



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

**EFFECTO DE CUATRO CEMENTOS SELLADORES, PULP CANAL SEALER, MTA
FILLAPEX, BIOROOT RCS Y AH PLUS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 EN
FIBROBLASTOS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.**

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Diploma de

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Presenta:

C.D. Ericka Michell López Vega

Dirigido por:

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Querétaro, Qro., a Marzo de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina
Especialidad en Endodoncia

EFFECTO DE CUATRO CEMENTOS SELLADORES, PULP CANAL SEALER, MTA FILLAPEX, BIOROOT RCS Y AH PLUS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 EN FIBROBLASTOS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.

Tesis

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

Presenta:

C.D. Ericka Michell López Vega.

Dirigido por:

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez.

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Presidente

Dra. María del Socorro Maribel Liñán Fernández

Secretario

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano

Vocal

C.D.E.E. Héctor Eugenio Morales Nieto

Suplente

C.D.E.E. Larissa Argentina Zavala Vargas

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo 2021

México

RESUMEN

Introducción: Los selladores endodónticos se utilizan en la obturación del sistema de conductos radiculares para lograr un sellado impermeable o hermético a todo el conducto, incluido el foramen apical y las irregularidades del conducto. Sin embargo, cuando se extruyen en los espacios perirradiculares, es posible que los selladores no siempre se eliminen por reacción del tejido perirradicular y pueden alterar el tiempo de reparación del tejido y causar diferentes reacciones tisulares según la composición del sellador por lo que, los estudios citotóxicos de estos selladores endodónticos son el primer paso hacia una evaluación de su seguridad. **Objetivos:** Determinar cuál cemento sellador Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS o AH Plus induce mayor producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano. **Material y métodos:** Se estimularon fibroblastos del ligamento periodontal humano con eluídos obtenidos de los diferentes cementos selladores. Se recuperó el sobrenadante de los cultivos a las 3, 6, 12 y 24 horas de estimulación y se utilizó ELISA para cuantificar la producción de IL-8 en el medio. **Resultados:** El eluído del cemento sellador Pulp Canal Sealer estimuló la mayor producción de IL-8, mientras que el de MTA Fillapex, BioRoot RCS y AH- Plus la menor, existiendo diferencias entre ellos ($p < 0.05$). Se observó que el eluído de BioRoot RCS produjo un incremento de IL-8 a las 3 horas con una disminución significativa a las 6 horas por debajo del rango detectable, el cual se mantuvo a lo largo del tiempo. La estimulación realizada con Pulp Canal Sealer mostró un aumento gradual a través del tiempo ($p < 0.05$). **Conclusiones:** A las 3 horas todos los cementos estimularon la producción de IL-8, sin embargo, Pulp Canal Sealer fue el que más estimuló a las 24 horas, teniendo diferencias significativas con los otros cementos.

Palabras clave: Cementos selladores endodónticos, IL-8, fibroblastos del ligamento periodontal humano, ELISA.

SUMMARY

Introduction: Endodontic sealers are used to filling the root canal system and achieve a watertight seal to the entire canal, including the apical foramen and canal irregularities. However, when extruded into the periradicular spaces, the sealer may not always be removed by the reaction of the periradicular tissue and can alter the tissue repair time and cause different tissue reactions depending on the composition of the sealer, therefore, studies of cytotoxic effects of these endodontic sealers are the first step towards an evaluation of their safety. **Objectives:** To determine which endodontic sealer, Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS, or AH Plus induce a greater production of IL-8 in human periodontal ligament fibroblasts. **Material and methods:** Human periodontal ligament fibroblasts were stimulated with eluates obtained from the different sealing cements. The culture supernatant was recovered at 3,6,12 and 24 hours of stimulation and ELISA was used to quantify the production and release of IL-8 in the medium. **Results:** The Pulp Canal Sealer eluate stimulated the highest production of IL-8, while that MTA Fillapex, BioRoot RCS y AH- Plus the lowest ($p < 0.05$). It was observed that the eluate from BioRoot RCS produced an increase of IL-8 at 3 hours and a decrease at 6 hours below the detectable range of the assay, which was maintained over time. The stimulation performed with Pulp Canal Sealer showed a gradual increase over time ($p < 0.05$). **Conclusions:** At 3 hours, all the eluates stimulated the production of IL-8. However, Pulp Canal Sealer was the one that most stimulated at 24 hours, showed a significant difference than the other sealers.

Key words: Endodontic sealer cement, IL-8, Human Periodontal Ligament Fibroblasts, ELISA.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanas y sobrinas Ximena y Renata que me alientan día con día a ser mejor y lograr todas las metas propuestas, sin su apoyo, motivación y amor nada de esto hubiera sido posible.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme lograr este propósito, por colocarme en este camino de aprendizaje, retos y bendiciones, por cuidar de mí en todo momento y darme la oportunidad de conocer a personas maravillosas que ayudaron en gran manera a mi crecimiento profesional y personal.

A mi familia, quienes desde la distancia siempre estuvieron conmigo, apoyándome y motivándome a seguir adelante, quienes con su amor y ejemplo me inspiran a ser mejor cada día. Mis logros son suyos también.

A mis maestros por compartirme sus conocimientos y habilidades, por mostrarme la calidad humana que representan, por apoyarme cuando recién comenzaba a aprender algo nuevo, por dedicar su valioso tiempo a los alumnos que llegan con nuevas ilusiones, por brindarme su confianza y respeto en todo momento.

A mis compañeros de clase que se convirtieron en una nueva familia, quienes llegaron con las mismas ilusiones y metas que yo, quienes me brindaron su comprensión, apoyo y hacían más amena la estancia lejos de casa.

ÍNDICE

| | Página |
|---------------------------------|--------|
| Resumen | i |
| Summary | ii |
| Dedicatorias | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Índice | v |
| Abreviaturas y Siglas | vii |
| I. Introducción | 1 |
| II. Antecedentes | 4 |
| III. Fundamentación teórica | 6 |
| IV. Hipótesis | 12 |
| IV.1. Hipótesis de trabajo | 12 |
| IV.2. Hipótesis nula | 12 |
| V. Objetivos | 13 |
| V.1. Objetivo General | 13 |
| V.2. Objetivo Específico | 13 |
| VI. Materiales y Métodos | 14 |
| VI.1. Tipo de investigación | 14 |
| VI.2. Población | 14 |
| VI.3. Muestra y tipo de muestra | 14 |
| VI.3.1. Criterios de selección | 14 |
| VI.3.2. Variables estudiadas | 15 |
| VI.4. Técnicas e Instrumentos | 18 |
| VI.5. Procedimiento | 18 |
| VI.5.1. Análisis estadístico | 22 |
| VI.5.2. Consideraciones éticas | 22 |
| VII. Resultados | 23 |
| VIII. Discusión | 25 |
| IX. Conclusiones | 28 |

| | |
|------------------|----|
| X. Propuestas | 29 |
| XI. Bibliografía | 30 |

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Abreviaturas y siglas

| | |
|---------------|--|
| hPDLFs | Fibroblastos del ligamento periodontal humano |
| hDPSC | Células madre de pulpa dental humana |
| hPDLSC | Células madre del ligamento periodontal humano |
| hGF | Fibroblastos gingivales humanos |
| hOST | Osteoblastos humanos |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-17 | Interleucina 17 |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral alfa |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| MPC-1 | Proteína quimioatrayente de monocitos 1 |
| MTA | Agregado de trióxido mineral |

I. INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica tiene como objetivo la eliminación de pulpa residual, productos de descomposición de tejidos y microorganismos presentes dentro del sistema de conductos radiculares, seguido de la realización de un relleno hermético posible (Ng et al., 2008). El sellado debe llevarse a cabo utilizando materiales de relleno que no interfieran y, de preferencia, estimulen el proceso de reparación periapical (Leonardo et al., 1999).

