

UNIVERSIDAD DE GRANADA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA



**EXPRESIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS, LINFOCITOS T CD8+
Y MACRÓFAGOS INDUCIDA POR MTA,
PORTLAND Y APEXIT**

Tesis Doctoral

MARÍA ARGELIA AKEMI NAKAGOSHI CEPEDA

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda
D.L.: GR 2741-2011
ISBN: 978-84-694-4450-4

María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda es autora y presenta el trabajo de tesis doctoral titulado *“Expresión de citocinas proinflamatorias, linfocitos T CD8+ y macrófagos inducida por MTA, Portland y Apexit”* bajo la dirección de los profesores Carmen María Ferrer Luque y Alberto Rodríguez Archilla para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Akemi', with a stylized flourish extending to the right.

Fdo.: María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda



Universidad de Granada



Facultad de Odontología

Carmen María Ferrer Luque, Profesora Titular de Patología y Terapéutica Dental de la Universidad de Granada, Directora de la Tesis Doctoral titulada: *“Expresión de citocinas proinflamatorias, linfocitos T CD8+ y macrófagos inducida por MTA, Portland y Apexit”* de la que es autora Dña. **María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda**, realizada dentro del Programa de Doctorado *“Investigación Odontológica en el Tercer Milenio”* desarrollado por el Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada.

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, e mitiendo el siguiente informe:

Los trabajos efectuados en la elaboración de esta memoria han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para optar al Grado de Doctora.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente en Granada a dieciocho de marzo de dos mil once.

Fdo.: Carmen María Ferrer Luque



Universidad de Granada



Facultad de Odontología

Alberto Rodríguez Archilla, Profesor Titular de Medicina Bucal de la Universidad de Granada, Director de la Tesis Doctoral titulada: *“Expresión de citocinas proinflamatorias, linfocitos T CD8+ y macrófagos inducida por MTA, Portland y Apexit”* de la que es autora Dña. **María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda**, realizada dentro del Programa de Doctorado *“Investigación Odontológica en el Tercer Milenio”* desarrollado por el Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada.

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, e mitiendo el siguiente informe:

Los trabajos efectuados en la elaboración de esta memoria han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para optar al Grado de Doctora.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente en Granada a dieciocho de marzo de dos mil once.

Fdo.: Alberto Rodríguez Archilla

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

De la Universidad de Granada y de la Facultad de Odontología:

A mis directores, la Dra. **Carmen María Ferrer-Luque** y el Dr. **Alberto Rodríguez Archilla**, por su experta y valiosa asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. **Alejandro Ceballos Salobreña** quien con su tenacidad y experiencia visionaria dio inicio a este programa doctoral.

De la Universidad Autónoma de Nuevo León y de la Facultad de Odontología:

A la Dra. **Marianela Garza Enríquez**, por permitirme ser parte de este programa doctoral. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. **Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda**, mi hermano, agradezco su continuo y afectuoso aliento.

Al Dr. **Juan Manuel Solís Soto** investigador innato y entusiasta, gracias por su apoyo incondicional e importante asesoría.

A la Dra. **Rosa Isela Sánchez Nájera** amiga y compañera, le agradezco su optimismo contagioso, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A la Dra. **Lizeth Edith Quintanilla Rodríguez** gracias por su calidez y compañerismo al haberme brindado todo el apoyo y colaboración durante la realización de los experimentos.

Al Lic. **Gustavo Israel Martínez González** gracias por sus experta orientación en el análisis estadístico de los datos.

A mis **compañeros maestros y colaboradores** del departamento de Histología, gracias por su apoyo.

A mi esposo, Feliciano, por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo.

A **Izumi** y **Roberto**, mis queridos hijos, porque que siempre me han apoyado y estimulado.

Pero sobre todo, gracias a **Dios**, porque Él ha puesto los medios para la realización de este trabajo... Es mi deseo que sea de beneficio para el ejercicio de la Odontología.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	10
INTRODUCCIÓN	12
Cementos endodónticos	13
Respuesta inmunológica	23
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Descripción de la muestra	39
Técnicas histológicas	41
Análisis morfométrico	46
Análisis estadístico	46
RESULTADOS	48
Cemento Apexit	48
Cemento MTA	51
Cemento Portland	56
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	72
APÉNDICES	84

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El uso de cementos selladores en la terapéutica endodóntica es indispensable y, dado que estos materiales pueden estar en contacto con los tejidos periapicales, una de las cualidades más importantes que se requieren es que sean biocompatibles.

Existe una gran variedad de cementos selladores para la obturación de conductos radiculares, que se clasifican según su composición química. Entre los más utilizados se encuentran los basados en óxido de zinc y eugenol, resinas epóxicas o hidróxido de calcio. Por otra parte, los cementos MTA y Portland son materiales con diversas indicaciones en la terapéutica endodóntica, siendo su principal cometido sellar las comunicaciones entre el conducto radicular y los tejidos circundantes.

Numerosos estudios han evaluado y comparado las propiedades físicas y químicas de los cementos de uso endodóntico, sin embargo, se desconoce su capacidad para inducir la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, así como la respuesta del sistema inmune en el tejido conjuntivo.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Analizar la expresión de IL-6, IL-1Beta, TNF-Alfa, RANTES, MIP-3, linfocitos T CD8 y macrófagos (CD 14) en ratones inoculados con Apexit®.
- 2) Valorar la expresión de IL-6, IL-1Beta, TNF-Alfa, MIP-3, linfocitos T CD8 y macrófagos (CD 14) en ratones inoculados con MTA.
- 3) Evaluar la expresión de IL-6, IL-1Beta, TNF-Alfa, RANTES, MIP-3, linfocitos T CD8 y macrófagos (CD 14) en ratones inoculados con Portland.

INTRODUCCIÓN

El correcto diagnóstico, la adecuada preparación y una obturación lo más hermética posible son los pilares fundamentales para lograr el éxito del tratamiento endodóntico.

Una de las principales metas de la endodoncia es conseguir una obturación tridimensional y estable, del complejo sistema de conductos radiculares, para impedir la reinfección y/o el recrecimiento de los microorganismos. De esta forma la creación de un ambiente biológicamente adecuado permitirá la cicatrización de los tejidos afectados. Así, los materiales utilizados para conseguir este objetivo deben poseer unas características adecuadas para la situación clínica requerida.

La obturación de conductos radiculares incluye un material de núcleo, sólido o semisólido, y cementos selladores como materiales plásticos (1). La gutapercha, desde su introducción por Bowman en 1867 (2-4) es el material de núcleo universalmente aceptado (5) y utilizado en la obturación de los conductos radiculares. Los cementos selladores son los materiales que sirven para unir el material de núcleo entre sí y a la pared dentinaria, es decir, sellan las interfases existentes en el interior del conducto.

La utilización de cementos en la terapia endodóntica no se limita solamente a la obturación del conducto radicular, ya que existen otras indicaciones de uso tales como: recubrimiento pulpar, pulpotomía, formación de una barrera apical en dientes con ápices abiertos, reparación de perforaciones de la raíz o de la cámara pulpar y obturación retrógrada de conductos donde es necesario sellar las vías de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y los tejidos circundantes.

