

1464

12es.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE SEIS SELLADORES ENDODÓNTICOS EN CÉLULAS  
DEL SISTEMA INMUNE MURINO. ESTUDIO *IN VITRO*

TESIS QUE PRESENTA

C. D. ROGELIO VERA MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN ODONTOLOGÍA  
(ENDODONCIA)

TUTOR:

DR. HIGINIO ARZATE

1998

MÉXICO D. F.

267078

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

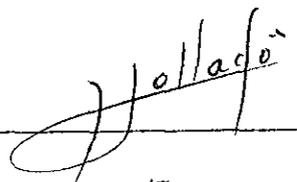
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



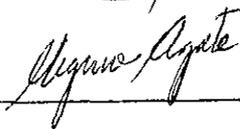
EFFECTO DE SEIS SELLADORES ENDODÓNTICOS EN CÉLULAS  
DEL SISTEMA INMUNE MURINO. ESTUDIO IN VITRO

APROBADA POR:

Mtro. Javier Collado Webber  
Asesor



Dr. Higinio Arzate  
Director



## RECONOCIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Tabla de contenido

	Página
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	15
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Material y métodos	19
Resultados	25
Discusión	27
Conclusiones	31
Propuesta de investigación a futuro	32
Bibliografía	33
Curriculum Vitae	42
Anexos	43

## Resumen

Los materiales endodónticos han sido objeto de diversos estudios respecto a su grado de biocompatibilidad. Estos materiales son difíciles de estudiar en sistemas in vitro, debido a las múltiples variaciones de su composición química. El potencial tóxico de éstos componentes podría afectar ciertas vías metabólicas y provocar cambios celulares. El propósito del presente estudio fué el evaluar si existe toxicidad inducida in vitro por seis selladores utilizados ampliamente en la práctica clínica, en células mononucleares del sistema inmune murinas. Se utilizaron células provenientes de ratones macho Balb/c de 8 semanas de edad: macrófagos de exudado peritoneal, inducidos con tioglicolato para los ensayos de citotoxicidad, actividad fagocitaria y producción de óxido nítrico y esplenocitos para los ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. Los selladores endodónticos utilizados fueron: Root Canal Sealer, Óxido de Zinc, Endomethasone, Silco, Roth y Óxido de Zinc + Formocresol, los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Una vez solidificados se pulverizaron mecánicamente y se tomó 1 gr de cada uno y se incubaron por separado en 5 ml de medio RPMI 1640 libre de suero durante 5 días a 37°C. Los sobrenadantes se esterilizaron por filtración en membranas de acetato de

esterilizaron por filtración en membranas de acetato de nitrocelulosa (0.22  $\mu\text{m}$ ). Los extractos se diluyeron y se expusieron en diversas concentraciones a la células durante 24, 48 y 72 h. Nuestros resultados mostraron que el Root Canal Sealer y el Óxido de Zinc y eugenol disminuyen la viabilidad de los macrófagos de exudado peritoneal en un 88%. ZOE disminuye la actividad fagocitaria en un 21% y dos de ellos la incrementan en un 86% (Silco y ZOE+Formocresol). Todos los cementos probados no modifican la producción de óxido nítrico. Los seis selladores inhiben la proliferación celular y provocan citotoxicidad a los esplenocitos, el mayor efecto se observó a las 72 h de exposición con las concentraciones originales, siendo más notable el Root Canal Sealer y ZOE con respecto al grupo control. Estos resultados indican que varios de estos selladores disminuyen las actividades de las células estudiadas, lo que posiblemente alterará la respuesta inmune local.

**Palabras Clave:** Citotoxicidad, Viabilidad, Selladores Endodónticos, Murino.

Abstract.

The purpose of this study was to evaluate the toxicity induced by six endodontic sealers in vitro. Balb/c male mice 8 weeks old were used. The following assays were performed in induced peritoneal macrophages: macrophage activity and nitric acid production. Cell proliferation and cytotoxicity was carried out with T cells. The endodontic sealers were, Root Canal Sealer (RCS), Zinc oxide-eugenol (ZnO), Roth (ROT), endomethasone (END), Silco (SIL), and zinc oxide-eugenol plus formocresol (ZOF). The sealers were prepared according to the manufacturer indications. For the in vitro assays, cells were incubated for 24, 48 and 72 h. with several dilutions from the stocks. Our results showed that RCS and ZnO decreased the viability of peritoneal macrophages by 88% and its phagocytic activity by 21%. Neither of the sealers showed to modify the nitric oxide production. The six endodontic sealers inhibited cell proliferation and were cytotoxic for T cells in vitro. RCS and END were notably cytotoxic by 66%. Our results indicate that these endodontic sealers affected the cell activities which possibly altered the local immune response. Further studies are necessary to understand how these sealers affect the microenvironment in the periodontal periapical tissues.

**Keywords:** Cytotoxicity, Viability, Endodontic Sealers, Murine.

## Introducción.

El tejido pulpar dentario puede ser seriamente dañado por traumas, manipulaciones iatrogénicas y con mayor frecuencia por bacterias que alcanzan la pulpa a través de una cavidad. Para proteger los tejidos periodontales que rodean el ápice del diente y para garantizar la preservación de éste tejido, es entonces necesario el remover el tejido necrótico e infectado, presente en el canal radicular. El siguiente paso necesario para preservar la integridad del periodonto es la desinfección y modelado de una cavidad para ser llenada con un cemento radicular y así obtener un buen sellado apical que no interfiera con los tejidos periapicales.

Los materiales endodónticos de relleno han sido objeto de diversos estudios para asegurar o rechazar su biocompatibilidad. Se han propuesto diversas estrategias como cultivo celular, sin embargo, los materiales endodónticos son difíciles de estudiar en condiciones de cultivo celular in vitro, debido a sus muchas variaciones en su composición química. Muchos de los materiales endodónticos originales fueron cementos de óxido de zinc ligeramente modificados. Los materiales con ésta composición son fáciles de estudiar utilizando

metodologías in vitro, debido al efecto conocido de coagulación de proteínas que ejerce el eugenol, lo cual resulta en daño y muerte celular.

Los materiales endodónticos de reciente aparición tienden a ser polímeros con diferentes composiciones. El potencial tóxico de los componentes de éstos materiales podrían no actuar como toxinas sino mas bien afectar algunas vías metabólicas. Se conoce muy poco acerca de los cambios que ocurren durante las pruebas de citotoxicidad. El cambio común más reportado como resultado de daño celular durante una evaluación citotóxica, es la perdida de adherencia celular.

Asimismo consideramos que es muy importante el estudiar los efectos de selladores endodónticos utilizados en la práctica clínica en células del sistema inmune, evaluando el potencial citotóxico, y de biocompatibilidad con éstas células, lo cual nos permitirá en un futuro mejorar la composición de aquellos materiales para uso en humanos.

## Antecedentes

En un esfuerzo para minimizar la incidencia de efectos colaterales sistémicos y/o locales, la biocompatibilidad de todos los materiales endodónticos debe ser investigada en pruebas tanto in vitro como in vivo, previo a su aplicación clínica. La batería de las pruebas in vitro, incluye determinaciones de la mutagenicidad, citotoxicidad y efectos antibacterianos (1-2). Diversos reportes han mostrado que los cementos que contienen en su fórmula, paraformaldehído y óxido de zinc y eugenol, tales como endomethasone y N2 son antibacterianos. Por otra parte, se ha encontrado que los materiales endodónticos con una actividad antimicrobiana fuerte, generalmente son mutagénicos, primariamente aquellos que liberan paraformaldehído. Las pruebas de cultivo celular claramente muestran significativa diferencia en la citocompatibilidad de varios tipos de selladores endodónticos: en general los cementos de formaldehído/óxido de zinc-eugenol son clasificados como alta/extremadamente citotóxicos, mientras que los selladores basados en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  son considerados con buena o excelente citocompatibilidad. Estos resultados han sido confirmados por numerosos estudios histológicos in vivo.

Los selladores con biocompatibilidad inferior tales como aquellos que liberan formaldehído, no deben ser usados en la práctica debido a que existen alternativas disponibles que ofrecen mayor seguridad.

Varios estudios han revelado que las sustancias eluibles o productos de degradación o corrosión provenientes de los selladores de canales, podrían tener acceso a los tejidos que rodean el diente (ligamento periodontal, hueso alveolar), a través de numerosas conexiones, como túbulos dentinarios, canales laterales accesorios y el foramen apical (3-5). Araki et al., (6), investigaron la difusión de [<sup>14</sup>C]-formaldehído a través de la dentina radicular, 72 h después de la aplicación de formocresol dentro del canal radicular de los caninos de gato; se encontró que el formaldehído se había difundido desde la pulpa hacia el organismo. La difusión de componentes desde el espacio pulpar hacia la superficie radicular, es influenciada significativamente por la presencia o ausencia de "lodo dentinario", el cual es creado durante cualquier preparación mecánica radicular. Breault et al., (7), investigaron los efectos de varios materiales de sellado de canales radiculares, sobre la

adherencia de fibroblastos gingivales expuestos a una superficie dentinaria libre de lodo dentinario, los materiales fueron Roth, (ZnO-eugenol)+gutapercha, gutapercha caliente + sellador, Ca(OH)<sub>2</sub> y formocresol. La adherencia de fibroblastos se redujo significativamente cuando se usó formocresol o gutapercha caliente. Los autores concluyeron que el formocresol y la gutapercha caliente aplicados dentro de un canal radicular sin una capa de lodo dentinario puede impedir la cicatrización y/o regeneración de los tejidos periodontales

Genotoxicidad/Mutagenicidad de los materiales endodónticos

La genotoxicidad/mutagenicidad y carcinogenicidad son factores muy importantes que afectan la compatibilidad sistémica de los materiales endodónticos. En general la genotoxicidad significa la presencia de un componente que reacciona con el DNA el cual puede resultar en mutagenicidad y carcinogenicidad (8).

Desafortunadamente existe poca información acerca de la mutagenicidad de los materiales de relleno endodóntico. Schweik et al., (9), investigaron la mutagenicidad del cemento AH26 en células de mamíferos. Ellos encontraron

que éste medicamento ejerce sus efectos mutagénicos 24 h después de haber sido mezclado y su efecto disminuye en una semana. Estas observaciones están de acuerdo con la disminución en la liberación de paraformaldehído del punto inicial de mezcla a un máximo de 2 días después de esta (10). Sin embargo y en contraste a estos datos, Stea et al., (11) así como Heil et al., (12) encontraron efectos mutagénicos aun después de un periodo largo de tiempo, después que los materiales fueron mezclados. Basados en estos resultados reportados en la literatura, es muy claro que se necesitan estudios profundos (13) de ambas substancias que causan estos efectos, ya que se ha reportado que el eugenol no es genotóxico en varios sistemas in vitro (14).

Citotoxicidad de los materiales selladores radiculares,

Los estudios de cultivo celular han sido llevados a cabo durante más de 30 años para la investigación de las reacciones citotóxicas inducidas por los selladores endodónticos (15-16). Líneas celulares permanentes como HeLa, 3T3 o L929 y células primarias, principalmente fibroblastos orales son usados en éstos experimentos (17-

20). Algunos de los puntos importantes de estudio son la inhibición de crecimiento, DL50, integridad de la membrana celular, ADN, ARN y síntesis de proteínas, o ya sea la determinación de alteraciones de la morfología celular por microscopía de luz o electrónica (21-23).