La obturación del conducto desempeña un papel esencial en el control de la reinfección al sepultar organismos residuales a través de la actividad antimicrobiana de los selladores endodónticos (Grossman, 1980).

El sellado hermético del sistema de conducto radicular requiere el uso de gutapercha como material básico y sellador (De Campos-Pinto et al., 2008).

Los selladores endodónticos se utilizan en la obturación del sistema de conductos radiculares para lograr un sellado impermeable o hermético a todo el conducto, incluido el foramen apical, las irregularidades del conducto y discrepancias menores entre la pared dentinal del conducto radicular y el material de relleno, así como facilitar la introducción de conos en el espacio del conducto garantizando su fluidez. Por lo tanto, ayudan a prevenir fugas, reducen la posibilidad de que bacterias residuales del conducto invadan los tejidos periapicales y resuelven la lesión periapical (Branstetter y von Fraunhofer, 1982; De Campos-Pinto et al., 2008).

Se han propuesto propiedades sellantes ideales; sin embargo, ningún sellador disponible actualmente posee todas estas características. Una de las cualidades ideales más importantes es la compatibilidad tisular del sellador. Aunque la extrusión del sellador en los tejidos periapicales durante los procedimientos de obturación es común, no es ideal (Ricucci, 2002).

En combinación con la gutapercha, los selladores endodónticos tienen un papel importante dentro de las técnicas de obturación (Collins et al., 2006) . Se sabe que tales técnicas pueden implicar la extrusión no intencionada de los materiales de obturación más allá del foramen apical (Peng et al., 2007). Se espera que los selladores endodónticos tengan un contacto mínimo con los tejidos perirradiculares al sellar el ápice. Sin embargo, cuando se extruyen en los espacios perirradiculares, es posible que los selladores no siempre se eliminen por reacción del tejido perirradicular y pueden alterar el tiempo de reparación del tejido y causar diferentes reacciones tisulares según la composición del sellador (Bernáth & Szabó, 2003; Ng et al., 2011; Ricucci et al., 2016).

La destrucción del ligamento periodontal se desencadena por la degradación de la matriz extracelular por metaloproteinasas (MMP), que implica inflamación perirradicular y destrucción ósea mediada por citocinas proinflamatorias (Kawashima y Stashenko, 1999).

IL-8, también conocida como CXCL8, es una quimiocina inflamatoria que induce la quimiotaxis y activación de células inflamatorias. Además, la IL-8 se sintetiza rápidamente en los sitios locales de inflamación para reclutar, activar y retener células inflamatorias en el sitio para combatir la infección de forma continua. La IL-8 es resistente al calor y a la proteólisis, y es capaz de resistir un ambiente ácido, lo que la hace ideal para funcionar en sitios de inflamación, donde debe resistir ambientes subóptimos (DeForge et al., 1993; Elsalhy et al., 2012; Garlet et al., 2012).

Existen diferentes tipos de pruebas a través de los cuales se puede realizar la cuantificación de diversas moléculas, sin embargo, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) presenta varias ventajas sobre otras técnicas debido a su simplicidad, selectividad y sensibilidad, por lo cual es uno de los más usados. ELISA se basa en el concepto de reacciones antígeno-anticuerpo, que representa la interacción química entre los anticuerpos producidos por las células B de los leucocitos y los antígenos. Esta respuesta inmune específica juega un papel

importante en la protección del cuerpo de invasores como patógenos y toxinas (Avrameas et al., 1978).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

II. ANTECEDENTES

Jeanneau et al., (2020) realizaron un trabajo diseñado para determinar la influencia de dos selladores en la producción de citocinas proinflamatorias en células del ligamento periodontal humano, en los pasos iniciales de inflamación, y para investigar el efecto de la presencia de hidrocortisona en estos eventos. Se estudiaron los efectos de los selladores Endomethasone N y Pulp Canal Sealer en células del ligamento periodontal humano (hPDL) estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). La secreción de citocinas (IL-6, TNF- α) de las células se cuantificó mediante ELISA. Como resultados obtuvieron que Endomethasone N disminuyó la secreción de IL-6 y TNF- α de las células hPDL mientras que no se observó ningún efecto con Pulp Canal Sealer.

Da Silva et al., (2017) evaluaron la citocompatibilidad de selladores a base de silicato de calcio (EndoSeal, EndoSequence BC Sealer y MTA Fillapex en fibroblastos Balb /c 3T3. AH Plus, se utilizó como material de referencia para la comparación. La citocompatibilidad de los materiales se evaluó usando el ensayo de metil-tiazoldifenil-tetrazolio (MTT). La producción de IL-1 β , IL-6 e IL-8 se analizó utilizando un ensayo ELISA. EndoSeal, Endosequence BC Sealer y AH Plus mostraron una viabilidad celular similar a la del grupo de control negativo ($P > 0.05$), mientras que el sellador MTA Fillapex fue citotóxico ($P < 0.05$). En todas las muestras se detectó una producción variable de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Los resultados sugieren que AH Plus, EndoSeal y EndoSequence BC Sealer pueden lograr una mejor respuesta biológica en comparación con MTA Fillapex.

Oh et al., (2020) evaluaron la biocompatibilidad de los selladores a base de silicato de calcio (CeraSeal y EndoSeal TCS) y el sellador a base de resina epoxi (AH-Plus) en células madre del ligamento periodontal humano (hPDLSc). Cada experimento se realizó en medios frescos o medios de fraguado. Los niveles de expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) fueron significativamente más altos en AH-plus en comparación a los otros selladores, excepto para IL-6 en el

medio de fraguado. Los selladores a base de silicato de calcio mostraron niveles estadísticamente similares de IL-6 e IL-8 en comparación con el grupo control.

En la prueba ELISA, en conclusión, AH-Plus mostró una mayor expresión de IL-6 e IL-8 que los selladores a base de silicato de calcio.

Diomede et al., (2014) probaron la toxicidad del sellador EndoRez a base de metacrilato en términos de crecimiento celular y liberación de citocinas proinflamatorias, en células madre de pulpa dental humana expandidas ex vivo (hDPSC), células madre del ligamento periodontal humano (hPDLSC), fibroblastos gingivales humanos (hGF) y osteoblastos humanos (hOST). Se analizaron las características morfológicas y el crecimiento celular y la liberación de interleucinas proinflamatorias IL-6, IL-8, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF- α). Se observó un incremento significativo de las citocinas IL6, IL8, IL12 y TNF- α en las células en contacto con el sellador dental en comparación con el control. In vitro, EndoRez interactuó con hDPSC, hPDLSC, hGF y hOST primarios humanos, lo que provocó daños en el sistema biológico que se evidenciaron a través de la inhibición del crecimiento celular y el incremento de los mediadores proinflamatorios IL6, IL8, IL12 y TNF- α .