1. Cementos endodónticos

1.1. Cementos para la obturación de conductos radiculares

Entre los requisitos ideales que debe cumplir un buen cemento sellador de conductos radiculares encontramos (6,7):

- Fácil de introducir en el conducto radicular, con un tiempo de trabajo suficiente.
- Estable dimensionalmente, sin contraerse tras su introducción.
- Impermeable, sin solubilizarse en medio húmedo.
- Sellar la totalidad del conducto, tanto apical como lateralmente.
- Debe ser bien tolerado por los tejidos periapicales.
- Debe ser radioopaco, para poder distinguirlo en las radiografías.
- No debe teñir los tejidos del diente.
- Debe ser estéril o fácil de esterilizar antes de su introducción.
- Ha de poder retirarse con facilidad del conducto si es necesario.
- Debe ser bacteriostático.
- No ha de generar una reacción inmunitaria al ponerse en contacto con el tejido periapical.
- No debe ser mutagénico, ni carcinogénico.

Existen una gran variedad de cementos selladores endodónticos en el mercado, los cuales pueden ser clasificados atendiendo a su composición química (8).

COMPONENTE PRINCIPAL**CEMENTOS SELLADORES****Óxido de zinc-eugenol**

- Cemento de Grossman (Star Dental, Sultan Chemist).
- Cemento de Rickert (Sybron Kerr).
- Tubliseal (Kerr).
- Tubliseal EWT (Kerr).
- Endométhasone (Septodont).
- N 2 (Agsa).
- Rocanal 2 y 3 (La Maison Dentaire).
- Traitment Spad (Spad).
- Roth (Roth Int).

Hidróxido de Calcio

- Sealapex (Sybron Kerr).
- Calciobiotic Root Canal Sealer o CRCS (Hygenic).
- Apexit (Vivadent).
- Vitapex (Neo Dental Chemical Products).

Ionómero de vidrio

- Ketac-Endo (Espe).
- Lee Endo-Fill (Lee Parapharmaceuticals).

Siliconas

- RSA RoekoSeal (Roeko).
- GuttaFlow (Roeko).

Resinas plásticas

- Diaket (Espe).
- AH-26 (De Trey).

	- AH-Plus o Topseal (Dentsply).
	- Thermaseal (Tulsa Dental).
	- EndoREZ (Ultradent).
Resinas hidrofílicas	- Hydron (NDP Dental System).
Modificaciones de gutapercha	- Kloroperka N-O (N-O Therapeutics).
Poliésteres	- Epiphany (Pentron).
	Real Seal (Sybron).

Cementos basados en hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio es un polvo blanco que se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico, $\text{CO}_3\text{Ca} = \text{CaO} + \text{CO}_2$. Cuando se usa en forma de polvo puro es considerado como el medicamento de elección, tanto en la protección pulpar directa como indirecta, y en la pulpotomía vital. Su pH es alcalino, aproximadamente de 12.4, por lo cual es un magnífico bactericida y esporicida.

El hidróxido de calcio induce la remineralización de la dentina reblandecida, libera de gérmenes la cavidad y estimula la cicatrización gracias a su capacidad de inducir la formación de dentina de reparación. Existen en el mercado diferentes marcas de cementos que tienen como base el hidróxido de calcio pero que contienen, además, otros elementos que les permiten poseer las características deseadas de un sellador endodóntico, un ejemplo de éstos selladores es Apexit®.

Apexit es un material para la obturación de los conductos radiculares, de la casa Vivadent®, que contiene hidróxido de calcio y que puede ser utilizado en combinación con los conos de gutapercha o con elementos metálicos habituales. Las ventajas que brinda son su biocompatibilidad, su escasa solubilidad, fácil manipulación, ausencia de eugenol, ausencia de aldehído fórmico, buena radiopacidad y buen período de almacenamiento.

Su ficha técnica es la siguiente: material para obturación de conductos radiculares presentado en forma de dos pastas en jeringas (pasta base y pasta activadora).

La fórmula del Apexit® contiene en 1,0 gr. de pasta:

BASE	
Hidróxido de calcio	0,319 gr.
Colofonia hidrogenada	0,315 gr.
Dióxido de silicio silanizado altamente disperso	0,081 gr.
Oxido de calcio	0,056 gr.
Oxido de Zinc	0,055 gr.
Fosfato tricálcico	0,041 gr.
Polimetilsiloxano	0,025 gr.
Estearato de Zinc	0,023 gr.

ACTIVADOR	
Salicilato de trimetilhexanodiol	0,250 gr.
Carbonato de bismuto básico	0,182 gr.
Oxido de bismuto	0,182 gr.
Dióxido de silicio silanizado altamente disperso	0,150 gr.
Salicilato de 1-3 butanodiol	0,114 gr.
Colofonia hidrogenada	0,054 gr.

Estudios *in vitro* para evaluar la citotoxicidad de selladores endodónticos, con diferente composición química, mostraron que Apexit fue menos citotóxico que AH Plus® y Ketac Endo® sobre fibroblastos L929 (9) y sobre fibroblastos del ligamento periodontal comparado con N2®, Endomethasone®, Ketac Endo® y AH Plus® (10). Otro trabajo similar mostró que, aunque todos los selladores endodónticos anteriormente señalados son citotóxicos, Apexit® es el cemento sellador que posee menor citotoxicidad (11).

Un estudio histopatológico (12) evaluó la biocompatibilidad de diferentes selladores endodónticos basados en hidróxido de calcio: Sealapex®, CRCS®, Sealer 26® y Apexit®, mediante su implantación subcutánea y en cavidad peritoneal de ratones. Se analizó la respuesta del tejido subcutáneo a los 2, 4, 8 y 16 días. En todos los cementos se observó una intensa migración de neutrófilos durante los periodos iniciales. Se encontraron diferencias en cuanto a la presencia de necrosis y del número de células inflamatorias. En la fase intermedia, se encontró una marcada diferenciación celular del sistema fagocítico en macrófagos, células epiteliales y células gigantes multinucleadas con Sealapex®. La respuesta fue menos intensa con el CRCS® y con Apexit®. Los resultados de la inyección en la cavidad peritoneal con soluciones que contenían los cementos selladores mostraron durante las etapas iniciales (6-24 horas) una intensa migración de leucocitos polimorfonucleares. Un incremento de células mononucleadas fue observado, de 6 a 24 horas y a los 5 días, para todos los cementos selladores y no se encontraron diferencias en relación con el grupo control a los 15 días.

Otro estudio donde se comparó la secreción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales de ratones en presencia de un sellador a base de hidróxido de calcio (Sealapex) y otro basado en óxido de zinc y eugenol (Endomethasona) mostró que el sellador basado en hidróxido de calcio indujo la menor cantidad de secreción de TNF-alfa (13).

1.2. Cementos endodónticos de uso diverso

Cemento MTA (Agregado de trióxido mineral)

El Agregado de Trióxido Mineral (MTA) es un cemento derivado del cemento Portland que comparte los mismos componentes principales: calcio, fosfato y sílice (14). Está compuesto principalmente de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico y óxido de silicato, así como una pequeña cantidad de óxidos minerales, responsables de las propiedades físicas y químicas de este agregado, además se le ha adicionado también óxido de bismuto que le proporciona radioopacidad (15).

Composición:

3 CaO-SiO₂ Bi₂O₃	(Silicato tricálcico) (Óxido de bismuto)
2 CaO-SiO₂ 3 CaO-Al₂O₃	(Silicato bicálcico) (Aluminato tricálcico)
3CaO-Al₂O₃-Fe₂O₃ CaSO-2H₂O	(Aluminoferrato tricálcico) (Sulfato de calcio dihidratado o Gypsum)
Cemento Portland Óxido de Bismuto	75% por peso. 20% por peso

Está hecho de finas partículas hidrofílicas que endurecen en presencia de humedad o sangre. Ha mostrado ser biocompatible, radioopaco, de una dureza difícil de infiltrar en comparación con otros cementos utilizados para el relleno de los conductos, y además posee la habilidad de formar cristales de hidroxiapatita cuando es expuesto a soluciones fisiológicas (16).