Todavía permanece la controversia si se deben usar líneas celulares permanentes o líneas primarias derivadas del tejido afectado (en este caso el ligamento periodontal primariamente) (24-25). Al-Nazhan y Spanberg (17), usaron fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano (células L929), para comparar los efectos de cementos selladores con base de resina polimérica sobre la morfología de ambos tipos celulares por medio de microscopía electrónica y de barrido y por la liberación de cromo. Se encontró que la liberación de cromo y el daño celular estaban relacionados. Sin embargo, los fibroblastos del ligamento periodontal fueron más resistentes a los efectos citotóxicos que las células L929. Por ésto los autores concluyen que las células derivadas del ligamento periodontal en cultivos primarios deben ser la primera elección para la determinación de citotoxicidad de los materiales de relleno endodónticos. Estas células tendrán un contacto primario con el material

endodóntico extruído. Resultados similares han sido obtenidos por Leinenbach et al., (19).

Debido al hecho de que un material o sellador endodóntico puede impedir la cicatrización de tejidos adyacentes a la raíz dentaria por la liberación de componentes (26-27), así como por contacto directo, como por ejemplo en el caso de sobreobturaciones, es entonces necesario el probar los extractos así como especímenes sólidos para determinar su biocompatibilidad (28). McNamara et al., (23), demostraron que el cemento AH26 inhibía las funciones celulares de células L929 e inducía marcadas alteraciones del metabolismo celular. Se encontró que el AH26 es un cemento altamente citotóxico en varios sistemas de cultivo in vitro reportado por diversos autores (29-30). Estas observaciones han sido corroboradas con estudios in vivo, realizados en monos, en los cuales las reacciones periapicales a selladores de base  $\text{Ca(OH)}_2$  y AH26 fueron comparados (31). La alta citotoxicidad de éste sellador resino-epóxico es principalmente causada por el formaldehído que contiene, el cual es liberado durante el periodo inicial que ocupa el establecimiento de la reacción química (10). De acuerdo con esto, también se ha

encontrado que estos cementos con base de resina inducen una reacción inflamatoria severa y necrosis cuando son implantados en animales de experimentación (16).

Asimismo, varios selladores con base de ZnO-eugenol, tales como el N2, fueron clasificados como alta/extremadamente citotóxicos (32-33). Adicionalmente se encontró que estos materiales, especialmente el N2 revelaron efectos citotóxicos aún después de diversas diluciones del material fraguado (19). Esto es indicativo de la alta potencialidad tóxica y en un tiempo largo de los cementos basados en ZnO-eugenol y principalmente aquellos que contienen paraformaldehído (N2, endomethasone). Estas conclusiones están apoyadas por observaciones clínicas (34), así como por investigaciones animales sobre los efectos del formocresol sobre el ligamento periodontal. Los resultados histológicos de estos estudios, revelan que el formaldehído, el cual es distribuido a través de los canales radiculares localmente y sistémicamente, irrita al tejido que rodea la superficie radicular y claramente retrasa el proceso de cicatrización del ligamento periodontal (35-37).

Estudios histológicos con materiales endodónticos.

Varias investigaciones histológicas indican que la liberación de componentes de los selladores endodónticos inducen efectos locales colaterales. Yesiloy et al., (38), inyectaron el sellador de Grossman (ZnO-eugenol), eucapercha (con eucaliptol), CRCS (Ca(OH)<sub>2</sub>-eugenol-eucaliptol), Sealapex (Ca(OH)<sub>2</sub>-resina polimérica), en tejido subcutáneo de 12 cobayos. La examinación histológica después de 6, 15 y 180 días demostró que Sealapex indujo una reacción menos severa que los otros selladores probados.

Los datos histológicos reportados, indican que los selladores endodónticos, especialmente aquellos que contienen paraformaldehído y ZnO-eugenol en su fórmula así como la gutapercha, pueden inducir irritación periapical. Esto fué principalmente observado cuando existió un contacto directo entre los tejidos blandos adyacentes a la raíz y el material endodóntico de relleno, debido a la sobreobturación. Asimismo, se han reportado tanto in vivo como in vitro efectos neurotóxicos debido también al contacto directo entre el sellador endodóntico y tejido nervioso (39-48).

Los datos reportados in vitro, indican que la reacción inflamatoria periapical después de la aplicación de la gutapercha puede deberse a la activación del sistema del complemento (C3), inducido por 4 marcas de gutapercha y 9 componentes de un producto como indicadores de un posible potencial inflamatorio (Serene et al., (49). Se determinó que todos éstos materiales llevaban a la activación del complemento y esto puede impedir la cicatrización del periápice en casos de sobreobtusión. Sin embargo, las investigaciones histológicas revelaron que éstos efectos adversos no son característicos de la gutapercha en general, pero son típicos para ciertos tipos de ésta. Los autores sugieren que los diferentes tipos de gutapercha pueden ser cuidadosamente evaluados para determinar cuales son más favorables para la cicatrización del tejido periapical. Se encontró que las partículas de gutapercha provocaron una reacción tisular intensa, caracterizado, por la presencia de macrófagos y células multinucleadas gigantes. Ellos concluyeron que estas alteraciones pueden ser un cofactor en el impedimento de la cicatrización de lesiones periapicales cuando los canales son sobreobturados (50).

Planteamiento del problema.

En la actualidad existe una gran cantidad de cementos endodónticos utilizados comunmente en la práctica clínica sin embargo poco se sabe respecto al comportamiento de las células del sistema inmune cuando están en contacto con estos cementos. Es importante entonces, al haber hecho una revisión exhaustiva de la literatura para determinar el comportamiento de éstos cementos en esplenocitos y macrófagos; en cuanto a su capacidad de modificar sus actividades metabólicas, de proliferación, viabilidad, fagocitosis y producción de óxido nítrico.

### Justificación.

Pocos reportes existen en la literatura acerca de como es afectado o como las células del sistema inmune son afectadas por materiales biocompatibles y utilizados ampliamente en la terapéutica endodóntico. Las grandes variaciones en la composición de éstos materiales hace también difícil su evaluación en un solo sistema de pruebas. La evaluación in vitro, utilizando células del sistema inmune nos permite de cualquier modo el inferir los hechos biológicos que se suceden en una situación in vitro. Sin embargo, debemos considerar con honestidad el ser cautelosos en la interpretación de los resultados obtenidos en sistemas in vitro. Es por esto que éste trabajo pretende aportar al conocimiento el estudio de los eventos que se suceden en células del sistema inmune murino cuando son expuestas a los componentes activos de seis diferentes cementos endodónticos utilizados ampliamente en la práctica clínica.

### Hipótesis.

Las células del sistema inmune murino verán afectada su capacidad de proliferación, actividad fagocitaria y producción de óxido nítrico en presencia de cualquiera de los seis cementos endodónticos utilizados en éste estudio.

## Objetivos

### General

Determinar si los cementos endodónticos inhiben la proliferación celular, capacidad fagocitaria y síntesis de óxido nítrico en células del sistema inmune murino.

### Específicos

Determinar cual de los cementos utilizados en éste estudio resulta biocompatible con las células del sistema inmune murino

Determinar el grado de biocompatibilidad en base a pruebas de citotoxicidad de los cementos endodónticos utilizados en éste estudio.

## Material y Métodos.

Se utilizaron 6 cementos endodónticos comercialmente disponibles como: Root Canal Sealer, Roth, Endomethasone, Silco, Oxido de Zinc y Eugenol, Oxido de Zinc y Eugenol + Formocresol, Suero Fetal bovino, Cajas para Cultivo de 96 pozos, Medio de Cultivo DMEM, Penicilina/Estreptomycin, Medio RPMI 1640, Ratones Balb/c de 8 semanas de edad (hembras), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co).

### Preparación de los extractos de cementos endodónticos

Los componentes de los cementos usados en éste estudio fueron mezclados de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Una vez realizada la mezcla, el producto se dejó descansar durante 1 h a temperatura ambiente y entonces fué pesado y extraído en medio RPMI 1640 de acuerdo a la regulación dental de la American Standard for Testing and Materials (ASTM) (51). Se pesó 1 gr de cemento y se resuspendió en 5 ml de medio RPMI y la mezcla fué mantenida a 37°C durante 5 días. El extracto fué centrifugado a 14,000g y el sobrenadante filtrado en un filtro con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro. El sobrenadante así filtrado fué almacenado a -20°C hasta su utilización.

Los extractos fueron diluidos en medio RPMI 1640 a 1:1.56, 1:3.25, 1:6.25, 1:12.5, 1:25, 1:50 y 1:100.

#### Aislamiento de células

Se utilizaron ratones (hembras), Balb/c de 8 semanas de edad. Los esplenocitos fueron obtenidos por maceración del tejido, a través de una malla de acero inoxidable estéril y con la ayuda de un pistilo. Después que las células rojas (eritrocitos), fueron lisadas en un amortiguador de lisis ( $\text{NH}_4\text{CL}_2$ ), los esplenocitos fueron lavados dos veces en con medio RPMI 1640. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 el cual fué suplementado con suero fetal bovino (SFB), al 10% y una mezcla de antibióticos, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin. Las células fueron entonces sembradas en discos petri de 15 mm y se dejaron adherir durante 2 h a 37°C en una atmósfera de 95% aire y 5%  $\text{CO}_2$ . Después de 2 h, las células no adherentes fueron desechadas.

Las células fueron centrifugadas a 300Xg y resuspendidas en medio RPMI 1640.y contadas en un hemocitómetro. La viabilidad celular fué estimada en 98% por medio de la exclusión con azul tripano.

## Ensayo de proliferación celular

Esplenocitos a una densidad de  $1.5 \times 10^5$ , resuspendidos en DMEM suplementado con SFB al 10 % fueron sembrados en placas de 96 pozos y se permitió su adherencia durante toda la noche. Medio fresco suplementado con SFB al 10 % más las diferentes diluciones de los cementos a ser probados (mencionados anteriormente), se adicionaron a los pozos. Las células fueron cultivadas durante 24, 48 y 72 h, después de lo cual 20  $\mu$ l de MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (sigma Chemical Co., St. Louis, MO USA), fué disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) a 5 mg/ml, filtrado y adicionado al medio de cultivo y los cultivos incubados durante 3 h. El MTT-Formazan intracelular fué extraído y disuelto en 100  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y leído a 570 nm en un lector de placas de ELISA (52). La viabilidad celular se llevo a cabo con éste método, sin embargo se utilizaron macrófagos en vez de esplenocitos

## Actividad Fagocítica

Ratones machos Balb/c que pesaron entre 20 y 30 gr se usaron de acuerdo al método descrito por Rook (53). Esto es, 3 ml de medio de tioglicolato al 1% fué administrado

intraperitonealmente con una jeringa de insulina. Después de 72 h, los animales fueron sacrificados y su cavidad peritoneal inyectada con 10 ml de solución salina balanceada de HANK, la cual estaba suplementada con 50 U/ml de heparina (McCarron) (54). El líquido de ascitis fué entonces extraído con una jeringa de 10 ml. Las células fueron lavadas con solución de Hank y centrifugadas a 300Xg durante 10 min. Las células fueron entonces resuspendidas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%. Los macrófagos así obtenidos, se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  en placas de 96 pozos para cultivo celular y expuestas durante 24 h a las diferentes diluciones de los sobrenadantes de los 6 cementos probados en éste estudio. La actividad fagocítica, fué evaluada utilizando una mezcla de Zymosan/Nitro azul de tetrazolio (NBT, Sigma Chemical CO., St. Louis MO, USA) a una concentración de 1 mg/ml, el cual fué resuspendido previamente en PBS y la mezcla incubada a 37°C durante 90 min. Las células fueron incubadas con esta suspensión durante 60 min a 37°C en una atmósfera que contenía 5%CO<sub>2</sub> y 95% aire en un ambiente de completa humedad. Los pozos de las placas de 96 fueron entonces lavados con metanol al 70% por 3 veces y secadas con aire. 120 µl de 2M de KOH se

adicionaron a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min, entonces se adicionaron 140  $\mu$ l de DMSO y se mezcló vigorosamente y las placas fueron leídas a 630 nm en un lector de placas de ELISA.