Gaudin et al., (2020) evaluaron los efectos de diferentes selladores a base de silicato, BioRoot RCS, ProRoot ES y MTA Fillapex sobre la producción de citocinas y la viabilidad de las células madre del ligamento periodontal humano (PDLSC). AH Plus se utilizó como material de referencia. No se observaron diferencias significativas entre BioRoot RCS, ProRoot ES y el grupo de control negativo para IL-6 e IL-8 ($P > .05$). Tanto MTA Fillapex como AH Plus provocaron un incremento significativo de IL-6, IL-8 en el medio de cultivo en comparación con el grupo de control negativo. En conclusión, BioRoot RCS y ProRoot ES mostraron una mejor citocompatibilidad en comparación con MTA Fillapex y AH Plus que pueden desencadenar potencialmente una respuesta inflamatoria innata.

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La infección del conducto radicular induce cambios patológicos en los tejidos periapicales de los dientes. Como los microorganismos son el principal factor etiológico en la pulpitis y la periodontitis apical, su eliminación durante el tratamiento del conducto radicular mediante instrumentación, irrigación y medicación intraconducto es esencial (Byström y Sundqvist, 1983).

Los dientes con inflamación pulpar o periapical severa pueden tratarse con éxito con las técnicas establecidas de limpieza y conformación de los conductos radiculares (Huang et al., 2002).

Fibroblastos del ligamento periodontal humano

La infección bacteriana es la principal causa de periodontitis apical (PA) (Nair, 2006). Como la principal población celular del área apical, los fibroblastos del ligamento periodontal humano pueden reconocer microorganismos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones. La identificación de patrones moleculares asociados a patógenos es la clave para iniciar la respuesta inmune innata, que es la primera línea de defensa del huésped contra la invasión microbiana (Akira et al., 2006).

Los fibroblastos constituyen el tipo de célula residente predominante del tejido conectivo periodontal (Mark et al., 2000). Los fibroblastos gingivales mantienen la integridad del tejido conectivo gingival, mientras que los fibroblastos del ligamento periodontal exhiben funciones especializadas que son responsables de la formación y el mantenimiento de las uniones de las fibras del ligamento periodontal, así como de la reparación, remodelación y regeneración del hueso alveolar adyacente y el cemento (Boyko et al., 1981). Los fibroblastos del ligamento periodontal son las principales células involucradas en la reacción de las células con los materiales de obturación del conducto radicular (Yan et al., 2010).

Cementos selladores

Un material de relleno del conducto radicular debe presentar propiedades biológicas y fisicoquímicas apropiadas. En primer lugar, no debe irritar los tejidos perirradiculares. Idealmente, sería deseable que estimule la reparación y el sellado biológico mediante la deposición de tejido mineralizado en el foramen apical. Un sellador endodóntico apropiado debe presentar adhesividad y estabilidad dimensional para evitar la circulación de fluidos entre el conducto y el periapice. Además, debe ser tanto insoluble en fluidos de tejido como capaz de llenar todos los espacios vacíos, lo que se espera de un material con una propiedad de flujo adecuada (Grossman, 1976; Schilder y Hargreaves, 2006).

De hecho, dado que estos materiales estarán en contacto directo con los tejidos periapicales durante períodos prolongados de tiempo, su biocompatibilidad es de primordial importancia. Un sellador biocompatible no debe prevenir ni dificultar la reparación del tejido, sino que debe ayudar o estimular la reorganización de las estructuras lesionadas (Huang et al., 2002).

La compatibilidad biológica de los materiales utilizados en odontología es de especial interés, ya que los ingredientes tóxicos presentes en estos materiales pueden producir irritación o incluso degeneración de los tejidos circundantes (Willershausen et al., 2000).

Durante muchos años, la gutapercha se ha utilizado como material central con selladores a base de óxido de zinc basados en eugenol o hidróxido de calcio para obturar el sistema de conducto radicular durante la terapia endodóntica (Schilder y Hargreaves, 2006). Sin embargo, estos selladores se contraen al fraguar y se disuelven con el tiempo, lo que compromete la calidad y la esperanza de vida del sellado apical (Hovland y Dumsha, 1985; Orstavik et al., 2001). Ninguna de estas combinaciones de materiales se adhiere a la dentina radicular y previene la fuga apical en la obturación del conducto (Torabinejad y Pitt Ford, 1996; Pommel et al., 2003).

Tipos de cementos selladores

Se han desarrollado selladores endodónticos para mejorar el sellado y la unión a la dentina radicular (Teixeira et al., 2004).

Se utilizan varias clases de selladores endodónticos en la práctica clínica, pero todos tienen limitaciones significativas. Los selladores endodónticos a base de óxido de zinc-eugenol se han utilizado durante muchos años, pero liberan concentraciones potencialmente citotóxicas de eugenol (Hume, 1986; Schmalz et al., 2000).

Los selladores a base de hidróxido de calcio promueven la calcificación pero tienden a disolverse con el tiempo y comprometen el sellado endodóntico (Hovland y Dumsha, 1985; Huang et al., 2002).

Los selladores de ionómero de vidrio pueden unir la estructura dental pero también pueden activar la liberación de prostaglandinas en los tejidos periapicales (Willershausen et al., 2000). Aunque los selladores a base de resina están ganando cada vez más popularidad, su toxicidad y mutagenicidad están bien documentados (Huang et al., 2002; Schäfer y Zandbiglari, 2003).

Los materiales a base de biocerámica que generalmente contienen silicato de calcio y / o fosfato de calcio han atraído considerable atención debido a sus propiedades físicas y biológicas, como su pH alcalino, estabilidad química dentro del entorno biológico y falta de contracción. También son no tóxicos y biocompatibles (Zhang et al., 2009; Loushine et al., 2011; Candeiro et al., 2012).

Existen diversos tipos de cementos selladores de distintas composiciones que han sido sometidos a pruebas de biocompatibilidad debido a que son los que se utilizan con mayor frecuencia, algunos de ellos son:

Pulp Canal Sealer Kerr, a base de óxido de zinc, que consiste en 34.0 a 41.2% de óxido de zinc, 25.0 a 30.0% de plata precipitada, 30.0 a 60.0% de oleorresina y el 1.0 a 12.8% de yoduro de timol (Kerr Manufacturing Co., Romulus, MI) (Kaplowitz, 1994).