El MTA recibió su aprobación por la U.S. Food and Drug Administration (Administración o Federación de Drogas y Alimentos de Estados Unidos) en 1998. Desde su primera descripción

en la literatura dental por Lee y cols. en 1993, el MTA ha sido utilizado en aplicaciones tanto quirúrgicas como no quirúrgicas (17). Tanto en humanos como en animales ha mostrado tener un excelente potencial en pulpotomías y como protector pulpar y (18).

Es un cemento de elección no solo en casos de cirugía endodóntica (como material de obturación retrógrada), sino también como cemento para sellar las perforaciones de la cámara pulpar y de la raíz, reabsorciones internas, desgastes, readaptaciones, laceraciones y transportaciones apicales. También se utiliza en tratamientos de apicoformación, en vez del hidróxido de calcio, con resultados más rápidos y predecibles (19-21). Asimismo, el MTA ha mostrado tener efectos benéficos sobre la pulpa y la regeneración del ligamento periodontal, dada su excelente biocompatibilidad (22). Además, MTA provee una mejor protección frente a la microfiltración de colorantes, fluidos y modelos de penetración bacteriana (23).

El propósito de tratar las perforaciones de furca y/o radicales es sellar la comunicación artificial entre el espacio endodóntico y el tejido perirradicular para prevenir la reabsorción alveolar y el daño en el ligamento periodontal. Esta complicación, no poco frecuente, requiere un tratamiento inmediato con un material capaz de sellar eficazmente la comunicación artificial y evitar así el daño clínico del tejido periodontal circundante (24, 25).

Estudios *in vivo* e *in vitro* (26-29) han evaluado la biocompatibilidad del MTA en comparación con otros materiales endodónticos como el IRM, SuperEBA, amalgama, AH Plus, ProRoot, Dycal, GIC, mostrando que es uno de los materiales más biocompatibles, ya que prácticamente no produce una respuesta inflamatoria, promueve la regeneración de tejidos

duros y es poco citotóxico. Igualmente se ha demostrado que no produce genotoxinas, por lo que no produce muerte celular (30,31).

Un estudio *in vitro* para evaluar el efecto biológico de este material sobre osteoblastos humanos mostró que los osteoblastos pueden crecer en presencia de MTA y éstos son capaces de secretar citocinas como IL-1 α , IL-1 β e IL-6, además incrementó la secreción de osteocalcina y de fosfatasa alcalina, estando de acuerdo con estudios donde se menciona que el MTA induce la generación de tejidos duros. (32-35). Asimismo, en un trabajo *in vitro* sobre el efecto del MTA en macrófagos, se demostró que la actividad de los macrófagos para fagocitar no se ve afectada por la presencia de MTA (36).

Cemento Portland

El cemento Portland tiene sus orígenes en la cal u óxido de calcio, a partir del cual y luego de cientos de años de estudios, empíricos y científicos, se llega a lo que hoy se conoce como cemento. El cemento Portland no es un compuesto químico simple, sino que es una mezcla de muchos componentes. Cuatro de ellos conforman el 90% o más del peso del cemento Portland y son: el silicato tricálcico, el silicato dicálcico, el aluminato tricálcico y el aluminio ferrito tetracálcico. Además de estos componentes principales, algunos otros desempeñan papeles importantes en el proceso de hidratación. Los diversos tipos de cemento Portland contienen los mismos cuatro compuestos principales, pero en proporciones diferentes.

Un estudio que se realizó sobre los cementos que usaron los mayas para sostener incrustaciones de jade, jadeíta, pirita, etcétera, en dientes de personas, mostró que la composición química de estos cementos es similar a la del cemento que se emplea en la

construcción (Portland). Aunque, también, podría ser los cementos Cruz Azul® o Tolteca® con los que estamos más familiarizados (37).

Tanto el MTA como el cemento Portland, se proponen como dos materiales muy semejantes por compartir sus principales componentes: fosfato, calcio y silicio, además, el análisis macroscópico, microscópico y de difracción de rayos X, muestra que ambos materiales son casi idénticos. Respecto a su manipulación, ambos son mezclados con agua que al evaporarse queda dentro de la fase sólida (38).

Dada la similitud entre el MTA y el cemento Portland se han realizado estudios para comparar la composición química de estos materiales; así como para obtener la posibilidad de utilizar el cemento Portland como una alternativa menos costosa al MTA en la práctica dental. Estos estudios demuestran que estos materiales son tan similares que básicamente difieren en que el MTA posee iones de bismuto, que le proveen la radioopacidad, así como iones potasio que no posee el cemento Portland (39,40). Al cemento Portland se le puede agregar 20% de óxido de bismuto y éste sigue teniendo un gran potencial para ser utilizado como material de sellado de conductos radiculares, en comparación con el cemento que posee menos cantidad de bismuto, sin que afecte su capacidad de citotóxica y con la ventaja de ser radiopaco (41).

Tanto al MTA como al cemento Portland se le pueden agregar aceleradores como cloruro de calcio, nitrato y nitrito de calcio y formato de calcio para disminuir el tiempo de trabajo sin modificar la estabilidad dimensional de estos materiales, sin embargo, es necesario hacer más investigación en relación a la biocompatibilidad y la capacidad de sellado de estos cementos mezclados con los aceleradores (42).

Por otro lado se ha estudiado también el sellado marginal que posee el cemento Portland en comparación con el MTA blanco y el MTA gris y se encontró que los huecos entre los cementos y la dentina son muy similares en todos los materiales estudiados, es decir, no hay una diferencia significativa en el sellado marginal entre ellos (43).

El cemento Portland blanco es un producto que ha mostrado resultados favorables cuando se utilizó para el sellado del un ápice inmaduro en un diente con pulpa necrótica (44), esto probablemente se deba a que este cemento ha demostrado no ser citotóxico (45) siendo además capaz de inducir la expresión de osteonectina y de sialoproteína dentinaria según un estudio para evaluar la respuesta de células de la pulpa humana al cemento Portland (46). Además, en este mismo trabajo se sugiere que el cemento Portland permite la expresión de genes relacionados con la mineralización y que tiene un potencial para ser utilizado como material de protección pulpar.

Según un estudio, donde se evaluó la capacidad de sellado de tres cementos, MTA Angelus®, MTA Bio® y Portland, utilizados en reparaciones de furca (47), se comprobó que el cemento Portland tiene una capacidad de sellado muy similar al MTA Angelus® y al MTA Bio®, dos de los materiales más utilizados para sellar perforaciones de furca.

En cuanto a la capacidad antimicrobiana, propiedad deseable de los cementos endodócticos, los resultados son controvertidos. En un estudio (48) para evaluar esta capacidad en presencia de las bacterias *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida Albicans* y *Enterococcus faecalis*, comparando el cemento Portland con los selladores Sealer 26®, Sealapex®, óxido de zinc y eugenol, MTA-Angelus® y

Pro Root MTA[®], se demostró que todos estos cementos incluyendo el Portland poseen actividad antimicrobiana. Sin embargo, en otro estudio (49), donde se compararon los cementos N- Rickert[®], Sealapex[®], AH Plus[®], MTA y cemento Portland también en presencia de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, y *E. coli*, encontraron que sólo AH Plus[®] y N-Rickert[®] presentaron actividad antimicrobiana frente a *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli*; mientras que no se observó esta capacidad con MTA, Sealapex ni el cemento Portland. Además, *E. faecalis* fue resistente a todos los cementos selladores probados.

