D. H., Weichman, J. A., and Abou-Rass, M. 1994. Modern endodontic therapy. *Endodontics.* 2:1–57.

José, S. I., and Goldberg, F. 2002. *Endodoncia Técnica y fundamentos.* Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana, SA.

Jung, S., Libricht, V., Sielker, S., Hanisch, M. R., Schäfer, E., and Dammaschke, T. 2018a. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. *Odontology.* 107:54-63.

Jung, S., Sielker, S., Hanisch, M. R., Libricht, V., and Scha, E. 2018b. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PLoS one.* 1–14.

Kawashima, N., and Stashenko, P. 1999. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol.* 44(1):55–66.

Kazemi, R. B., Safavi, K. E., and Spångberg, L. S. W. 1993. Dimensional changes of endodontic sealers. *Oral surgery, oral Med. oral Pathol.* 76(6):766–771.

Kenneth M. Hargreaves and Louis.H. Berman, S. C. 2011. *Cohen Vias De La Pulpa* Autor.

Koch, M. J. 1999. Formaldehyde release from root-canal sealers: influence of method. *Int. Endod. J.* 32(1):10–16.

Langeland, K. 1974. Root canal sealants and pastes. *Dent. Clin. North. Am.* 18:309–327.

Laurichesse, J.-M., Maestroni, F., and Breillat, J. 1986. *Endodontie clinique.* Éditions CdP.

Leinikki, P. O., Shekarchi, I., Tzan, N., Madden, D. L., and Sever, J. L. 1979. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mumps virus antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 160(3):363–367.

Leonardo, M. R., da Silva, L. A. B., Tanomaru Filho, M., and da Silva, R. S. 1999. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 88(2), 221–225.

Lin, L. M., Pascon, E. A., Skribner, J., Gängler, P., and Langeland, K. 1991. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 71(5), 603–611.

Lin, L. M., and Rosenberg, P. A. 2011. Repair and regeneration in endodontics. *Int. Endod. J.* 44(10):889–906.

Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104(4):487–501.

Lyon, K. F. 2001. Endodontic instruments for root canal therapy. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 16(3):139–150.

Martinho, F. C., Chiesa, W. M. M., Leite, F. R. M., Cirelli, J. A., and Gomes, B. P. F. A. 2012. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J. Endod.* 38(6):740–745.

Martinho, F. C., Nascimento, G. G., Leite, F. R., Gomes, A. P., Freitas, L. F., and Camões, I. C. 2015. Clinical influence of different intracanal medications on Th1-type and Th2-type cytokine responses in apical periodontitis. *J. endod.* 41(2):169-175.

Márton, I. J., and Kiss, C. 2014. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J. Endod.* 40(2):155–163.

Mickel, A. K., Nguyen, T. H., and Chogle, S. 2003. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 29(4):257–258.

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 Kopper, P. M. P. 2011. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int. Endod. J.* 44(12):1128–1133.

Moura, C. C. G., Machado, J. R., Silva, M. V, Rodrigues, D. B. R., Zanetta-Barbosa, D., Jimbo, R., and Coelho, P. G. 2013. Evaluation of human polymorphonuclear behavior on textured titanium and calcium-phosphate coated surfaces. *Biomed. Mater.* 8(3): 35010.

Nair, P. N. R. 2004. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*15(6):348–381.

Okada, H., & Murakami, S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9(3):248–266.

Old, L. J. 1985. Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science.* 230.

Ørstavik, D. 2005. Materials used for root canal obturation : technical , biological and clinical testing. *Endod. Top.* 12(3):25–38.

Ørstavik, D., and Pitt Ford, T. R. 1998. *Essential endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis.* Ames. IA Blackwell Sci.

Ørstavik, D., Qvist, V., and Stoltze, K. 2004. A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment. *Eur. J. Oral Sci.*112(3):224–230.

Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J., and Kornman, K. S. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.* 2000.14(1):216–248.

Pallares, A., Faus, V., and Glickman, G. N. 1995. The adaptation of mechanically softened gutta-percha to the canal walls in the presence or absence of smear layer: a scanning electron microscopic study. *Int. Endod. J.* 28(5):266–269.

Perassi, F. T., Bonetti Filho, I., Berbert, F. L. C. V., Carlos, I. Z., and de Toledo Leonardo, R. 2004. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *J. endod.* 30(7):534-537.

Peters, D. D. 1986. Two-year in vitro solubility evaluation of four gutta-percha sealer obturation techniques. *J. Endod.* 12(4):139–145.