El agregado de trióxido mineral (MTA) se desarrolló en la Universidad de Loma Linda en la década de 1990 como material de relleno del conducto radicular (Camilleri y Pitt Ford, 2006), y fue introducido en endodoncia en 1993 por Torabinejad (Roberts et al., 2008). El primer sellador a base de silicato tricálcico fue MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brasil), se compone principalmente de una matriz de resina de salicilato, sílice y agregado de trióxido mineral, siendo este último un componente menor. Aunque el alcance principal del uso de un sellador a base de silicato tricálcico es la liberación de hidróxido de calcio del material, se ha demostrado que la hidratación de MTA Fillapex es inerte, y no se formó hidróxido de calcio cuando el material se endureció. Es estable cuando se usa con técnicas de compactación vertical caliente (Viapiana et al., 2014).

BioRoot RCS (Septodont, St. Maur-des-Fosses, Francia) es un cemento a base de silicato tricálcico hidráulico en polvo / líquido comercializado desde febrero de 2015 y recomendado para la técnica de cono único o de condensación lateral fría. El polvo contiene silicato tricálcico, povidona y óxido de circonio; el líquido es una solución acuosa de cloruro de calcio y policarboxilato. Se ha informado que BioRoot RCS induce la producción de factores de crecimiento angiogénico y osteogénico por las células del ligamento periodontal humano (Camps et al., 2015) y tiene actividad antimicrobiana (Arias-Moliz y Camilleri, 2016).

El sellador a base de resina epoxi AH Plus (Dentsply De Trey GmbH, Konstanz, Alemania) es una modificación mejorada de su precursor AH26 y muestra alta fluidez (Almeida et al., 2007). Una capacidad de flujo adecuada de los selladores endodónticos es una propiedad muy deseable que permite el llenado de irregularidades. Sin embargo, un flujo excesivo puede favorecer la extrusión apical.

La extrusión del sellador podría dañar los tejidos periapicales debido a la citotoxicidad del sellador por la baja biocompatibilidad, principalmente en la etapa inicial (Scarparo et al., 2009).

Citocinas

Las citocinas son pequeñas moléculas de señalización que median las respuestas del huésped a la infección, la inflamación y el trauma. Las citocinas proinflamatorias inician o mejoran la inflamación sistémica, mientras que las citocinas antiinflamatorias reducen la inflamación y promueven la curación.

La red de citocinas juega un papel crucial en la movilización de células inflamatorias hacia la lesión periapical, la regulación de las reacciones inmunitarias / inflamatorias locales y el resultado de la lesión periapical. En este contexto, citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), producidas por células estromales e infiltrantes, así como quimiocinas como IL-8 / CXCL8 y MCP-1 / CCL2, son importantes para el reclutamiento y activación de células inmunes innatas, presumiblemente granulocitos, neutrófilos y monocitos en la fase inflamatoria temprana, lo que conduce a la promoción de la inflamación. Estos factores también son responsables de la migración de las células T y B en las fases inflamatorias posteriores y su desarrollo en diferentes células efectoras de la inmunidad adaptativa.

Las citocinas proinflamatorias incluyen IL-1, IL-8 y TNF- α , mientras que IL-10 es una citocina antiinflamatoria importante. Algunas citocinas pueden tener propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, como la IL-6, ya que puede inhibir el TNF- α y la IL-1 y activar la IL-10 al mismo tiempo. Las citocinas trabajan entre sí en una regulación de red homeostática para prevenir el estado constante de inflamación (Parolia et al., 2014).

Las citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-17, IFN- γ y TNF- α , se detectan en el líquido intersticial de las lesiones periapicales. La IL-8 es producida principalmente por monocitos / macrófagos y en cantidades más pequeñas por fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, melanocitos,

hepatocitos y condrocitos. Sus estímulos suelen ser IL-1, TNF- α e IFN-g. La IL-8 puede ser inhibida por los corticosteroides y la ciclosporina A. Es una quimiocina, lo que aumenta la quimioquinesis y actúa como factor quimiotáctico. El término "quimiocina" proviene de la contracción de "citocinas quimiotácticas". La IL-8 proporciona un potente estímulo migratorio para las células del sistema inmunológico, principalmente neutrófilos, determinando también un aumento en la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales (Deininger et al., 2008; Yamaguchi et al., 2014; Bambirra et al., 2015).

La IL-8 juega un papel fundamental en el reclutamiento de neutrófilos para inducir la inflamación aguda y promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos (Harada et al., 1994; Li et al., 2003).

Prueba ELISA

ELISA permite el análisis cuantitativo/cualitativo altamente sensible y selectivo de antígenos, incluidas proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hormonas, herbicidas y metabolitos secundarios. Para detectar estas moléculas, se marca un antígeno o anticuerpo mediante enzimas, el llamado inmunoensayo enzimático, en el que se utilizan habitualmente fosfatasa alcalina (ALP), peroxidasa de rábano (HRP) y β -galactosidasa. El antígeno en la fase fluida se inmoviliza sobre una fase sólida, como una placa de microvaloración que constituye poliestireno rígido, cloruro de polivinilo y polipropileno. Posteriormente, se permite que el antígeno reaccione con un anticuerpo específico, que es detectado por un anticuerpo secundario marcado con enzima. El desarrollo de color utilizando un sustrato cromogénico corresponde a la presencia del antígeno (Nakane y Kawaoi, 1974; Avrameas et al., 1978; Crowther, 2009).

IV. HIPÓTESIS

IV.1. Hipótesis de trabajo

Los cementos selladores Pulp Canal Sealer y AH Plus inducen mayor producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano en comparación con la inducida por los cementos selladores MTA Fillapex y BioRoot RCS.

IV.2 Hipótesis nula

Los cementos selladores MTA Fillapex y BioRoot RCS inducen mayor producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano en comparación con la inducida por los cementos selladores Pulp Canal Sealer y AH Plus.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál cemento sellador Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS o AH Plus induce mayor producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano.

V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las técnicas de cultivo celular.
- Exponer el cultivo celular a los cementos selladores endodónticos Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS y AH Plus.
- Cuantificar la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al usar Pulp Canal Sealer.
- Cuantificar la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al usar MTA Fillapex.
- Cuantificar la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al usar BioRoot RCS.
- Cuantificar la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al usar AH Plus.
- Comparar la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al usar cemento sellador Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS y AH Plus.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 DISEÑO

Experimental *in vitro*

VI.2 POBLACIÓN

Cultivo de fibroblastos del ligamento periodontal humano donados por el Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez cultivados en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM.

VI.3 TAMAÑO DE MUESTRA

2 Cajas de cultivo celular de 24 pozos por duplicado con 500 mil células en cada pozo. 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 de los cultivos celulares

- Cultivo de fibroblastos con viabilidad celular identificada.
- Cultivo con morfología celular correspondiente a fibroblastos.

Criterios de Exclusión de los cultivos celulares

Cultivos donde no se presente proliferación de fibroblastos.

Criterios de Eliminación de los cultivos celulares

Cultivos de fibroblastos contaminados.