#### Producción de óxido nítrico

Para éste bioensayo se utilizaron macrófagos peritoneales inducidos. Se tomarón 70  $\mu$ l de los sobrenadantes resultantes de los macrófagos expuestos a las diferentes diluciones de los cementos probados, se mezclaron con 70  $\mu$ l del reactivo de Griess. La mezcla fué incubada durante 10 min a temperatura ambiente hasta que se desarrolle el color y las placas entonces se leyeron a 570 nm en un lector de ELISA. Como control positivo se utilizaron células tratadas con interferón de ratón y recombinante a 2 U/pozo y lipopolisacárido de E. coli a 2  $\mu$ g/pozo (55).

#### Análisis Estadístico.

Los resultados de los ensayos descritos anteriormente son expresados como media  $\pm$  DS de triplicados. Se utilizó el método de Student-Newman-Keuls para el análisis y

comparación entre tratamientos, así como análisis de  
varianza, utilizando el programa Sigma Stat F.W. V. 1.0.

## Resultados

Los resultados obtenidos en el bioensayo de proliferación celular y citotoxicidad en esplenocitos de ratón Balb/c t macrófagos peritoneales de ratón, fueron expuestas a diferentes diluciones de los extractos de seis selladores endodónticos comercialmente disponibles durante 24, 48 y 72 h. Los ensayos se realizaron de acuerdo a los estándares de la ASTM. Las células fueron incubadas con MTT-Formazán para determinar el grado de proliferación celular, el cual fué expresado como la proporción de células que se mantuvieron viables en comparación con el control, por lo que el grado de citotoxicidad fué inversamente proporcional al grado de proliferación celular. Nuestros resultados mostraron que los 6 selladores endodónticos inhiben la proliferación celular. Además se observó un efecto citotóxico con todos ellos, ya que se afectó la viabilidad. hasta de un 66% a las 72 h de incubación con respecto al tiempo 0 ( $p < 0.05$  Tukey test). Los esplenocitos fueron marcadamente afectados por RCS y ENDO con la dilución mas concentrada (1:1.5), comparado con el tiempo cero (Gráficas 1-6).

La citotoxicidad ensayada en macrófagos peritoneales mostraron que el RCS y ZOE + Eugenol significativamente

redujeron la viabilidad de macrófagos por un 88 % ( $p < 0.05$  Tukey test), con las dos diluciones más concentradas: (1.5 y 1:1.3) respecto a las células control. La actividad fagocítica fué disminuida en macrófagos peritoneales por el ZO + Eugenol en un 21% con la adición de las diluciones a 1:1,5, 1:1.3 y 1:1.6. Este hecho probablemente pudo afectar el nivel de citotoxicidad. De cualquier modo el ZO+ Formocresol incremento la actividad fagocítica por un 115% ( $p < 0.05$  Tukey test), a la concentración más alta (1:1.5), sin embargo la viabilidad celular no fué afectada a esta concentración (Gráficas 7-12). También fué muy claro en este estudio que ninguna de las soluciones probadas tuvo efecto alguno en la producción de ácido nítrico, aunque hubo un ligero aumento con la adición de ZOE y SIL respectivamente, la cual no se reflejó en una significancia estadística respecto a las células control (Gráficas 13-18)..

## Discusión

El porcentaje de células viables, representa el nivel de citotoxicidad de los cementos endodónticos probados. Para determinar éste nivel de citotoxicidad, nosotros comparamos el número de células viables con respecto al control. La elección de estos seis selladores endodónticos se basó en los resultados positivos obtenidos en la práctica clínica. Sin embargo, es importante hacer notar que la citotoxicidad se incrementa cuando el material hace contacto con los tejidos vitales (56). En nuestro estudio, es posible que la citotoxicidad mostrado por los cementos con base de óxido de zinc y eugenol pudo deberse a los iones libres ya sea de eugenol o zinc que permanecían en el sobrenadante de la mezcla de ZnO y eugenol (57). El cemento de Endomethasone probablemente fué citotóxico debido a la presencia de hidrocortisona en su fórmula.

El proceso de cicatrización, usualmente es validado por radiografías y el cual es generalmente alcanzado algunos meses después de la cirugía. Algunas veces la persistencia de reacción en el ápice dentario puede ser notado aún después de un tratamiento radicular efectuado con todas las normas técnicas. La reacción en el tejido periodontal entonces puede provocar una respuesta

inmunológica debido a la liberación de sustancias tóxicas por los selladores radiculares (58). En nuestro estudio, fué muy claro que aquellos cementos que contenían eugenol en su fórmula inhibían la proliferación celular e incrementaban la actividad fagocítica. Basados en nuestros resultados, nosotros podemos proponer que los efectos nocivos ocurren durante las primeras 24 horas de cultivo celular y que las células viables remanentes no fueron capaces de proliferar activamente, e impidieron la normalización del ciclo celular a las 48 y 72 horas. Como nosotros lo esperábamos, el óxido de zinc más formocresol, incrementaron la actividad fagocítica, la cual fué también correlacionada con el incremento en la producción de óxido nítrico. Esto, pudo deberse debido al efecto mumificante del formocresol. Sin embargo, el óxido de zinc más eugenol fue citotóxico para los macrófagos y disminuyó la fagocitosis, aunque los cementos conteniendo esta fórmula fueron también citotóxicos para los esplenocitos (59). Utilizando este sistema, nosotros fuimos capaces de establecer que todos los selladores endodónticos probados en nuestro estudio, fueron citotóxicos para los esplenocitos y macrófagos y también afectaron la viabilidad celular. Sin embargo, nosotros pudimos

identificar que mientras más concentrados eran las diluciones de los extractos de selladores endodónticos, su toxicidad se incrementaba, como el sellador de óxido de zinc y eugenol disminuyó la proliferación celular, probablemente afectando y/o retrasando la progresión de las células de la fase G0-G1 a la fase S, mientras que los extractos utilizados a las concentraciones más diluídas, tuvieron una acción citotóxica más selectiva.

Los experimentos in vitro, producen información acerca del daño tisular inmediato y no pueden determinar la reacción tisular en términos de tiempo largos después de la agresión tisular inicial. Diversos factores son responsables del daño celular. Los métodos de estudio in vitro que utilizan cultivo celular, son simples y permiten con facilidad el tamizaje de biomateriales para predecir su potencial citotóxico o una reacción necrótica a los materiales de uso biomédico durante su aplicación clínica en humanos. En general, los métodos de evaluación en cultivo celular han mostrado una buena correlación con los experimentos en animales y son con frecuencia, más sensitivos que los ensayos in vivo, dentro de los límites de las pruebas de toxicidad aguda (60-61). Por esto

nosotros podríamos concluir que los resultados de no toxicidad obtenidos in vitro, pueden ser transferidos a la aplicación clínica, mientras que los materiales tóxicos deben ser más ampliamente probados considerando factores locales en los sitios del implante o de contacto con tejido vital.

En conclusión, nosotros consideramos que no es muy atrevido el hipotetizar que algunos tipos de selladores endodónticos pudieran ser responsables de los fracasos en los tratamientos clínicos al afectar el proceso de cicatrización del periápice radicular y por lo tanto de la formación de granulomas, debido a la inhibición de la proliferación celular y a la promoción en la producción de óxido nítrico, el cual también podría estar relacionado a la inhibición de la movilidad celular. La profundización en éste tipo de estudios podría demostrar una responsabilidad directa de los selladores anteriormente mencionados y examinados en éste estudio, acerca de la patogénesis de la reacción de los tejidos que rodean el ápice radicular después de efectuado el tratamiento endodóntico.

## Conclusiones

-. Nosotros podemos concluir que los efectos nocivos ocurren durante las primeras 24 horas de cultivo celular.

- Las células remanentes no fueron capaces de proliferar activamente, e impidieron la normalización del ciclo celular a las 48 y 72 horas.

-. El óxido de zinc más formocresol, incrementaron la actividad fagocítica, la cual fué también correlacionada con el incremento en la producción de óxido nítrico.

-. El óxido de zinc más eugenol fué citotóxico para los macrófagos y disminuyó la fagocitosis, aunque los cementos conteniendo esta fórmula fueron también citotóxicos para los esplenocitos.

-. Utilizando este sistema, nosotros fuimos capaces de establecer que todos los selladores endodónticos probados en nuestro estudio, fueron citotóxicos para los esplenocitos y macrófagos y también afectaron la viabilidad celular.

## Propuestas de investigación a futuro

Es importante el realizar estudios futuros sobre la respuesta inmune humoral utilizando los sobrenadantes de cementos endodónticos utilizados en la práctica clínica, lo que nos permitirá determinar de una manera más clara cual es la respuesta inmunológica provocada por éstos cementos selladores.

## Bibliografía

1. Tronstadt L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int J Endod* 13: 131-138, 1980.
2. Wennberg A. Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo models. *J Endod* 6:784-787, 1980.
3. De Deus QD. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. *J Endod* 1:361-366, 1975
4. Dongari , Lambrianidis T. Periodontally derived pulpal lesions. *Endod Dent Traumatol* 4: 49, 1988.
5. Mjör IA, PindborgJJ. Histology of the human tooth. Munksgaard, Copenhagen, 1973.
6. Araki K, Isaka H, Ishii T,, Suda H. Excretion of <sup>14</sup>C-formaldehyde distributed sistemically through root canal following pulpectomy . *Endod Dent traumatol* 9: 196-199, 1993.
7. Breault LG, Schuster GS, Billman MA, Hanson BS, Kudryk BL, Pashley DH, Runner RR, McPherson JC. The effects of intracanal medicaments, fillers, and sealers on the attachment of human gingival fibroblasts to an exposed dentin surface free of a smear layer. *J Periodontol* 66: 545-551, 1995.

8. Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Geurtsen W. The genotoxic potential of composite components . *Dtsch Zahnarztl* 50: 134-136, 1995.
9. Schweik H, Schmalz G, Stimmelmayer H, Bey B. Mutagenicity of AH26 in an in vitro mammalian cell mutation assay. *J Endod* 21: 4067-410, 1995.
10. Spanberg LSW, Barbosa SV, Lavigne GD. AH26 releases formaldehyde. *J Endod* 19: 596-598, 1993.
11. Stea S, Savarino L, Ciabetti G, Cenni E, Stea St, Trotta F, Morozzi G, Pizzoferrato A. Mutagenic potential of root canal sealers: Evaluation through Ames testing. *J Biomed Mater Res* 28: 319-328, 1994.
12. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 368: 181.194, 1996.
13. Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *JADA* 103: 429-434, 1981.
14. RTECS (registry of Toxic Effects of Chemical Substances): data taken from Chem-Bank CD-ROM (May 1995). SiverPlatter Information, Norwood, Mass, USA.
15. Keresztesi K, Kellner G. The biological effect of root filling materials. *Int Dent J* 16: 222-231, 1966.

16. Rappaport HM, Lilliy GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *J Oral Surg* 18: 785-802, 1964.
17. Al-Nazhan S, Spanberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 16: 129-134, 1990.
18. Arenhold- Bindslev D, Hörsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 5: 219-226, 1989.
19. Leinenbach F, Leyhausen G, Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials in fibroblast cultures (abstract) *J Dent Res* 72: 219, 1993.
20. Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endod* 15: 60-67, 1989.
21. Barbosa SV, Burkard DH, Spanberg LSW. Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. *J Endod* 20: 6-8, 1994.
22. Beltes P, Koulaouzidou E, Kotula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 11: 245-249, 1995.