Pezelj-Ribaric, S., Anic, I., Brekalo, I., Miletic, I., Hasan, M., and Simunovic-Soskic, M. 2002. Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  in normal and inflamed human dental pulps.

Arch. Med. Res. 33(5):482–484.

Pinna, L., Brackett, M. G., Lockwood, P. E., Huffman, B. P., Mai, S., Cotti, E., and Tay, F. R. 2008. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *J. Endod.* 34(9):1085–1088.

Raeburn, C. D., Sheppard, F., Barsness, K. A., Arya, J., and Harken, A. H. 2002. Cytokines for surgeons. *Am. J. Surg.* 183(3):268–273.

Rickert, U. G., and Dixon, C. M. 1931. The controlling of root surgery. In *Transactions of the Eighth International Dental Congress (Vol. 15)*. Fédération Dentaire Internationale, Paris.

Ricucci, D., and Loghin, S. 2016. Apically Extruded Sealers : Fate and Influence on Treatment.

Safavi, K. E., and Rossomando, E. F. 1991. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J. Endod.* 17(1):12–14.

Salles, L. P., Gomes-Cornélio, A. L., Guimarães, F. C., Herrera, B. S., Bao, S. N., Rossa-Junior, C., and Tanomaru-Filho, M. 2012. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J. Endod.* 38(7):971–976.

Schäfer, E., and Zandbiglari, T. 2003. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int. Endod. J.* 36(10):660–669.

Schroeder, A. 1954. The impermeability of root canal filling material and first demonstrations of new root filling materials. *Rev. Mens. suisse. d'odonto. stomatologie.* 64(9):921–931.

Siqueira Jr, J. F. 2005. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endod. Top.* 10(1):123–147.

Spångberg, L. S. W., Barbosa, S. V, and Lavigne, G. D. 1993. AH26 releases formaldehyde. *J. Endod.* 19(12):596–598.

Spångberg, L. S. W., and Haapasalo, M. 2002. Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endod. Top.*

2(1):35–58.

Stashenko, P., Teles, R., and d'Souza, R. 1998. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9(4):498–521.

Stewart, R. J., and Marsden, P. A. 1995. Biologic control of the tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *Am. J. kidney Dis.* 25(6):954–966.

Tai, K.-W., Huang, F.-M., and Chang, Y.-C. 2001. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J. Endod.* 27(9):571–573.

Tyagi, S., Mishra, P., and Tyagi, P. 2013. Evolution of root canal sealers: An insight story. *Eur J. Gen. Dent.* 2(3):199.

Tyler, L. W., Matossian, K., Todd, R., Gallagher, G. T., White, R. R., and Wong, D. T. W. 1999. Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1) in human periradicular lesions. *J. Endod.* 25(9):619–624.

Van der Burgt, T. P., Mullaney, T. P., and Plasschaert, A. J. M. 1986. Tooth discoloration induced by endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 61(1):84–89.

Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10(1):411–452.

Velard, F., Laurent-Maquin, D., Guillaume, C., Bouthors, S., Jallot, E., Nedelec, J.-M., and Laquerriere, P. 2009. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomater.* 5(5):1708–1715.

Waltimo, T. M. T., Boiesen, J., Eriksen, H. M., and Ørstavik, D. 2001. Clinical performance of 3 endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* 92(1):89–92.

Wataha, J. C., Lewis, J. B., Volkmann, K. R., Lockwood, P. E., Messer, R. L. W., and Bouillaguet, S. 2004. Sublethal concentrations of Au (III), Pd (II), and Ni (II) differentially alter inflammatory cytokine secretion from activated monocytes. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater An Off J. Soc. Biomater Japanese Soc. Biomater Aust. Soc. Biomater Korean Soc. Biomater.* 69(1):11–17.



Willershausen, I., Callaway, A., Briseño, B., and Willershausen, B. 2011. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head. Face. Med.* 7(1):1–9.

Wolcott, J., Himel, V. T., Powell, W., and Penney, J. 1997. Effect of two obturation techniques on the filling of lateral canals and the main canal. *J. Endod.* 23(10):632–635.

Zimmerman, R. J., Marafino, B. J., Chan, A., Landre, P., & Winkelhake, J. L. 1989. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. Implications for mechanisms of action. *J. Immunol.* 142(4):1405–1409.

Zoufan, K., Jiang, J., Komabayashi, T., Wang, Y.-H., Safavi, K. E., and Zhu, Q. 2011. Cytotoxicity evaluation of Gutta flow and endo sequence BC sealers. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* 112(5):657–661.

Dirección General de Bibliotecas UJAO