VI.3.2 VARIABLES ESTUDIADAS

Dependiente

| Variable | Definición conceptual | Definición operacional | Tipo de variable | Escala de medición | Unidad de medida |
|----------|---|---|------------------|--------------------|------------------|
| IL-8 | Quimiocina inflamatoria que induce la quimiotaxis y activación de células inflamatorias, se sintetiza rápidamente en los sitios locales de inflamación para reclutar, activar y retener células inflamatorias en el sitio para combatir la infección de forma continua. | Cuantificación de IL-8 por medio de Kit ELISA | Cuantitativa | Continua de Razón | Pg/ml |

Variables Independientes

| Variable | Definición conceptual | Definición operacional | Tipo de variable | Escala de medición | Unidad de medida |
|------------------|---|--|------------------|--------------------|------------------|
| Cemento Sellador | Cemento a base de óxido de zinc y eugenol que contiene partículas de plata para aportar | Se mezclará con espátula en una loseta estéril agregando una | Cualitativa | Nominal | _____ |

| | | | | | |
|--|--|--|--------------------|----------------|----------|
| <p>Pulp Canal Sealer (Kerr)</p> | <p>radiopacidad, puede obturar conductos laterales y accesorios, pero puede teñir la estructura dental. En su composición presenta: Polvo: óxido de zinc, plata precipitada, timol yodado, resina blanca. Líquido: eugenol y bálsamo de Canadá.</p> | <p>gota de su líquido por cada cucharilla de polvo hasta lograr una mezcla homogénea. Evaluados a intervalos de 3, 6, 12 y 24 horas.</p> | | | |
| <p>Cemento sellador Endodóntico MTA Fillapex (Angelus)</p> | <p>Cemento que permite un llenado completo del conducto radicular, proporciona liberación de iones de calcio para los tejidos y mantiene un pH con efectos antibacterianos. No contiene eugenol y no interferirá con los procedimientos adhesivos dentro del conducto radicular.</p> | <p>Presentación en jeringa de automezclado 1:1 o pasta-pasta que serán mezclados en proporciones 1:1 de pasta base y catalizador con espátula en loseta estéril hasta lograr mezcla homogénea, será evaluados a intervalos de 3, 6, 12 y 24 hrs.</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Nominal</p> | <p>—</p> |
| <p>Cemento sellador</p> | <p>Cemento que induce la producción de factores de crecimiento</p> | <p>Se mezclará con espátula en una loseta estéril</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Nominal</p> | <p>—</p> |

| | | | | | |
|---|--|---|--------------------|----------------|--------------|
| <p>Endodóntico BioRoot RCS</p> | <p>angiogénico y osteogénico por las células del ligamento periodontal humano y tiene actividad antimicrobiana. Polvo: silicato tricálcico, povidona y óxido de circonio. líquido: solución acuosa de cloruro de calcio y policarboxilato.</p> | <p>agregando una gota de su líquido por cada cucharilla de polvo hasta lograr una mezcla homogénea. Evaluados a intervalos de 3, 6, 12 y 24 horas.</p> | | | |
| <p>Cemento sellador Endodóntico AH-Plus</p> | <p>Cemento basado en un polímero de epoxi-amina, usado para sellado permanente, ofrece mejor biocompatibilidad, radioopacidad y estabilidad de color y es más fácil de eliminar. Su manejo también es más fácil y rápido.</p> | <p>Serán mezclados en proporciones 1:1 de pasta base y catalizador con espátula y en loseta estéril hasta lograr una mezcla homogénea. Evaluados a intervalos de 3, 6, 12 y 24 horas.</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Nominal</p> | <p>_____</p> |

VI.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

- DMEM 50 ml
- Suero fetal bovino 20 ml
- Penicilina 5000 UI
- Estreptomicina 5000 UI
- Cementos selladores endodónticos: Pulp Canal Sealer (Kerr, Scafati, Italia), MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brasil), BioRoot RCS (Septodont, St. Maur-des-Fosses, Francia) y AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemania).
- Lipopolisacarido.
- Incubadora de cultivo celular.
- 2 Cajas de cultivo celular de 24 pozos.
- Caja de cultivo celular de 48 pozos.
- Caja de cultivo celular de 96 pozos.
- Micropipetas.
- Microtubos de centrifugado.
- Medio de cultivo celular RPMI.
- Suero autólogo.
- Aminoácidos no esenciales.
- Kit comercial ELISA ABTS developmet kit (Peprotech, EU) para cuantificación de IL-8

VI.5 PROCEDIMIENTO

La fase experimental del estudio se dividió en cinco fases:

Fase I: Elaboración de medio de cultivo y eluidos.

Fase II: Obtención del tejido y aislamiento de los fibroblastos.

Fase III: Estimulación de los fibroblastos.

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

Fase V: Análisis de los resultados.

Fase I. Elaboración de medio de cultivo y eluidos

1.- Se utilizó medio de cultivo DMEM al cual se le agregó 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina 100IU/ml, estreptomina 100Ug/ml y anfotericina B 100ug/mg).

2.- Se mezclaron los cementos endodónticos como lo indica el fabricante:

- Pulp Canal Sealer: cemento polvo - liquido mezclados en proporción 1:1 con espátula y loseta estéril.
- MTA Fillapex: cemento de pasta - pasta o presentado en jeringas de mezclado automático que proporciona la consistencia adecuada para la inserción de cemento en el conducto radicular.
- BioRoot RCS: cemento polvo - liquido mezclados en proporción 1:1 con espátula y loseta estéril.
- AH- Plus: cemento pasta-pasta mezclados en proporción 1:1 con espátula y loseta estéril.

3.- Después de la mezcla de los cementos selladores, se cubrió el fondo de las cajas de cultivo de 24 pozos y se dejó fraguar el cemento en el tiempo indicado por el fabricante. Se agregó 1ml de medio de cultivo y se incubó por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se almacenó a -20°C.

Completadas las 24 horas se recolectó todo el líquido dentro de los pozos con una micropipeta y se colocó en tubos de centrifugado activado a 1000 rpm durante 5 minutos para así obtener los eluidos de los cementos selladores.

Fase II. Obtención del tejido y aislamiento de los fibroblastos

Se obtuvieron fibroblastos del ligamento periodontal humano donados por el Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez cultivados en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM.

Fase III. Estimulación de los fibroblastos

Se utilizaron placas de cultivo de fondo plano de 24 pozos.

En cada pozo se colocaron:

- 400ul de DEMEM + 10% SFB 100 ul/ml de penicilina y 100 ul/ml de anfotericina
- 500, 000 células (1x10⁶/ml)
- 100ul del eluido del cemento correspondiente.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado en dos diferentes placas de 24 pozos la cual se mantuvo en la incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y ambiente húmedo.

Cada duplicado se recolectó al cumplir el tiempo experimental en un mismo tubo eppendorf para sobrenadante y uno para células (centrifugar) los cuales se mantuvieron en congelación y se conservaron los eluidos a – 80°C.

Los controles positivos se estimularon con LPS y para los controles negativos no se estimularon con nada.

Fase IV. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se utilizó el Kit comercial ELISA ABTS developmet kit (Peprotech, EU) para cuantificación de IL-8 y su correspondiente kit de soluciones amortiguadoras siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante:

1.- Se diluyó el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de 1.0 µg/ml. Inmediatamente se agregaron 100 µl 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 µl 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 μ l de la solución estándar de cada una de las muestras en un pozo previamente identificado.

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

5.- Se aspiró y lavó la placa cuatro veces y se diluyó el anticuerpo en diluyente a una concentración de 0.50 μ g/ml.