23. McNamara JR, Heithersay GS, Wiebkin OW. Cell responses to Hydron by a new in vitro method. *Int Endod J* 25: 205-212, 1992.
24. Lehmann F, Leyhausen G, Geurtsen W. Cytotoxic alterations in different fibroblast cultures caused by matrix monomers (abstract). *J Dent Res* 72: 219, 1993.
25. Leyhausen G, Geurtsen W. Sensitivity of various cultured human oral cells to dental materials (abstract). *J Dent Res* 73: 293, 1994.
26. Abbott PC, Hume WR, Heithersay GS. Barriers to diffusion of Ledermixpaste in radicular dentine. *Int Endod J* 21: 142-143, 1989.
27. Foster KH, Kulid JC, Weller RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endod* 19: 136-140, 1993.
28. Al-Nazhan S, Spanberg L. Cytotoxicity study of AH26 and amalgam, in vitro, using human periodontal ligament fibroblasts. *Saudi Dental J* 2: 48-51, 1990.
29. Pascon EA, Leonardo MR, Safaci K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72: 222-237, 1991.

30. Spanberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials: 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *J Oral maxillofac Surg* 35: 402-414, 1973.
31. Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 5: 139-146, 1989.
32. Antrim DD. Evaluation of the cytotoxicity of root canal sealing agents on tissue culture cells in vitro: Grossman's sealer. N2 (permanent), Rockert's sealer and Cavit. *J Endod* 2: 111-116, 1976.
33. Brodin P, Roed A, Aars H, Orstavik D. Neurotoxic effects of root filling materials on rat phrenic nerve in vitro. *J Dent Res* 61: 1020-1023, 1982.
34. Hülsmann M, Hornecker E, Redeker M. Periodontal destruction and tooth loss following pulp devitalization with Toxavit: report of a case. *Endod Dent Traumatol* 9: 216-221, 1993.
35. s'Gravenmade EJ, Wemes JC, Dankert J. Quantitative measurements of the diffusion in vitro of some aldehydes in root canals of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 52: 97-100, 1981.

36. Löst C, Geurtsen W. Periodontal changes after provoked diffusion of Toxavit in the proximal cavity of the rat. *Dtsch Zahnarztl Z* 39: 379-387, 1984.
37. Yamasaki M, Nakamura H, Kameyama Y. Irritating effect of formocresol after pulpectomy in vivo. *Int Endod J* 27: 245-251, 1994.
38. Yesiloy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65: 459-467, 1988.
39. Alantar A, Tarragano H, Lefevre B. Extrusion of endodontic filling material into the insertions of the mylohyoid muscle- a case report. *Oral Surg* 78: 646-649, 1994.
40. Barkhordar RA, Nguyen NT. Paresthesia of the mental nerve after overextrusion with AH26 and gutta-percha: report of a case. *JADA* 110: 202-203, 1985.
41. Boiesen J, Brodin P. Neurotoxic effect of two root canal sealers with calcium hydroxide on rat phrenic nerve in vitro. *Endod Dent Traumatol* 7: 242-245, 1991.
42. Fanibunda KB. Adverse response to endodontic material containing para-formaldehyde. *Br Dent J* 57: 3231-235, 1984.

43. Grossman LI, Tatoian J. Paresthesia from N2-report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46: 700-701, 1978.
44. Kawakami T, Nakamura C, Eda S. Effects of penetration of a root canal filling material into the mandibular canal. I. Tissue reaction to the material. *Endod Dent Traumatol* 7: 36-41, 1991.
45. Kawakami T, Nakamura C, Eda S. Effects of penetration of a root canal filling material into the mandibular canal. II Changes in the alveolar nerve tissue. *Endod Dent Traumatol* 7: 42-47, 1991.
46. Russel DI, ryan WJ, Towers JF. Complications of automated root canal treatment - apical perforation and overfilling. *Br Dent J* 153: 393-398, 1982.
47. Spielman A, Gutman D, Laufer D. Anesthesia following endodontic overfilling with AH26. *Oral Surg* 52: 554-556, 1981.
48. Stabholz A, Blush MS. Necrosis of the crestal bone caused by the use of Toxavit. *J Endod* 9:110-113, 1983.
49. Serene TP, Vesely J, Boackle RJ. Complement activation as a possible in vitro indication of the inflammatory potential of endodontic materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65: 354-357, 1988.

50. Holland R, De Souza V, Nery MJ, De Mello W, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA. Reaction of rat connective tissue to gutta-percha and silver points. A long-term histological study. *Aust Dent J* 27: 224-226, 1982.
- 51 Annual book of ASTM Standars. Medical devices (F619-79): *Amer Soc Test Mat* 13.01: 172-176, 1992.
52. -Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proloferation and citotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65;55-63, 1983.
- 53 RooK G.A.W., Steele J., Umar S., Dockrell H.M. A Simple Method for the Solubilisation of Reduced NBT, and Its Use as a Colorimetric Assay for Activation of Human Macrophages by  $\gamma$ -Interferon. *J. Immunol Meth* 82;161-167, 1985.
- 54.-Mc Carron R.M., Goroff D.K., Luhr J.E., Murphy M.A., Herscowitz H.B. Methods for the Collection of Peritoneal and Alveolar Macrophages. *Meth. Enzymol.* 108;274-283, 1984.
55. 3.-Migilirioni P., Corradin G., Corradin S.B. Macrophage  $\text{NO}_2^-$  production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- $\gamma$  *J. Immunol. Meth.* 139; 107-114, 1991.

56 Granchi D, Stea S, Ciapeti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 79: 359-366, 1995.

57 Spanberg LSW. Endodontic filling materials. In: Smith DC, Williams DF (eds) *Biocompatibility of dental materials*, vol 3. CRC Press, Boca Raton, pp 223-257, 1982.

58 Maseki T, Yasumura K, Nanba I, Kobayashi F, Nakamura H. Alterations in macrophages after exposure to root canal filling materials. *J Endod* 22:450-454, 1996.

59. Bruce GR, McDonald NJ, Sydiskis RJ. Cytotoxicity of retrofill materials. *J Endod* 19: 288-292, 1993.

60. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal fillings materials - histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Invest* 1: 5-11, 1997.

61 Northup SJ: Mammalian cell culture models, AF von Recuum (ed), *handbook of biomaterials evaluation. Scientific technical and clinical testing of implant materials*. Mcmillan New York, p. 209-225 1986.

## Curriculum Vitae

Nombre: Rogelio Vera Martínez

Nombre de los padres:

Padre: Primitivo Vera Redondo.

Madre: Paula Martínez de Vera

Lugar y Fecha de Nacimiento:

Tehuacán, Hidalgo. 25 de Julio de 1951.

Nacionalidad: Mexicana

Domicilio: Consultorio. Calzada de la Viga # 1756-402

Colonia, Héroes de Churubusco. C. P. 09090.

México D. F.

Estudios Profesionales y de Posgrado

Licenciatura

Cirujano Dentista, Facultad de Odontología, UNAM. 1970-1973.

Especialidad

Endodoncia, División de Estudios de Posgrado e Investigación,

Facultad de Odontología, UNAM. 1978.

Maestría

Maestría en Odontología, División de Estudios de Posgrado e

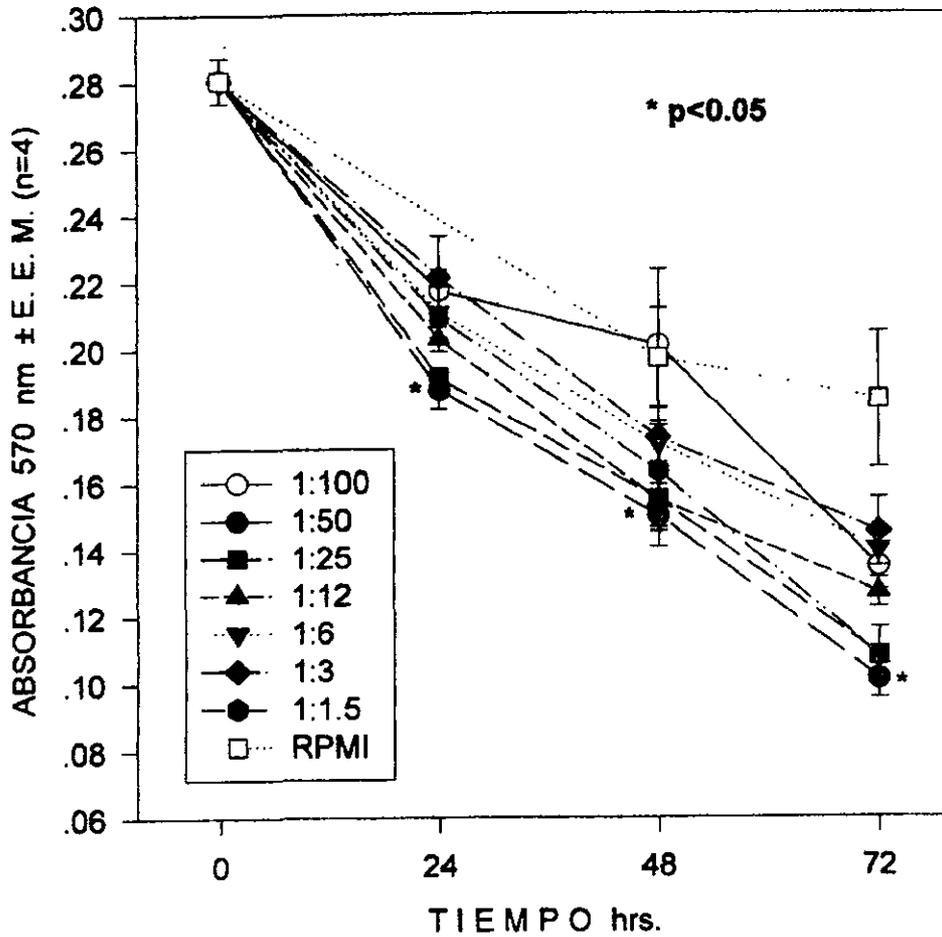
Investigación, Facultad de Odontología, UNAM, 1979.