La posible utilización del cemento Portland, como material dental, ha abierto nuevas líneas de investigación (50). Se han estudiado diferentes prototipos de cementos, basados en el cemento Portland, donde se proponen estos prototipos como potenciales materiales de restauración dental, dadas sus propiedades físicas, químicas y biológicas (51).

2. Respuesta inmunológica

Son muchas las estrategias de las que dispone el cuerpo humano para protegerse de organismos invasores, proteínas extrañas y antígenos en general. Las barreras físicas son la primera línea de defensa por ser estructuralmente impermeables y por poseer características especializadas que les permiten repeler a estos agresores. Cuando un agente patógeno logra superar las barreras de superficie, y penetra en el cuerpo humano, se enfrenta a una cascada de diversos factores que vigilan los tejidos internos. Estas defensas internas se han agrupado en dos sistemas funcionales más o menos distintos: inmunidad innata, si la inmunidad o resistencia que confieren contra un patógeno particular está desde siempre, e inmunidad adquirida, si se desarrolla después de establecer contacto con el patógeno.

Estos sistemas constan de numerosos elementos con los que realizan diferentes funciones protectoras. Algunos de estos elementos son células que tienen la habilidad para reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias dañinas, las defensas suministradas por tales células se conocen como inmunidad mediada por células o inmunidad celular. El resto de los componentes son macromoléculas solubles que circulan por la sangre y en el líquido extracelular, haciendo a éstos fluidos inhóspitos para los organismos invasores extraños, aún en ausencia de todos los tipos de células defensoras, las defensas de este tipo, libres de células se denominan inmunidad humoral.

La inmunidad innata y adquirida participan en la defensa del huésped, ambos sistemas son esenciales para preservar la salud. Generalmente los dos tipos de inmunidad actúan de manera coordinada y suelen depender una de la otra para generar sus efectos máximos, es decir, no son completamente independientes (52).

2.1. Respuesta inmunitaria innata

Se refiere a todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta al patógeno; no requiere de un encuentro o exposición previa a tal agente, ni se modifica significativamente con exposiciones repetidas al patógeno durante toda la vida del individuo. La respuesta inmunitaria innata la proporcionan enzimas, proteínas del torrente circulatorio y líquidos tisulares.

Algunas de las secuelas inmediatas del trauma celular o tisular son síntomas bien conocidos, el sitio afectado y los tejidos circundantes sufren tumefacción, calor, rubor y dolor, signos y síntomas de la inflamación aguda. La vasodilatación y permeabilidad vascular contribuyen a la rápida llegada de factores defensivos inespecíficos innatos al sitio donde se requieren; la

unión de los leucocitos al endotelio es esencial para la atracción de células de defensa al sitio de trauma o infección.

Todos los tipos de leucocitos contribuyen a la defensa del huésped, tres de ellos desempeñan funciones preeminentes, dos de ellos, los neutrófilos y los monocitos-macrófagos, son células fagocíticas que actúan mediante la fagocitosis y digestión de bacterias y detritus celulares. El tercer grupo, compuesto por linfocitos, posee una capacidad fagocítica mínima pero se encarga de llevar a cabo otras reacciones protectoras conocidas en conjunto como respuestas inmunes, son los representantes principales de la inmunidad adquirida.

Los leucocitos establecen contacto con gran variedad de mediadores inflamatorios conocidos como factores quimiotácticos leucocitarios, de los cuales los más relevantes son las quimiocinas, un grupo estructuralmente diverso de proteínas citocinas, que pueden ser secretadas por células endoteliales activadas y por muchos otros tipos celulares como respuesta a la lesión tisular. Cada una de estas quimiocinas puede atraer selectivamente a tipos de leucocitos que portan los receptores de superficie correspondientes. Las quimiocinas, aunque son proteínas solubles, tienden a adherirse a la superficie de las células endoteliales, así como a la matriz extracelular, formando un gradiente de concentración estático de quimiocinas que comienza en el endotelio venular, se incrementa al cruzar los tejidos y alcanza su pico máximo en el sitio del daño (53).

La inflamación aguda se detecta a los 30 minutos del trauma agudo; las células generalmente se acumulan hasta valores muy altos a las 8 a 12 horas y continúan llegando al sitio del daño más y más hasta que desaparecen las señales quimiotácticas, entonces la concentración periférica de neutrófilos regresa gradualmente a la normalidad en el transcurso de días a semanas (54).

El sistema de fagocitos mononucleares deriva del monocito, el cual una vez establecido en un sitio determinado adquiere el nombre de macrófago o histiocito. Los macrófagos activados secretan una gran variedad de sustancias biológicamente activas, se han identificado más de 100 productos de secreción de macrófagos, entre ellos numerosas citocinas que influyen en el crecimiento y las actividades de otros tipos celulares y quimiocinas que atraen linfocitos y otros leucocitos vecinos (55).

Los macrófagos son las células efectoras de la inmunidad innata de mayor importancia, ya que son capaces de controlar acciones de los linfocitos por medio de la liberación de citocinas que controlan la proliferación, diferenciación y función efectora de los linfocitos y al formar parte de las células presentadoras de antígenos más importantes procesan y exhiben en su superficie sustancias extrañas, de manera éstas puedan ser reconocidas por los linfocitos y éstos respondan a su presencia; por lo tanto, a través de estas acciones los macrófagos tienen la capacidad para iniciar y coordinar las respuestas inmunes adquiridas (56).

2.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

Se refiere a la resistencia del cuerpo humano que en el primer contacto con un patógeno nuevo es débil o ausente, pero se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes al mismo patógeno específico. Las respuestas inmunes adquiridas se dirigen en contra de proteínas. La respuesta inmune adquirida discrimina entre lo propio y lo extraño, es específica y posee memoria.

Las reacciones protectoras subyacentes a la inmunidad adquirida, se denominan respuestas inmunes. Toda respuesta inmunitaria es una secuencia compleja e intrincadamente regulada

de procesos que afecta varios tipos celulares. Se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y encuentra una clase especializada de células llamadas APCs (células presentadoras de antígeno); estas capturan una cantidad diminuta de antígeno y la exhiben, de manera que pueden ser reconocida por linfocitos T cooperadoras específicos de antígeno. Las células T cooperadoras se activan y promueven la activación de otros tipos de linfocitos como las células B o las células T citotóxicas. Los linfocitos activados proliferan y realizan sus funciones secretoras específicas, estos inactivan o eliminan exitosamente al antígeno.

Aunque los linfocitos y las APCs son las células clave en todas las respuestas inmunitarias, pueden reclutarse otro tipo de célula por dichas respuestas. Las citocinas, quimiocinas y otros productos liberados por linfocitos y macrófagos activados pueden ejercer quimioatracción sobre neutrófilos o eosinófilos, estimulan la proliferación de fibroblastos y células endoteliales, o hacer que células y basófilos descarguen otras sustancias bioactivas en los tejidos locales. Estos agentes, así como los productos de la cascada del complemento, pueden conducir directa o indirectamente a la inflamación aguda, que generalmente acompaña a las respuestas inmunes (57).

2.2.1. Citocinas

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles (aproximadamente 25kDa) secretadas por varios tipos de células. Usualmente, éstas son liberadas en el cuerpo en respuesta a la activación e inducen una respuesta a través de receptores específicos. Las citocinas pueden actuar de manera autocrina, afectando el comportamiento de la célula que la produce, de manera parácrina, afectando el comportamiento de células adjuntas a la que la produce, y algunas citocinas, que son lo suficientemente estables, pueden actuar de manera endocrina afectando el comportamiento de células a distancia, aunque esto depende de la habilidad de éstas para entrar en la circulación y de su vida media en la sangre (58-61).

Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a patógenos son un grupo estructuralmente muy diverso que incluyen: IL-1 Beta, IL-6, IL-12, TNF-Alfa y la quimiocina IL-8. El nombre interleucina (IL) seguido por un número fue denominado con la finalidad de desarrollar una nomenclatura estandarizada para moléculas secretadas por leucocitos. Hay dos grupos principales de citocinas: la familia de hematopoyetinas, las cuales incluyen hormonas del crecimiento y también muchas interleucinas que juegan papeles importante en la respuesta inmune innata y adaptativa; y la familia de TNF, la cual también tiene un rol importante en la respuesta inmune innata y adaptativa. De las interleucinas derivadas de macrófagos, IL-6 pertenece a la gran familia de hematopoyetinas, TNF-Alfa es obviamente parte de la familia de TNF, IL-1 e IL-12 son estructuralmente distintas. Todas tienen importantes efectos locales y sistémicos que contribuyen a la respuesta inmune. El reconocimiento de diferentes clases de patógenos puede involucrar distintos receptores de señalamiento con lo que resulta una variación en las citocinas inducidas (58-61).

Interleucina 1 Beta (IL-1beta)

La familia interleucina 1 (IL-1) es un grupo de citocinas relacionadas que incluye dos proteínas agonista (IL-alfa e IL-1beta), cada una derivada de una hendidura enzimática precursora de proteínas (pro-IL-alfa y pro IL-beta), y tres formas de una proteína antagonista (IL-1ra, icIL-1raI, icIL-1raII) (62).

Interleucina 1 es principalmente una citocina inflamatoria. Biológicamente está más relacionada con factor de necrosis tumoral (TNF) que con cualquier otra citocina o interleucina, aunque la estructura y receptores para IL-1 y TNF son claramente distintos. IL-1 puede contribuir al crecimiento celular y a funciones de reparación. Durante la inflamación,

daño inmunológico o infección, debido a sus múltiples propiedades biológicas contribuye a la enfermedad (62).

IL-1 juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la respuesta del huésped a la invasión, siendo un importante factor en el inicio de la respuesta inflamatoria y en la activación de las funciones inmunológicas. Además de esta actividad pleiotrópica y al alto potencial de estos efectos inflamatorios, la actividad de IL-1 es fuertemente regulada en el cuerpo por una compleja red de sistemas de control. Esto incluye la presencia de dos tipos de inhibidores, el receptor antagonista (IL-1RI), el cual es un limpiador natural de IL-1, y el inhibidor IL-1RII. Además, la regulación de la actividad IL-1 es lograda por una estricta jerarquía de afinidad de ligar estos dos receptores (el activador IL-1RI y el inhibidor IL-1RII) para los varios miembros de la familia IL-1 (63).

La familia de las proteínas humanas IL-1 son mediadores clave de la respuesta a infecciones, lesiones y cambios inmunológicos. IL-1 es quien activa la respuesta proinflamatoria en células blanco y el plasma de los receptores de membrana involucrados (64).

Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina multifuncional que juega un importante rol en la inflamación aguda y crónica, así como también está implicada en la reabsorción de hueso. Se ha comprobado que la liberación de IL-6 en células del ligamento periodontal en presencia de *Porfiriomonas Endodontalis* puede jugar un rol en el progreso de la inflamación y reabsorción del hueso alveolar en la enfermedad periodontal y periapical (65).

Tiene efectos sobre múltiples células, incluyendo la promoción y desarrollo de células del sistema inmune y osteoclastos. Se ha comprobado incluso que la depleción de IL-6

promueve el desarrollo de la lesión periapical como resultado de la infección en los conductos radiculares (66).

Hay reportes que demuestran que la liberación de IL-6 y de IL-8 juega un importante rol en la patogénesis de la inflamación. Se detectó la expresión del RNAm de IL-6 y de IL-8 por células humanas osteoblásticas de la línea U2OS en presencia de selladores endodónticos N2 (óxido de zinc y eugenol) y AH plus (resina epoxi) (67).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)

La familia del factor de necrosis tumoral alfa ha sido una de las familias de proteínas más intensamente estudiadas. Esta familia la constituyen 19 miembros que median diversas funciones biológicas al ligar a la superficie de la membrana receptores que pertenecen a la familia de receptores TNF (TNFr) (68). Los miembros de ésta familia, por otra parte, también pueden ejercer daño en el huésped, como sépsis o caquexia en tumores, y enfermedades autoinmunes. Además, ahora son conocidos el papel esencial de los miembros de la superfamilia de TNF, TNF-alfa, TNF-beta, TNF y LIGHT, así como sus receptores durante la organogénesis de órganos linfáticos secundarios y el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos linfáticos (69).

EL TNF es una citocina proinflamatoria que juega un rol crítico en diversos eventos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis; estando también involucrada en muchos tipos de enfermedades. Se ha demostrado que las diversas respuestas biológicas mediadas por TNF se alcanzan por la activación de múltiples mecanismos de señalización. Especialmente la activación de factores de transcripción NF-kB y AP-1 juegan un papel crítico durante estas respuestas celulares. TNF-alfa, a través de conexiones a receptores específicos sobre la membrana celular, actúa iniciando una cascada de eventos entre los que destacan

la inducción, activación o inhibición de numerosos genes reguladores de citocinas en el núcleo celular (69).

2.2.2. Quimiocinas

Las quimiocinas son pequeñas secuencias de proteínas que son importantes componentes del sistema inmune innato.

La mayoría son péptidos de 70-125 aminoácidos de longitud y son ricas en residuos de aminoácidos básicos. Las quimiocinas, llamadas así por sus propiedades quimioatrayentes, fueron demostradas por primera vez en pruebas de quimiotaxis de neutrófilos, y es bien conocido que las quimiocinas juegan un rol importante en el tráfico leucocitario, hematopoyesis, organogénesis, comunicación neuronal y modulación de la angiogénesis (70).

La primer quimiocina fue identificada en 1977, subsecuentemente desde 1984 hasta 1989, fueron identificadas otras proteínas relacionadas, incluyendo la proteína 10 inductora de INF-gama (IP-10), monocina inductora de INF-gama, reguladora de la activación de células T normales expresadas y secretadas (RANTES) y proteína de macrófago inflamatoria 1 alfa (MIP-1alfa). En 1992, en el tercer Simposio Internacional sobre citocinas quimiotácticas en Baden, Alemania, el término quimiocina, que es un neologismo corto de citocinas quimiotácticas, fue acuñado y aceptado como estándar. La nomenclatura de las quimiocinas está basada en la configuración del grupo amino-proximal con contenido de cisteína. Basado en este sistema hay actualmente 4 familias de quimiocinas: CXC, CC, CX3C y C (donde X es cualquier amino ácido), CXC o quimiocinas alfa, CC o quimiocinas beta, C o quimiocinas gama y CX3C o quimiocinas delta (70,71).

A finales de la década de 1960, se observó que los linfocitos T activados secretan linfocinas que poseen una actividad quimioatrayente muy potente de monocitos y neutrófilos. Desde entonces, se describieron más de estas quimiocinas. Ahora se sabe que todos los tipos celulares poseen la capacidad para producir una o más quimiocinas, cada una de las cuales actúa sobre tipos específicos de células blanco que cuentan con los receptores apropiados.