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

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

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

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

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

Fase V. Análisis de los resultados.

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

VI.5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de los eluidos y del tiempo de exposición sobre la producción de la IL-8, fue determinado a través del análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos vías) con el análisis Post hoc de Tukey. Esto corresponde a un modelo factorial completo (se realizaron todas las posibles combinaciones entre valores y variables) y completamente al azar (los grupos se formaron mediante asignación completamente aleatoria). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Grap Pad Prism y se consideró significancia estadística cuando p fue ≤ 0.05 .

VI.5.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las células utilizadas en este estudio (fibroblastos del ligamento periodontal humano) fueron donadas por el Dr. Rubén Domínguez, las cuales son almacenadas en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de FESC-UNAM.

VII. RESULTADOS

En la figura 1 se representa la comparación de la concentración de IL-8 cuantificada por medio del análisis de las placas de ELISA en los sobrenadantes de los fibroblastos del ligamento periodontal humano estimuladas con los eluidos de los diferentes cementos selladores en los cuatro distintos tiempos experimentales.

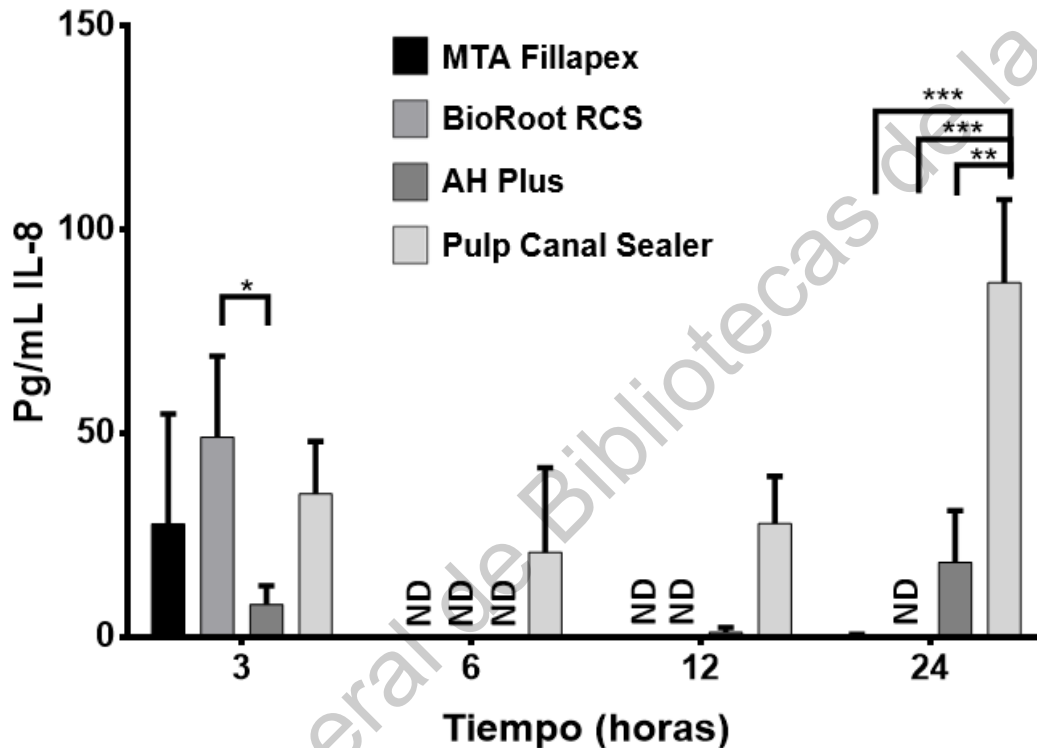


Figura 1. Comparación de la concentración de IL-8 producida por los hPDLFs tras la estimulación con eluidos de los 4 cementos selladores en los 4 tiempos experimentales. ND: No detectable, (*) diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, (**) diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$, (***) diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$.

En el grupo de 3 horas de exposición, el eluido del cemento sellador BioRoot RCS estimuló la mayor producción de IL-8, mientras que el de AH-Plus la menor existiendo diferencias entre ellos ($p < 0.05$).

A las 6 horas de estimulación el eluido del cemento sellador BioRoot RCS disminuyó la producción del IL-8 por debajo del rango de detección. MTA Filapex y AH-Plus también se encuentran por debajo del rango detectable a las 6 horas, sin embargo, no existieron diferencias al compararlos entre sí a las 3 y 6 horas ($p > 0.05$).

A las 12 horas de estimulación, los eluidos de BioRoot RCS y MTA Fillapex continuaron por debajo del rango de detección, y junto con el AH-Plus fueron los que menos producción de IL-8 estimularon, mientras que Pulp Canal Sealer fue el que más lo hizo.

A las 24 horas MTA Fillapex y BioRoot RCS continúan por debajo del rango de detección del estímulo, AH-Plus estimula ligeramente la producción de IL-8 sin tener diferencia significativa, mientras que Pulp Canal Sealer estimula la producción significativamente ($p<0.05$).

Al analizar el efecto del tiempo sobre la producción de IL-8 al estimular con cada cemento sellador (tabla 1), se observó que para el MTA Fillapex y el AH-Plus no existen diferencias de producción en ningún tiempo experimental ($p>0.05$), mientras que para el BioRoot RCS se observó un incremento a las 3 horas y disminución por debajo del rango detectable a las 6 horas el cual se mantuvo a través del tiempo ($p<0.05$). Además, en la estimulación realizada con Pulp Canal Sealer si se observó un aumento gradual a través del tiempo, encontrando la diferencia más significativa entre las 6 y las 24 horas ($p<0.05$).

Tabla 1. Diferencias significativas en la comparación entre los distintos tiempos experimentales para cada sellador endodóntico y el control positivo.

| | MTA Fillapex | BioRoot | AH Plus | Pulp Canal Sealer |
|---------------|-------------------------|----------------|----------------|------------------------------|
| 3 h vs. 6 h | - | * | - | - |
| 6 h vs. 12 h | - | - | - | - |
| 12 h vs. 24 h | - | - | - | ** |
| 3 h vs. 12 h | - | * | - | - |
| 3 h vs. 24 h | - | * | - | ** |
| 6 h vs. 24 h | - | - | - | *** |

(*) diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$, (**) diferencia estadísticamente significativa $p<0.01$, (***) diferencia estadísticamente significativa $p<0.001$.

VIII. DISCUSIÓN

El tratamiento del conducto radicular actualmente ha avanzado no solo por la conveniencia clínica sino también por lograr un buen pronóstico a partir del desarrollo de diversos materiales y técnicas. Entre los materiales recientemente introducido se encuentran los selladores a base de silicato de calcio, pero aún hay una falta de evidencia de sus características y uso clínico.

Para este estudio se utilizaron diferentes tipos de cementos selladores como Pulp Canal Sealer, MTA Fillapex, BioRoot RCS y AH-Plus con la finalidad de conocer su respuesta inflamatoria mediante la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano.

Se utilizaron fibroblastos del ligamento periodontal humano en este estudio ya que estas son las células predominantes presentes en el ligamento periodontal y pueden tener contacto directo con los selladores durante la obturación del conducto radicular y el sellado apical.