Experiencia Docente y Profesional

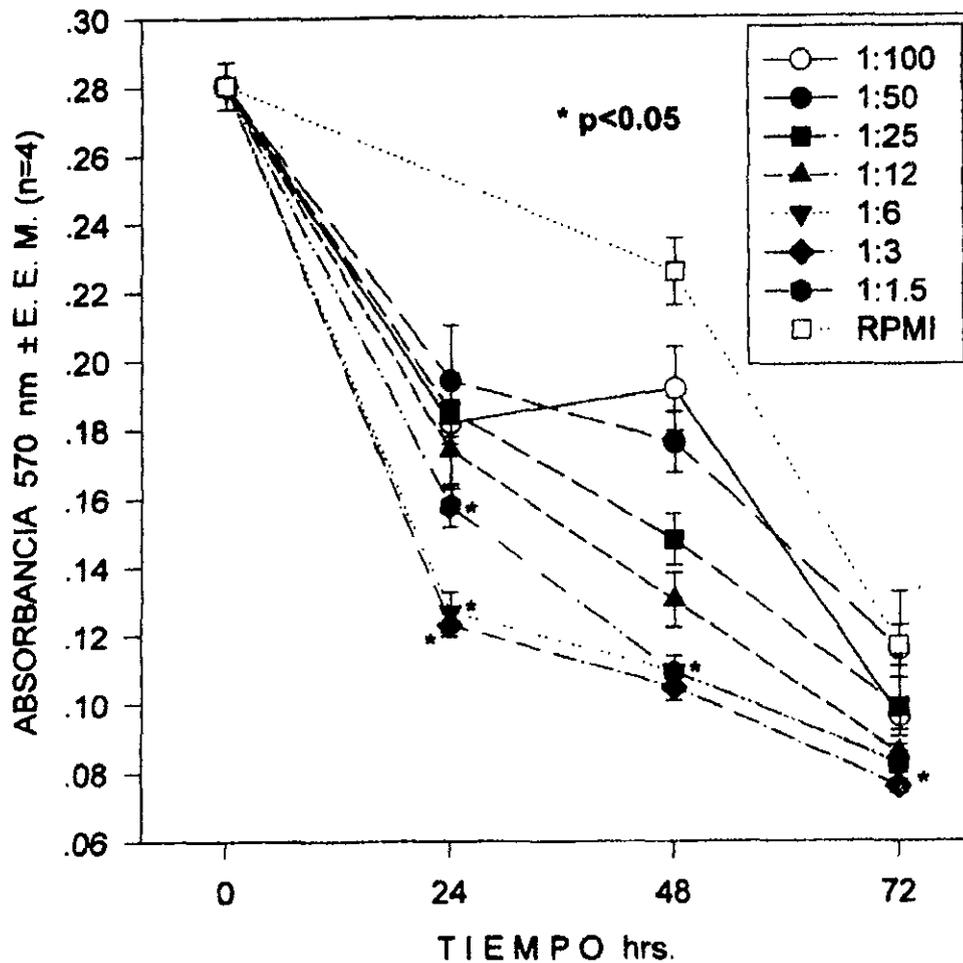
Profesor de carrera titular A MT 1975-a la fecha

Práctica privada: 1974- a la fecha .

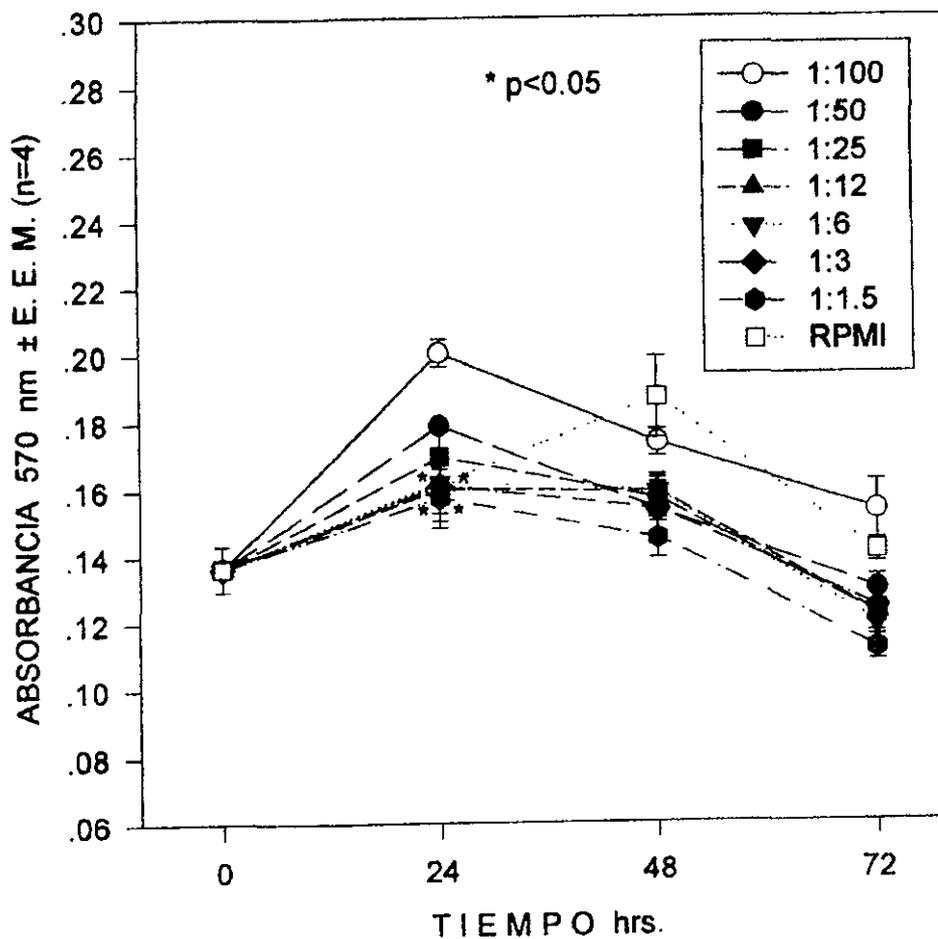
# EFECTO DEL SELLADOR ENDOMETHASONE EN LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO



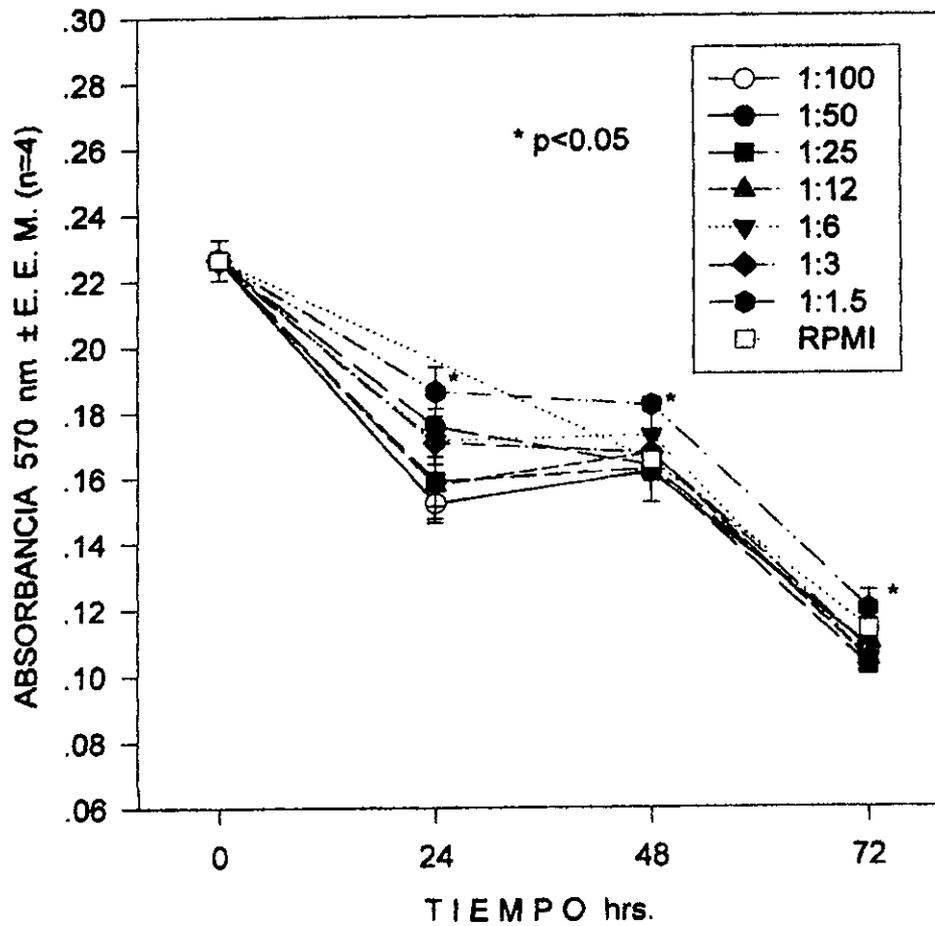
# EFECTO DEL SELLADOR ROOT CANAL SEALER EN LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO



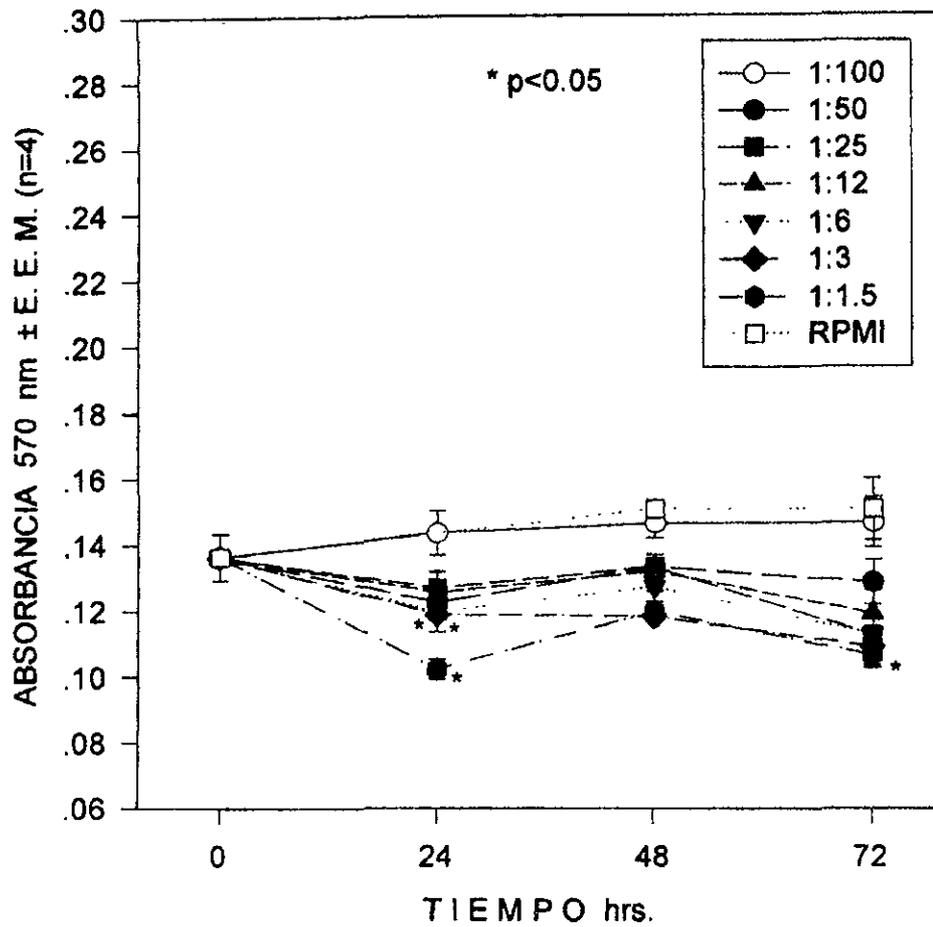
# EFECTO DEL SELLADOR SILCO EN LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO



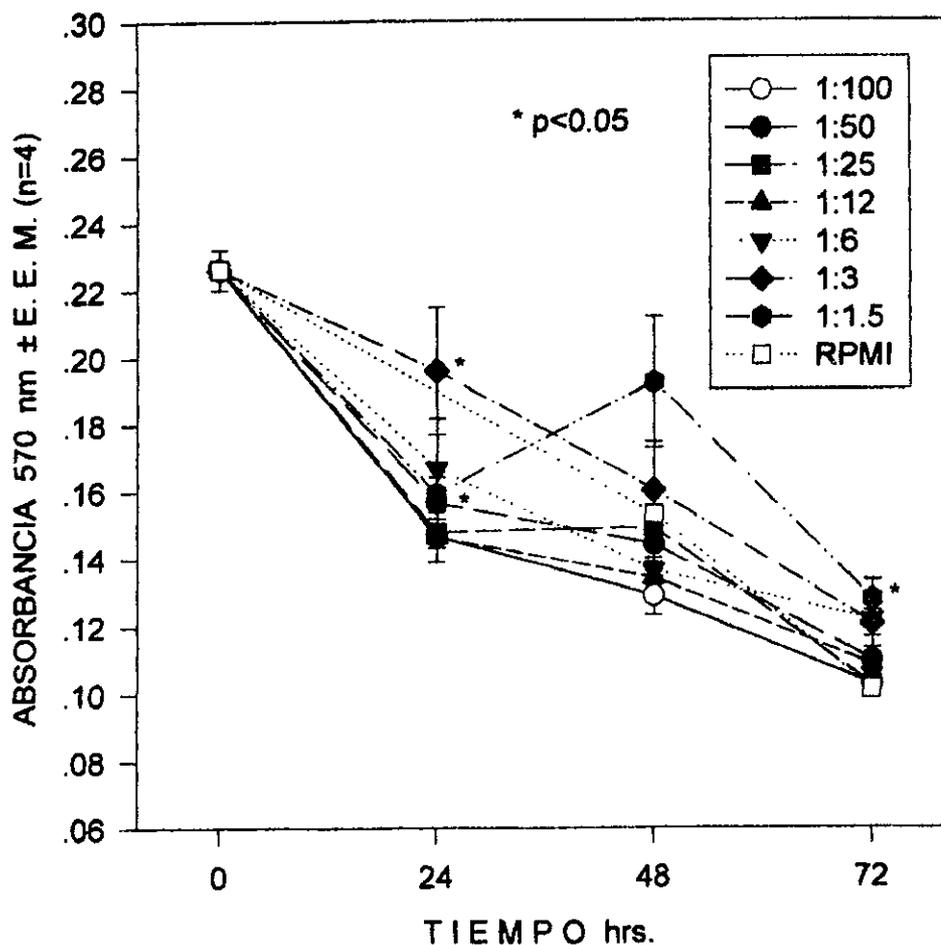
# EFFECTO DEL CEMENTO ROTH EN LA PROLIFERACION DE ESLENOCITOS DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO



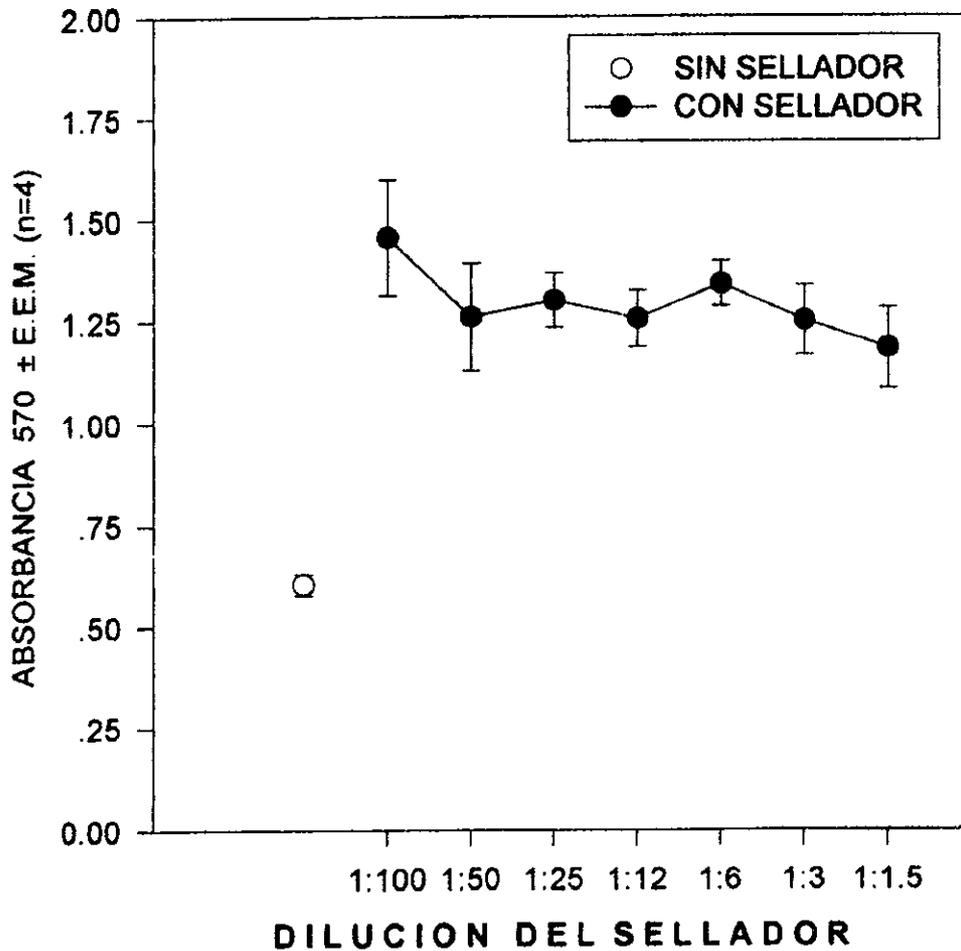
**EFFECTO DEL SELLADOR ZOE + FORMOCRESOL  
EN LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS  
DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE  
LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO**



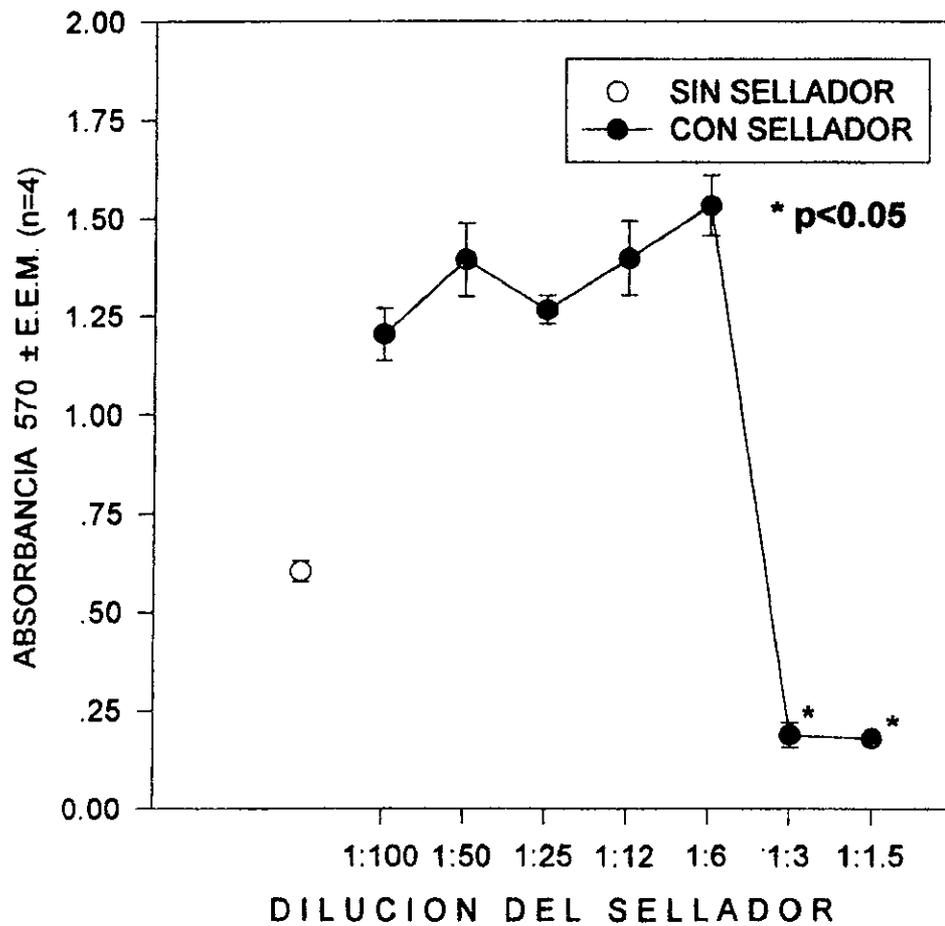
# EFECTO DEL CEMENTO ZOE EN LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS DE RATON BALB/c EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE METILTETRAZOLIO



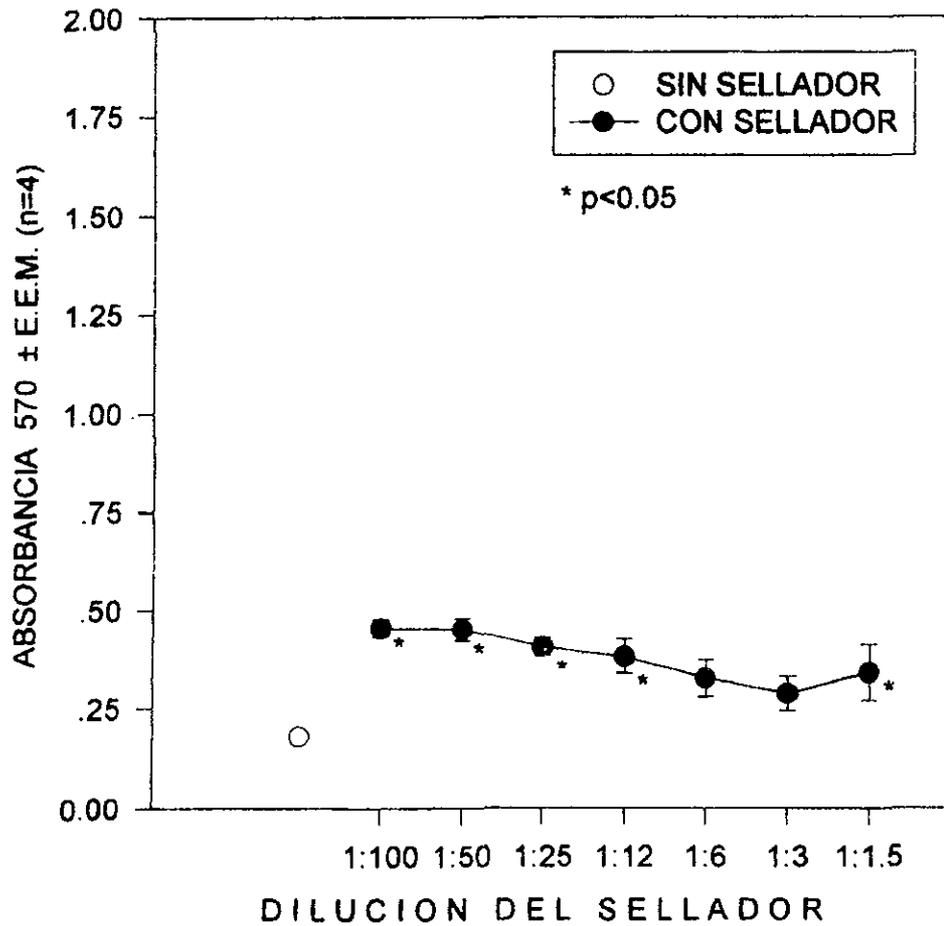
**EFFECTO DEL SELLADOR ENDOMETHASONE EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.**