Las quimiocinas son multifuncionales, no solo regulan la quimiotaxia, sino también la adhesión, degranulación, angiogénesis, desarrollo de células inmunes y hematopoyéticas, así como la génesis de órganos linfoides. De acuerdo con sus funciones dentro de la fisiología normal y defensa del huésped, las quimiocinas también participan en un gran número de trastornos inflamatorios o autoinmunes (72).

Se han identificado dieciséis receptores de quimiocinas funcionales. Todos ellos pertenecen a la gran superfamilia de receptores que poseen siete dominios transmembranales. Los dieciséis receptores funcionales identificados hasta el momento incluyen cinco CXCR, nueve CCR, un CX3CR y un XCR. Cada uno de estos receptores se une solo a la subfamilia de quimiocinas correspondiente, aunque algunos son capaces de unirse con gran afinidad hasta con ocho miembros diferentes de una subfamilia. Las propiedades biológicas de las quimiocinas están supeditadas por las condiciones bajo las cuales son secretadas, por el receptor al que se unen y por las células donde esos receptores se expresan. La mayoría de las quimiocinas se puede asignar a una de dos amplias categorías funcionales: quimiocinas proinflamatorias, y las quimiocinas homeostáticas o quimiocinas del desarrollo (73).

Las quimiocinas proinflamatorias se producen durante el curso de reacciones inflamatorias o inmunes, y sirven para movilizar las defensas del huésped; las quimiocinas del desarrollo, se producen casi de manera continua y contribuyen a guiar el desarrollo, mantener la

homeostasis o dirigir el tráfico de células circulantes en los tejidos normales. Muchas quimiocinas de las subfamilias CC, CXC y CX3C poseen actividad proinflamatoria, puesto que atraen leucocitos particulares a sitios de lesión o infección. Casi todos los miembros de esta categoría pueden ser secretados por macrófagos activados, aunque algunos miembros individuales también son producidos, después de la estimulación adecuada, por muchas otras células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Los estímulos que inducen la liberación de estas quimiocinas incluyen los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), IL-1, factor de necrosis tumoral α (TNF α), interferón γ (IFN γ) y otras señales de lesión o de estrés tisular. Las quimiocinas proinflamatorias de la subfamilia CC se codifican en el cromosoma 17. El tipo de inflamación que promueven varía de acuerdo con los receptores a los que se unen.

La mayoría de las quimiocinas CC son proinflamatorias y producen sus efectos a través de combinaciones diversas de cinco receptores diferentes, localizados en las células T activadas, dendríticas inmaduras y otros tipos de células mononucleares. Las quimiocinas CC proinflamatorias generalmente promueven la inflamación crónica y respuestas inmunes adquiridas, sus receptores son: CCR1-9 (74).

Hoy en día, la nomenclatura sistemática ha reemplazado a los nombres descriptivos o clásicos aunque éstos todavía son utilizados en la literatura científica reciente. Dentro de las quimiocinas CC se encuentra: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1); RANTES (CCL5) que es quimiotáctico para linfocitos T de memoria, linfocitos NK, eosinófilos y basófilos que expresan el receptor CCR5; la quimiocina MIP3 en la nueva nomenclatura se denomina CCL23 y su receptor es CCR1; proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1- α)/CCL3. Tanto RANTES como MIP son proteínas inflamatorias de macrófagos (75).

RANTES

La actividad quimiotáctica de RANTES, ahora dada la designación inmunológica CCL5, atrae células T, células dendríticas, eosinófilos, células NK, células mast y basófilos a los sitios de inflamación e infección. Debido a su localización y producción, RANTES tiene actividad benéfica atrayendo células inmunes a áreas de infección y daño. También puede ser involucrada en actividades antimicrobianas directas mediante la inducción de monocitos en macrófagos. RANTES puede ser angiogénico y también puede incrementar el potencial metastásico de células cancerígenas (76).

MIP-3

MIP-3 alfa/CCL20/ LARC es el ligando específico para CCR6, es quimiotáctica para monocitos y linfocitos. Fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide producen esta quimiocina en respuesta a TNF-alfa, IL-1, IL-17 e IL-8. Esta quimiocina ha sido implicada en el reclutamiento de IL-17 produciendo células CCR6 Th17 en el líquido sinovial, induce proliferación tanto de osteoblastos como diferenciación de osteoclastos. Y sobre todo el incremento de la expresión de esta quimiocina fue detectada en el hueso subcondral en pacientes con artritis reumatoide (77).

2.2.3. Células**Macrófagos**

Los macrófagos se diferencian al salir de los vasos sanguíneos, son células muy grandes con propiedades fagocíticas ya que poseen organitos en su citoplasma que contienen gránulos en el interior con sustancias citotóxicas contra agentes patógenos. Casi todos los tejidos, órganos y cavidades poseen una población constante de macrófagos residentes y dependiendo en que sitio estén establecidos adquieren un nombre específico, así por

ejemplo histiocitos corresponde al nombre de los que residen en el tejido conjuntivo, células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en el hueso, macrófagos alveolares en el pulmón por mencionar algunos. La forma y función dependen varía según el tejido en el que se encuentren (78).

Los macrófagos también se encuentran en órganos linfáticos. Se ubican en muchas regiones del ganglio linfático, en particular en el seno marginal, donde la linfa aferente ingresa al tejido linfático, y en los cordones medulares, donde se colecta la linfa eferente antes de fluir a la sangre. Su principal función es fagocitar microorganismos y partículas de antígeno y de este modo impedir que ingresen en la sangre. Si bien los macrófagos procesan microorganismos y antígenos fagocitados y exponen antígenos peptídicos en su superficie en conjunto con moléculas co-estimuladores, se piensa que se función principal en los tejidos linfáticos es actuar como fagocitos de patógenos y de linfocitos apoptóticos.

Los macrófagos en reposo tienen pocas o ninguna molécula del MHC de clase II en su superficie y no expresan B7. La expresión de moléculas del MHC de clase II y de B7 es inducida por la ingestión de microorganismos y el reconocimiento de sus patrones moleculares ajenos. Los macrófagos, como células dendríticas hícticas, tienen una variedad de receptores que reconocen componentes de la superficie microbiana, como el receptor de manosa, el receptor fagocítico, receptores del complemento y varios TLR. Tales receptores participan en la fagocitosis de microorganismos y en la señalización para la secreción de citocinas proinflamatorias, que reclutan y activan más fagocitos.

Los macrófagos fagocitan continuamente células muertas o moribunda, que son fuentes ricas en antígenos propios, por lo cual reviste particular importancia que no activen células T en ausencia de infección microbiana (79).

La población de macrófagos exhibe un amplio rango de fenotipos funcionales y antigénicos, que incluyen la producción de citocinas, respuesta a estímulos inmunomodulatorios y la limpieza de patógenos. Su amplia distribución en los tejidos hace que estas células estén capaces de proveer una defensa inmediata frente a elementos exógenos previo a la migración de leucocitos. La circulación de monocitos provee una fuente móvil de inmunocitos competentes funcionalmente capaz de infiltrarse en los tejidos. Porque los macrófagos participan en ambas inmunidades específicas vía presentación de antígeno y producción de IL-1 y la inmunidad no específica en contra de bacterias, virus, hongos y patógenos neoplásicos (80,81).

Linfocitos CD8

Los linfocitos CD8 son grandes linfocitos granulares que median funciones cruciales de la respuesta inmune innata principalmente en contra de infecciones virales. Destruyen células diana que no expresan o deficientemente expresan moléculas del MHC I (82).