En el presente estudio se encontró que a las 3hrs horas de exposición de los hPDLFs a los eluidos de los cementos selladores todos los grupos presentaron producción de IL-8 siendo el de BioRot RCS el de mayor producción, mientras que a las 6 horas hubo un descenso significativo donde se presentaba una producción nula de IL-8 al igual que con MTA Fillapex y AH-Plus. A las 12 horas no existieron cambios de producción significativos, sin embargo, a las 24 horas se muestra un aumento significativo de IL-8 en el grupo de Pulp Canal Sealer. AH-Plus a las 24hrs genera un ligero aumento en la producción de IL-8 la cual no es significativa.

Se mostró que en comparación a las 3 horas y 24 horas se encontraban diferencias significativas entre grupos, encontrando que a las 3 horas BioRoot RCS presentaba la mayor producción de IL-8 y a las 24 horas, su producción era nula ($p < 0.05$), mientras que Pulp Canal Sealer incremento significativamente la producción de IL-8 a las 24 horas sobre hPDLFs en comparación a las 3 horas.

Camps et al. (2015) mencionan que BioRoot RCS induce la producción de factores de crecimiento osteogénicos por las células del ligamento periodontal humano y crea un microambiente favorable para la reparación del tejido perirradicular. Esto puede ser la razón por la cual en nuestro estudio BioRoot RCS no mostró producción de IL-8 a las 24 horas después de estimular a los hPDLFs.

Jing et al. (2019) en contraste, realizaron un estudio donde examinaron la citocompatibilidad in vitro, el potencial osteogénico y respuesta inflamatoria de un material bioactivo experimental C-Root y lo compararon con BioRoot RCS y AH-Plus, utilizando células madre del ligamento periodontal humano (hPDLSC) y encontraron que los niveles de IL-8 difirieron significativamente entre los grupos en los días 7 y 14, con los niveles más altos en el grupo BioRoot RCS en comparación con C-Root y AH-Plus ($P < 0,05$).

Lee et al. (2019). En su estudio evaluaron la respuesta inflamatoria al utilizar diferentes cementos selladores como cementos de silicato de calcio EndoSeal MTA, Nano-ceramic Sealer, Wellroot ST, y de resina epoxi como AH-Plus y AD Seal. Las concentraciones de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α se analizaron utilizando un kit ELISA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. AH-Plus presentó una expresión significativamente mayor de IL-6 e IL-8 que los otros selladores ($p < 0.05$). Sin embargo, en nuestro estudio AH-Plus presento mayor producción de IL-8 en comparación a MTA Filapex y BioRoot RCS, pero las diferencias no fueron significativas.

Las citocinas proinflamatorias están involucradas en la regulación positiva de las reacciones inflamatorias. Existe abundante evidencia de que ciertas citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 e IL-8, están involucradas en el proceso del dolor patológico (Seong et al., 2016). Se sabe que los procesos inflamatorios son iniciados y mantenidos por citocinas proinflamatorias que tienen actividades biológicas distintas o compartidas (Rojewski et al., 2008). En el presente estudio, la citocina proinflamatorias IL-8, fue secretada significativamente al estimular hPDLFs

con Pulp Canal Sealer más que con los otros selladores, lo que se asocia marcadamente con una baja viabilidad celular al utilizar Pulp Canal Sealer.

En situaciones clínicas generales, el área de contacto con el sellador está limitada alrededor de la región apical, lo que puede no ser perjudicial para la supervivencia y proliferación hPDLFs en los tejidos periodontales apicales, especialmente después de que el sellador se haya endurecido por completo (Johnson y Kylid, 2010). Sin embargo, Pulp Canal Sealer podría tener un efecto perjudicial sobre los hPDLFs en algunas situaciones clínicas donde se espera que el sellador quede expuesto al tejido periodontal apical.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IX. CONCLUSIONES

En este estudio se decidió evaluar *in vitro* la producción de IL-8 en fibroblastos del ligamento periodontal humano al ser estimulados con eluidos de diferentes cementos selladores donde se observó que los materiales biocerámicos (MTA Fillapex y BioRoot RCS) no estimularon la producción de IL-8 al igual que el cemento de resina epoxi AH-Plus que generó cantidades mínimas por lo que podrían considerarse no estimuladores del sistema inmune durante la obturación del conducto radicular. Sin embargo, el cemento sellador Pulp Canal Sealer a base de Óxido de Zinc y Eugenol estimuló significativamente la producción de esta citocina, por lo que su uso debe ser cuidadoso tratando de evitar el contacto directo de este cemento con los tejidos periapicales para evitar una respuesta inflamatoria.

X. PROPUESTAS

Actualmente existe una gran variedad de cementos selladores endodónticos para la práctica clínica, cada uno con diferentes características, ventajas y desventajas y, cada vez se van conociendo nuevos productos que nos ayudarían a mejorar el pronóstico de un tratamiento, por lo que se deberían realizar más estudios sobre la gran diversidad de cementos actuales utilizando las diferentes clases de citocinas proinflamatorias a tiempos de experimentación más prolongados y en diferentes líneas celulares que nos ayuden a conocer cual cemento es el más seguro de utilizar.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783.

Almeida, J., Gomes, B., Ferraz, C., Souza-Filho, F., and Zaia, A. 2007. Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers. *Int. Endod. J.* 40(9): 692.

Arias-Moliz, M., and Camilleri, J. 2016. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *J. Dent.* 52: 30.

Avrameas, S., Ternynck, T., and Guesdon, J. 1978. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* 8(April): 7.

Bambirra, W., Maciel, K., Thebit, M., De Brito, L., Vieira, L., and Sobrinho, A. 2015. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heat shock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J. Endod.* 41(7): 1085.

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

Boyko, G., Melcher, A., and Brunette, D. 1981. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. *J. Periodontal Res.* 16(1): 73.

Branstetter, J., and von Fraunhofer, J. 1982. The physical properties and sealing action of endodontic sealer cements: a review of the literature. *J. Endod.* 8(7): 312.

Byström, A., and Sundqvist, G. 1983. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 55(3): 307.

Camilleri, J., and Pitt Ford, T. 2006. Mineral trioxide aggregate: A review of the constituents and biological properties of the material. *Int. Endod. J.* 39(10):747.

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.

Candeiro, G., Correia, F., Duarte, M., Ribeiro-Siqueira, D., and Gavini, G. 2012. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J. Endod.* 38(6): 842.

Collins, J., Walker, M., Kulild, J., and Lee, C. 2006. A comparison of three gutta-percha obturation techniques to replicate canal irregularities. *J. Endod.* 32(8): 762.

Crowther, J. 2009. *Stages in ELISA*. Springer. 516.

Da Silva, E., Zaia, A., and Peters, O. 2017. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin. Oral Investig.* 21(5): 1531.

De Campos-Pinto., de Oliveira., Versiani., Silva-Sousa, Y., de Sousa-Neto, M., and da Cruz Perez, D. 2008. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 105(5).

DeForge, L, Preston, A., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L., and Remick, D. 1993. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 268(34): 25568.