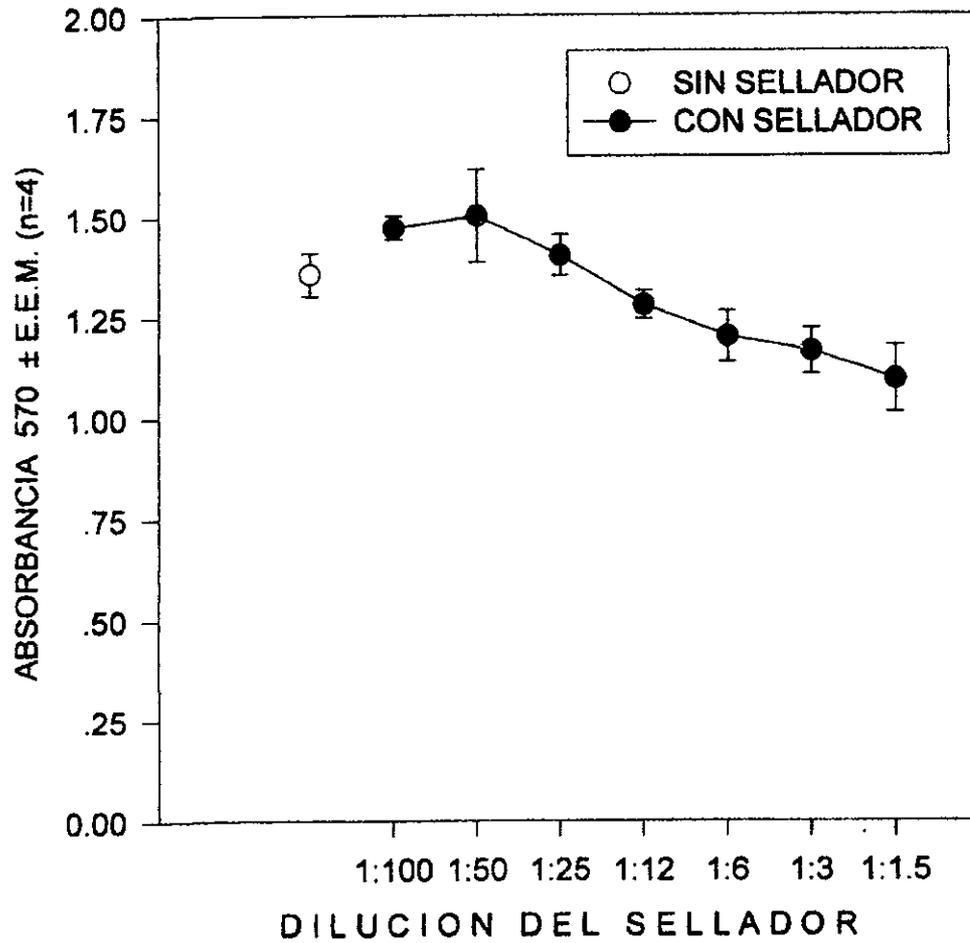
**EFFECTO DEL SELLADOR ROOT CANAL SEALER  
EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS DE RATON Balb/c  
EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.**



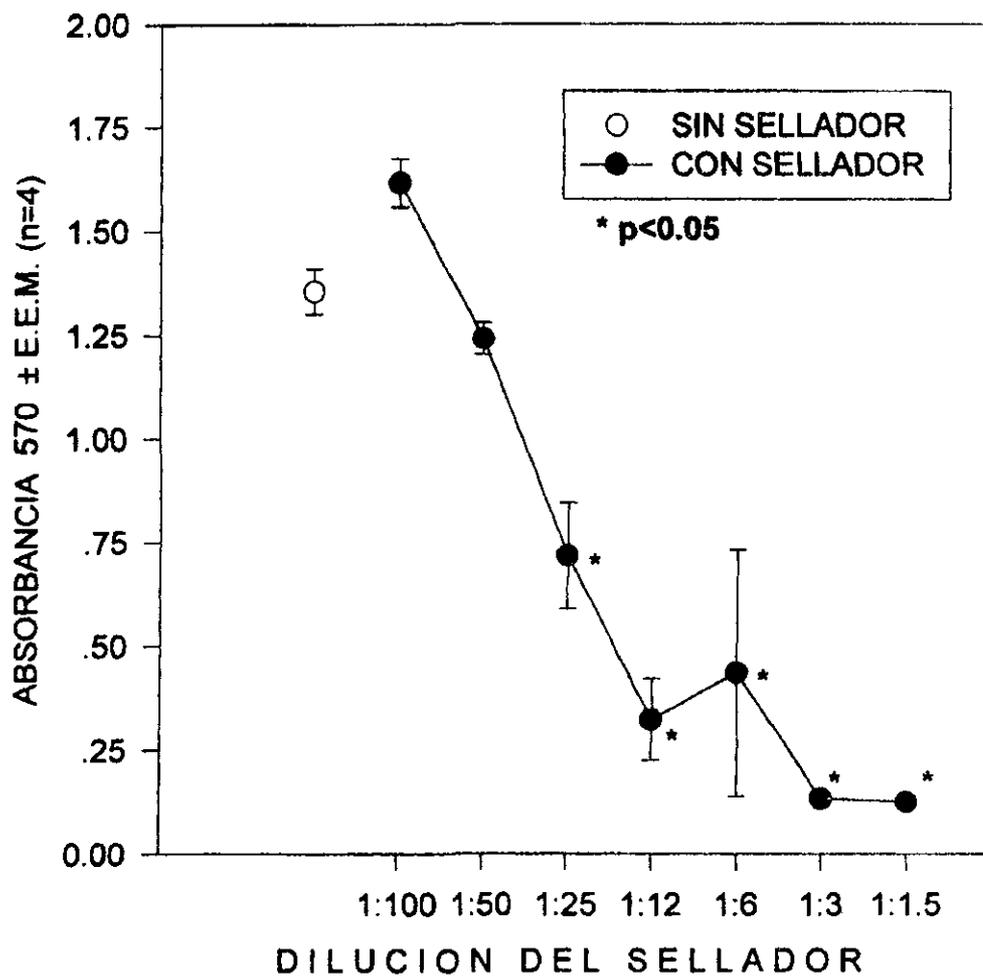
# EFFECTO DEL SELLADOR SILCO EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.



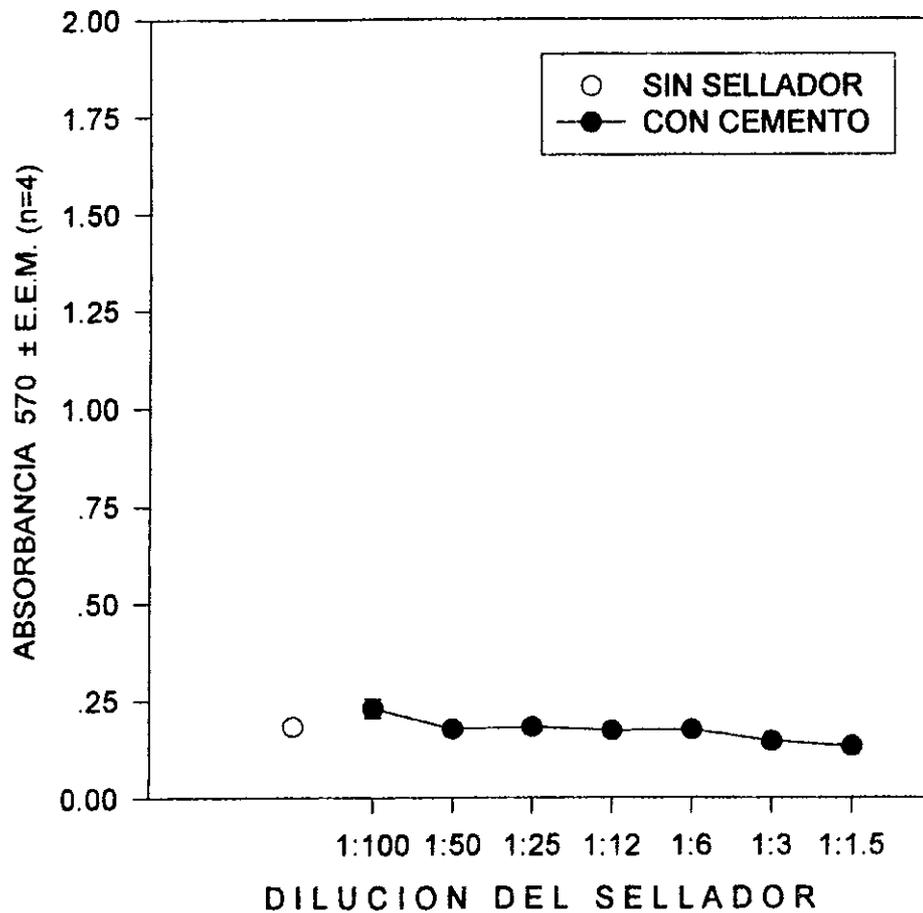
# EFFECTO DEL SELLADOR ROTH EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.



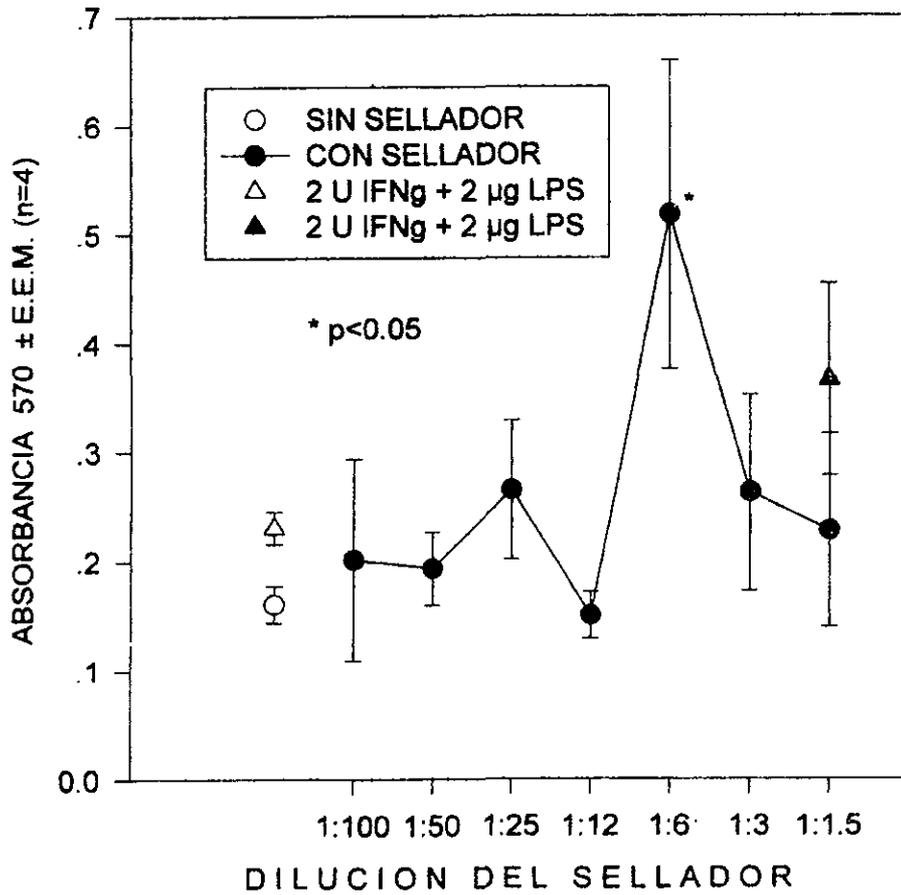
# EFFECTO DEL SELLADOR ZOE EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.