La gran mayoría de los linfocitos T CD8 que se diferencian a células efectoras cumplen una función citolítica, eliminando células que se encuentran infectadas por patógenos intracelulares sobre todo virus. Estas células requieren, en general, una mayor coestimulación que los linfocitos CD4, quizá porque son potencialmente más peligrosas. Dicha coestimulación pueden ocurrir de dos formas distintas:

Las células Tc pueden ser directamente activadas por APC con altos niveles de moléculas coestimuladoras, induciendo la síntesis de IL2 necesaria para ejercer su función citolítica sobre esa y otras células infectadas por virus. Cuando la coestimulación es escasa, las células Tc necesitan la presencia y colaboración de las células Th1, que deben reconocer antígenos del mismo patógeno. La unión de la célula Th1 puede inducir un incremento en la actividad coestimuladora en la célula presentadora, siendo capaz ya de activar al linfocito Tc, como en

el caso anterior. O bien, la propia célula Th activada por la célula presentadora puede sintetizar IL2, que es capaz de inducir la diferenciación de la célula Tc efectora.

Los linfocitos CD8 secretan citoxinas (también llamadas citolisinas) sobre cualquier célula diana en la que el linfocito CD8 reconozca de forma específica el complejo antígeno/MHC. Las citocinas en cambio únicamente actúan sobre aquellas células que posean receptores de citocinas en la membrana.

La respuesta funcional de los linfocitos T CD8 es un componente esencial de la respuesta inmune adaptativa para varios cánceres, patógenos bacteriales y virales. Sobre la relación con los antígenos, los CD8 ingenuos rápidamente se expanden y se diferencian en linfocitos T CD8 efectores, produciendo citocinas como INF-alfa y las moléculas efectores, perforinas y granzimas B. Linfocitos T CD8 efectores juegan un rol esencial en la defensa del huésped, usando al menos dos diferentes mecanismos para mediar el asesinato directo de células diana, actúan mediante la liberación de perforinas y granzima B, la cual es una proteasa sérica que induce la apoptosis y también expresa el ligando Fas para unirse a Fas en las células diana resultando en la apoptosis (83).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Metodología

1.1. Descripción de la muestra

Se utilizaron 48 ratones de la cepa BALB/C (hembras y machos), de un peso entre 30 y 40 gr. Y de 12 a 16 semanas de edad (figura 1). Los ratones fueron criados y mantenidos bajo condiciones estándares de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062ZOO-199) en el bioterio del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina UANL. Las condiciones del bioterio fueron: temperatura de 20-25 °C, alimentación con croquetas (Purina®, México S.A. de C.V.) y agua destilada estéril *ad libitum*.

El manejo de los ratones fue hecho respetando los acuerdos de la Declaración de Helsynki. Se obtuvo la autorización del comité de bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey (México).

El comportamiento del ratón es más simple y más dependiente sobre acciones elementales que el comportamiento de la rata (84).



Figura 1.- Ratón de la cepa BALB/C

Se evaluaron los cementos Apexit® (hidróxido de calcio), MTA (sales tricálcicas y óxido de silicato) y Portland (figura 2).



Figura 2.- Cementos endodónticos utilizados en el estudio.

Se utilizaron 48 ratones, se hicieron grupos de 12 ratones cada uno; los primeros 3 grupos fueron los grupos experimentales (problema), el grupo A corresponde a ratones inoculados con Apexit® (cemento a base hidróxido de calcio), el grupo B a ratones inoculados con MTA (cemento a base de sales tricálcicas), el grupo C a ratones inoculados con Portland (cemento a base de sales tricálcicas) y el cuarto grupo es el testigo (T) que corresponden a ratones inoculados con suero fisiológico.

A los ratones se les hizo una inoculación intradérmica 100 μ l del sellador en la región dorsal, mientras que a los del grupo testigo se les inyectó solución fisiológica (figura 3).



Figura 3.- Inoculación intradérmica del cemento.

Los ratones fueron sacrificados mediante la técnica de dislocación cervical a las 12 horas, 24 horas (para evaluar la inflamación aguda) y a los 7 días (para evaluar la inflamación crónica). Del total de 16 ratones, cuatro ratones fueron destinados en cada grupo y cada intervalo de tiempo: 12 de los grupos experimentales y 4 del grupo testigo. Con un bisturí se obtuvieron muestras de tejido de aproximadamente 1 cm. del tejido subcutáneo donde se localizaba el sellador (figura 4). Además se obtuvo el bazo, el cual se colocó junto con la piel como un control positivo.



Figura 4.- Muestras de tejido tras la exposición a los diferentes cementos.

Las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio con formaldehído al 4% con el fin de fijar el tejido, es decir detener los procesos metabólicos *post-mortem*.

Se procesó el tejido y se tiñeron los cortes por las técnicas de hematoxilina y eosina para revisar la respuesta inflamatoria. En cortes seriados, por métodos inmunocitoquímicos, se revisó la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias: TNF- Alfa, IL-1 Beta, IL-6. De modo similar, se analizará la presencia in situ de las quimiocinas: RANTES, MIP-3; así como la presencia de linfocitos T CD8 y macrófagos (CD-14). Un análisis morfológico y morfométrico seguido de las pruebas estadísticas complementarias permitió distinguir cuál tipo de cemento ocasiona mayor respuesta inflamatoria.

1.2. Técnicas histológicas

Técnica de hematoxilina y eosina

Se eligió al azar una laminilla de cada grupo (correspondiente a cada ratón) y fue teñida mediante la técnica de hematoxilina y eosina (figura 5). Se observaron al microscopio y se evaluó si se encontraban presentes las estructuras histológicas que se requerían (epidermis,

dermis, tejido inflamatorio, músculo, folículos pilosos y bazo) para poder realizar las tinciones de inmunocitoquímica y posteriormente el análisis morfométrico.

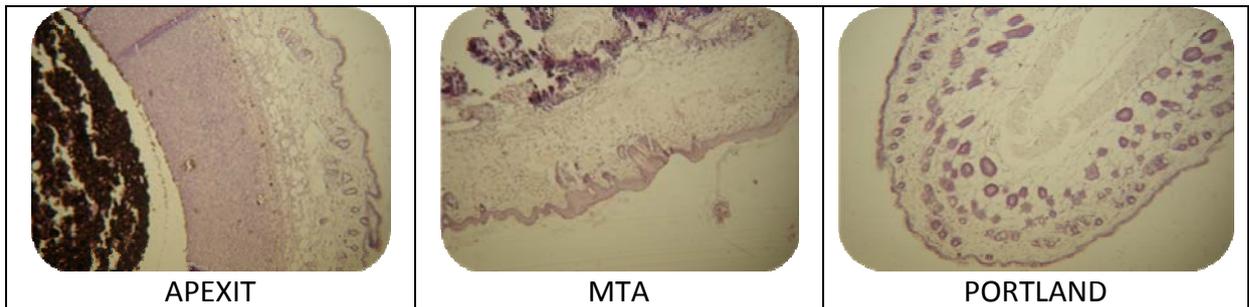


Figura 5.- Muestra de tejido de ratón expuestas a los diferentes cementos teñidas con hematoxilina-eosina

Técnica de inmunohistoquímica

El fundamento de la técnica de inmunohistoquímica se basa en la especificidad que existe en la reacción entre el antígeno y el anticuerpo. Un antígeno es cualquier sustancia que al entrar en el cuerpo es capaz de producir una respuesta inmunológica específica, por otra parte un anticuerpo es una proteína que producida por ciertas células principalmente leucocitos que se unen a los antígenos. Para poder identificar un antígeno específico los anticuerpos se conjugan o unen químicamente con un colorante o sustancia que permita sea visible el complejo antígeno-anticuerpo al microscopio.