Deininger, S., Traub, S., Aichele, D., Rupp, T., Baris, T., Möller, H. M., and von Aulock, S. 2008. Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity. *Immunobiology* 213(6): 519.

Diomede, F., Caputi, S., Merciaro, I., Frisone, S., D'Arcangelo, C., Piattelli, A., and Trubiani, O. 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.

Elsalhy, M., Azizieh, F., and Raghupathy, R. 2013. Cytokines as diagnostic

markers of pulpal inflammation. *Int. J. Endod. J.* 46(6): 573.

Gaudin, A., Tolar, M., and Peters, O. 2020. Cytokine Production and Cytotoxicity of Calcium Silicate-based Sealers in 2- and 3-dimensional Cell Culture Models. *J. Endod.* 46(6): 818.

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

Grossman, L. 1980. Antimicrobial effect of root canal cements. *J. Endod.* 6(6): 594.

Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56(5): 559.

Hovland, E., and Dumsha, T. 1985. Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex. *Int. Endod. J.* 18(3): 179.

Huang, F., Tai, K., Chou, M., and Chang, Y. 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.

Huang, T., Yang, J., Li, H., and Kao, C. 2002. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials.* 23(1): 77.

Hume, W. 1986. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J. Am. Dent. Assoc.* 113(5), 789.

Huumonen, S., Lenander-Lumikari, M., Sigurdsson, A., and Ørstavik, D. 2003. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: A comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. *Int. Endod. J.* 36(4): 296.

Jeanneau, C., Giraud, T., Milan, J., and About, I. 2020. Investigating unset endodontic sealers' eugenol and hydrocortisone roles in modulating the initial steps of inflammation. *Clin. Oral Invest.* 24(2): 639.

Jing, Y., Gong, T., Duan, C., Wang, H., Zhang, C., and Neelakantan, P. 2019. In vitro cytocompatibility and osteogenic potential of calcium silicate-based dental cements in a root canal-filling model. *J. Int. Med. Res.* 48(4).

Johnson, W., and Kyliid, J. 2010. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. *Cohen's Pathways of the Pul.* 10: 349.

Kaplowitz, G. 1994. Effect of essential oils on the setting time of Kerr pulp canal sealer. *J. Endod.* 20(3): 109.

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

Lee, J., Kim, S., Lee, S., Kim, H., and Kim, E. 2019. In vitro comparison of biocompatibility of calcium silicate-based root canal sealers. *Materials.* 12(15): 1.

Leonardo, M., Bezerra, A., Filho, T., Santana, R., and Preto, R. 1999. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. 221

Li, A., Dubey, S., Varney, M., Dave, B., and Singh, R. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* 170(6): 3369.

Loushine, B., Bryan, T., Looney, S., Gillen, B., Loushine, R., Weller, R., and Tay, F. 2011. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J. Endod.* 37(5): 673.

Nair, P. 2006. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int. Endod. J.* 249.

Nakane, P., and Kawaoi, A. 1974. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22(12): 1084.

Ng, Y., Mann, V., Rahbaran, S., Lewsey, J., and Gulabivala, K. 2008. Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature - Part 2. Influence of clinical factors. *Int. J. Endod. J.* 41(1): 6.

Ng, Y., Mann, V., and Gulabivala, K. 2011. A prospective study of the factors

affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: Part 2: Tooth survival. *Int. J. Endod. J.* 44(7): 610.

Oh, H., Kim, E., Lee, S., Park, S., Chen, D., Shin, S., and Kim, S. 2020. Comparison of biocompatibility of calcium silicate-based sealers and epoxy resin-based sealer on human periodontal ligament stem cells. *Materials*, 13(22): 1.

Garlet, G., Aranha, A., Silveira, E., Andreia, C., Queiroz-Junior., Madeira, M., Fukada, S., and Silva, T. 2012. The role of chemokines and cytokines in the pathogenesis of periodontal and periapical lesions: current concepts. *Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases*. 10:219.

P. Mark, B., Laurence, J., and Sampath, N. 2000. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*. 24: 28.

Parolia, A. 2015. Role of cytokines, endotoxins (LPS), and lipoteichoic acid (LTA) in endodontic infection. *J. Dent. Oral Disord. Ther.* 2(4): 01.

Peng, L., Ye, L., Tan, H., and Zhou, X. 2007. Outcome of root canal obturation by warm gutta-percha versus cold lateral condensation: a meta-analysis. *J. Endod.* 33(2): 106.

Pommel, L., About, I., Pashley, D., and Camps, J. 2003. Apical leakage of four endodontic sealers. *J. Endod.* 29(3): 208.

Ricucci. 2002. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 1. Literature review. *Int. Endod. J.* 31(6): 384.

Ricucci, D., Rôças, I., Alves, F., Loghin, S., and Siqueira, J. 2016. Apically extruded sealers: fate and influence on treatment outcome. *J. Endod.* 42(2): 243.

Roberts, H., Toth, J., Berzins, D., and Charlton, D. 2008. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent. Mater.* 24(2): 149.

Rojewski, M., Weber, B., and Schrezenmeier, H. 2008. Phenotypic

characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfus. Med.Hemother.* 35(3): 168.

Scarparo, R., Grecca, F., and Fachin, E. 2009. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J. Endod.* 35(2): 229.

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

Schilder, H., and Hargreaves, K. 2006. Filling root canals in three dimensions. *J. Endod.* 32(4): 281.

Schmalz, G., Hoffmann, M., Weis, K., and Schweikl, H. 2000. Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. *J. Endod.* 26(5): 284.

Seong, S., Kim, J., and Kim, N. 2016. Pro-inflammatory Cytokines Modulating Osteoclast Differentiation and Function. *J. Rheum. Dis.* 23(3): 148.

Teixeira, F., Teixeira, E., Thompson, J., and Trope, M. 2004. Fracture resistance of roots endodontically treated with a new resin filling material. *J. Am. Dent. Assoc.* 135(5): 646.

Torabinejad, M., and Pitt Ford, T. 1996. Root end filling materials: A review. *Endod. Dent. Traumatol.* 12(4): 161–178.

Viapiana, R., Guerreiro-Tanomaru, J., Tanomaru-Filho, M., and Camilleri, J. 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.

Willershausen, B., Marroquín, B., Schäfer, D., and Schulze, R. 2000. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J. Endod.* 26(12): 703.

Wu, M., Tigos, E., and Wesselink, P. 2002. An 18-month longitudinal study

on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: A leakage study in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 94(4): 499.

Yamaguchi, H., Ozeki, N., Kawai, R., Tanaka, T., Hiyama, T., Nakata, K., and Nakamura, H. 2014. Proinflammatory cytokines induce stromelysin-1-mediated cell proliferation in dental pulp fibroblast-like cells. *J. Endod.* 40(1): 89.

Yan, P., Yuan, Z., Jiang, H., Peng, B., and Bian, Z. 2010. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int. Endod. J.* 43(12): 1116.

Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N., and Haapasalo, M. 2009. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against enterococcus faecalis. *J. Endod.* 35(7): 1051.

Dirección General de Bibliotecas de la UJAQ