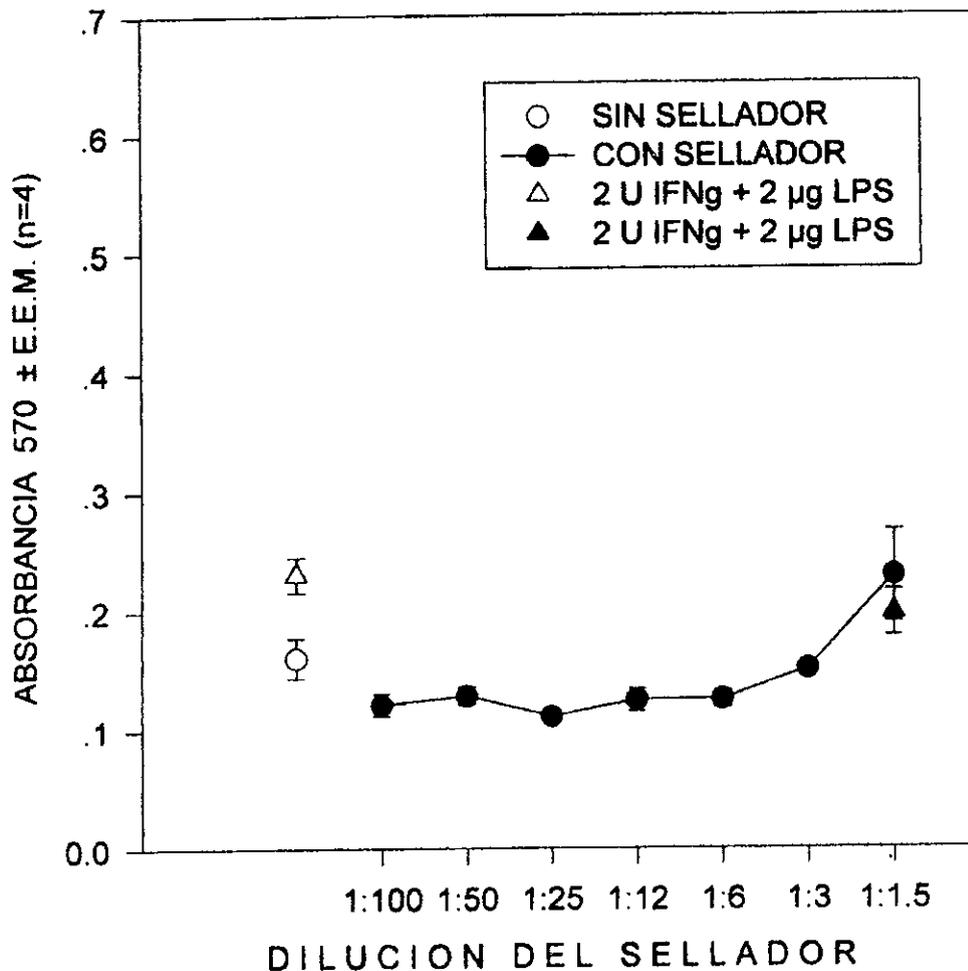
**EFFECTO DEL SELLADOR ZOE + FORMOCRESOL  
EN LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS DE RATON Balb/c EXPUESTOS  
DURANTE 24 hrs.**



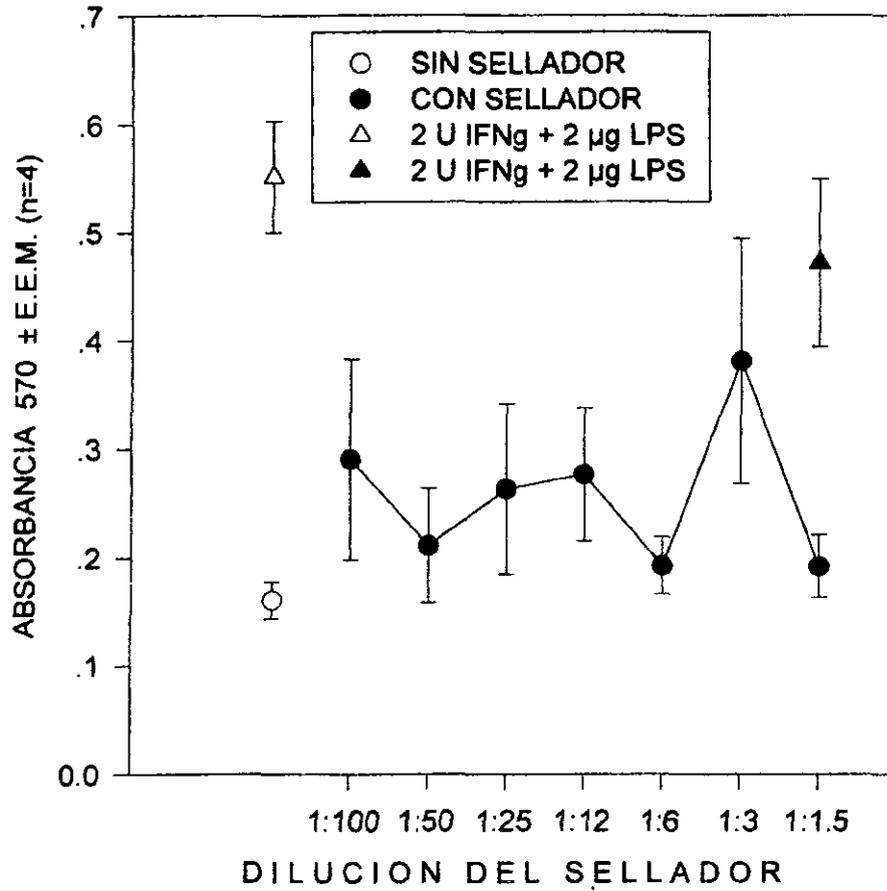
**EFFECTO DEL SELLADOR ENDOMETHASONE EN LA  
SECRECION DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.**



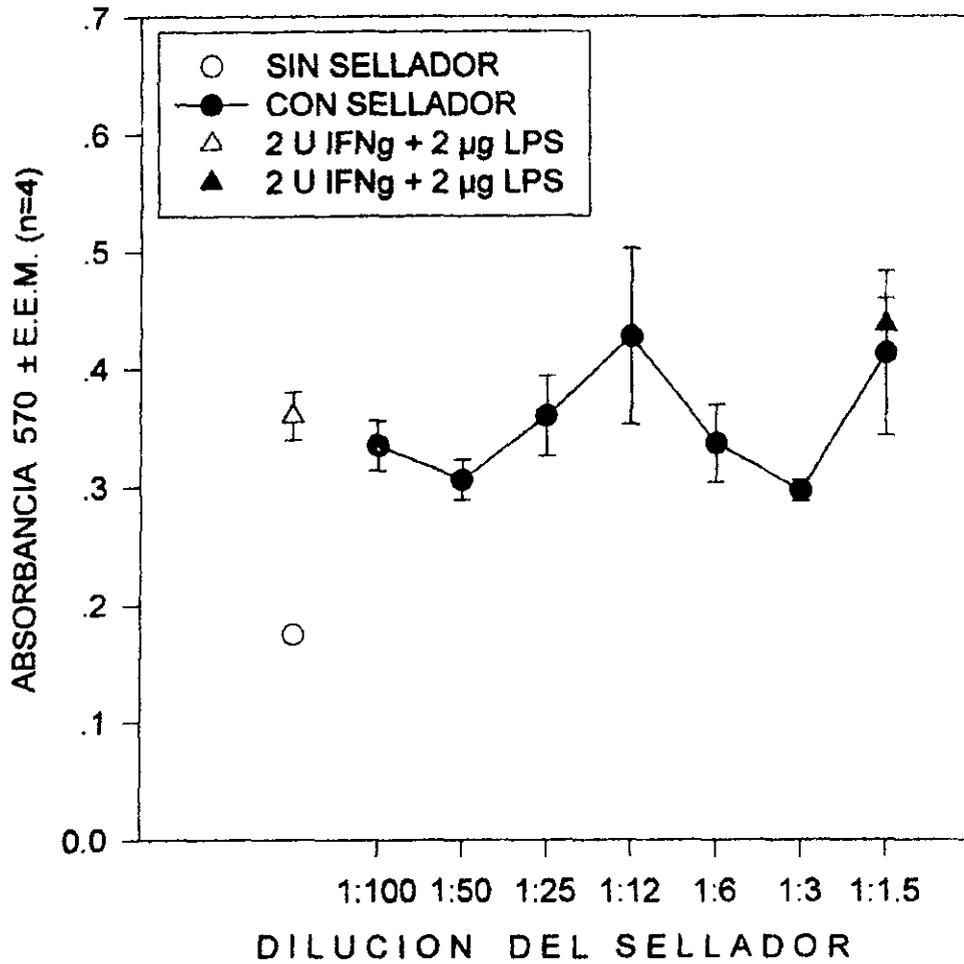
**EFFECTO DEL SELLADOR ROOT CANAL SEALER  
EN LA SECRECION DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS EXPUESTOS  
DURANTE 24 hrs.**



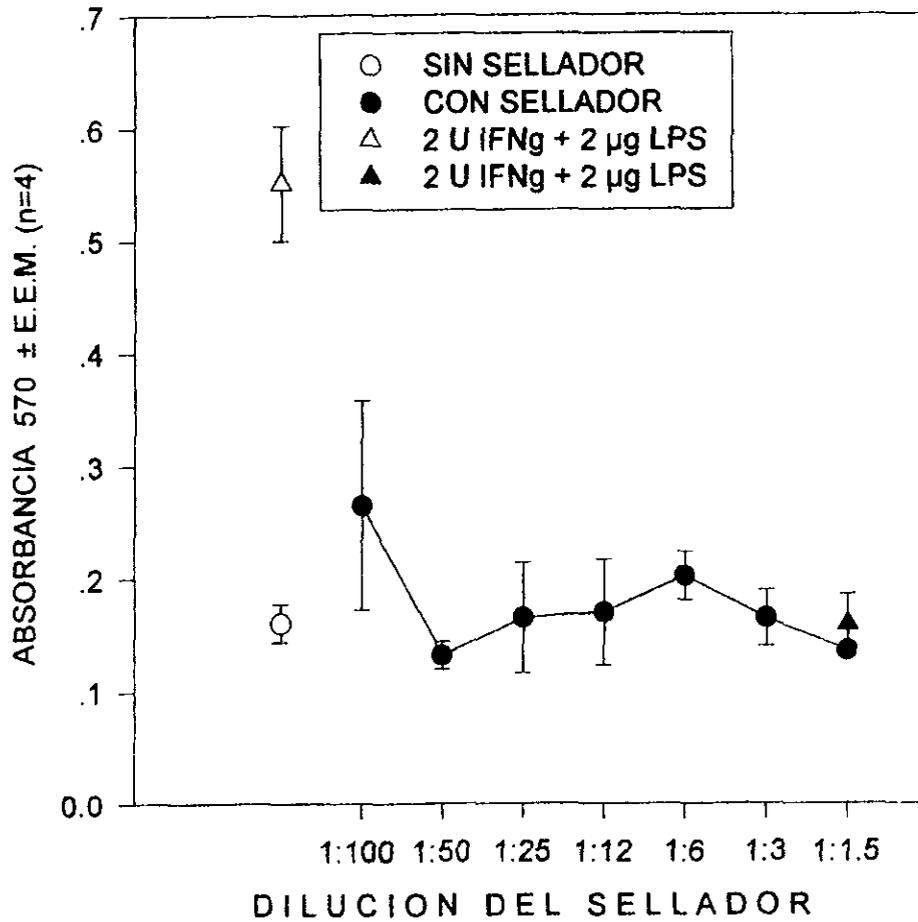
**EFFECTO DEL SELLADOR ROTH EN LA SECRECION DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.**



**EFFECTO DEL SELLADOR SILCO EN LA SECRECION  
DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.**



### EFFECTO DEL SELLADOR ZOE EN LA SECRECION DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS EXPUESTOS DURANTE 24 hrs.



**EFFECTO DEL SELLADOR ZOE+FORMOCRESOL  
EN LA SECRECION DE NO<sub>2</sub> POR MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS EXPUESTOS  
DURANTE 24 hrs.**