Hay métodos donde se combinan técnicas de histoquímica enzimática con métodos inmunohistoquímicos tradicionales para amplificar la reacción localizadora entre un antígeno y un anticuerpo. En este caso la enzima peroxidasa de rábano se conjuga con un anticuerpo primario. Después de producida la reacción antígeno-anticuerpo se pone en marcha el procedimiento histoquímico que detecta la actividad de la peroxidasa para determinar la localización del complejo antígeno-anticuerpo (reacción directa). Para un resultado más específico la peroxidasa se adhiere a una anti- γ -globulina (anticuerpo

secundario) que se une al anticuerpo primario, lo cual amplifica aún más la reacción de la peroxidasa.

Pasos de la técnica de inmunohistoquímica

El siguiente paso después de que las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4%; es la inclusión; sin embargo como la parafina no es miscible con el agua que contiene el tejido se lleva a cabo primero la deshidratación del tejido colocándolo en soluciones alcohólicas en concentraciones crecientes desde 50% hasta 100% para seguir con la aclaración que consistió en colocar la muestra en xileno dos veces; el tejido debe estar en cada solución aproximadamente 5 minutos.

Una vez aclarado el tejido los tejidos se colocaron durante 24 horas en la estufa en recipientes de plástico con parafina previamente derretida a una temperatura de 60°C, permanecerán aproximadamente 2 horas con el fin de que el tejido se impregne perfectamente y posteriormente se realizó un cambio de ésta; el último paso de la inclusión es dejar las muestras a temperatura ambiente con el fin de que solidifiquen (figuras 6 y 7).



Figura 6.- Incubación en estufa 24 horas



Figura 7.- Muestra incluida en parafina



Figura 8.- Microtomo

La microtomía es el siguiente paso, y consiste en hacer cortes histológicos de las muestras de un grosor de 7 μm el cuál se realizará con un micrótomo (figura 8).

Con el fin de lograr que el tejido se extienda se colocaran en el baño María a una temperatura aproximada de 45°C. Los cortes histológicos se colocaran en portaobjetos a los cuáles se les colocará previamente albúmina de Meyer. En seguida los cortes se colocaran en la estufa durante 5 minutos, esto permite que reaccione la albúmina de Meyer con el calor, con el objetivo de que el tejido quede pegado al vidrio (figura 9).



Figura 9.- Cuba de baño María

Se desparafina el tejido, éste paso se lleva a cabo colocando los tejidos en xileno durante 10 minutos 2 veces. Después se lleva a cabo la hidratación que consiste en sumergir los tejidos en soluciones alcohólicas en grado decreciente hasta llegar a solución Buffer PBS (amortiguador salino de fosfatos).

Luego los cortes se colocan en metanol con peróxido de hidrógeno al 0.3%, durante 20 minutos, con la finalidad de eliminar la peroxidasa endógena.

Una vez concluido el tiempo las laminillas se enjuagan en solución Buffer PBS durante 5 minutos 2 veces, para colocar los cortes en las cámaras húmedas (figura 10); para incubar el primer anticuerpo en una dilución 1:300 durante 12 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos policlonales (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en contra de mouse IL-6 (sc-1265 goat), mouse IL-1Beta (sc-1252 goat), mouse TNF-Alfa (sc-52618 rat), mouse MIP-3 (sc-9778 goat), mouse RANTES (sc-1410 goat), mouse linfocitos T CD8 (sc-69653 rat) y mouse macrófagos CD 14 (sc-699 goat).



Figura 10.- Cámaras húmedas para incubación.

Después de las 12 horas las laminillas se enjuagan en solución Buffer PBS 2 veces, el siguiente paso es colocarles el segundo anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se lavan y posteriormente se les coloca en una solución de diaminobencidina al 0.05%, peróxido de hidrógeno al 0.04% en Buffer PBS. Después de lavarlas 2 veces se colocan 1 minuto en hematoxilina de Harris, luego se enjuagan 2 veces en agua corriente, en seguida las laminillas se deshidratan colocándolas en soluciones alcohólicas en concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol al 100% y después se colocan en xileno 2 veces, para posteriormente montarlas con una resina entellan.

Los controles negativos incluyeron la omisión del anticuerpo primario, absorción líquido-fase con el antígeno homólogo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y el uso de suero no inmune. Así

también en cada una de los preparados se incluyó una sección de bazo como testigo positivo de la tinción.

1.3. Análisis morfométrico

Cada una de las laminillas se observaron al microscopio de campo claro y se cuantificó la cantidad de células inmunoreactivas que expresan IL-6, IL-1Beta, TNF-Alfa, MIP-3, RANTES, linfocitos T CD8 y macrófagos (CD 14) en 5 campos de 400X (el ocular era de 10 X y el objetivo de 40 X y factor de tubo 1 X) en cada una de las regiones, es decir, de la epidermis, dermis, músculo, folículos pilosos y en el tejido inflamatorio de alrededor del material inoculado.

1.4. Análisis estadístico

En este trabajo se realizó una estadística descriptiva (media, desviación estándar y porcentajes) y una estadística analítica empleando la prueba T de Student y el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes marcadores. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 15.0.1.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados encontrados para cada uno de los cementos endodónticos fueron los siguientes:

1. CEMENTO APEXIT**APEXIT A LAS 12 HORAS**

Cuando se estudió la expresión de los distintos marcadores inflamatorios en diferentes regiones por parte de las células inmunoreactivas a las 12 horas de la inoculación del cemento Apexit® se encontraron los siguiente resultados: en la expresión de MIP-3, el número medio de células fue de $3,33 \pm 1,52$ a nivel del músculo y de $3,00 \pm 0,57$ células a nivel del folículo piloso. En la expresión de IL-6 se encontraron $4 \pm 1,73$ células en la dermis; $3,66 \pm 1,52$ a nivel del tejido inflamatorio; $6,66 \pm 1,52$ células a nivel del músculo y $14 \pm 5,19$ a nivel del folículo piloso. No se observó expresión de CD8, CD14, Rantes, IL-1beta o de TNF-alfa (figuras 11-15).

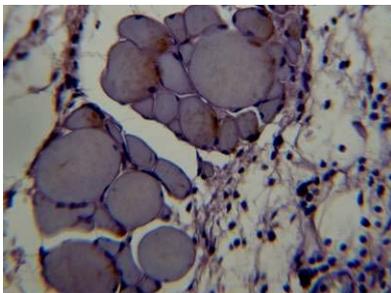


Figura 11.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

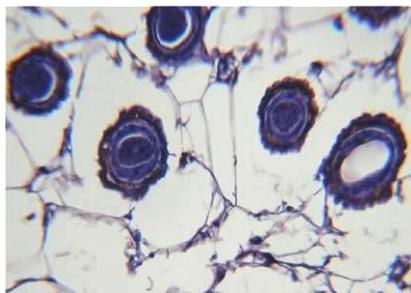


Figura 12.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

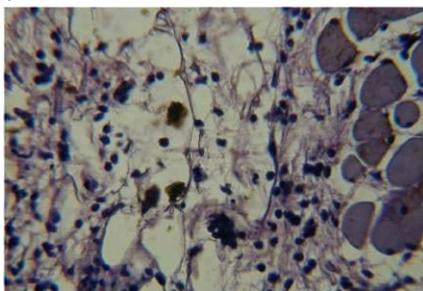


Figura 13.- Células inmunoreactivas en la dermis de la piel con el anticuerpo anti MIP-3.

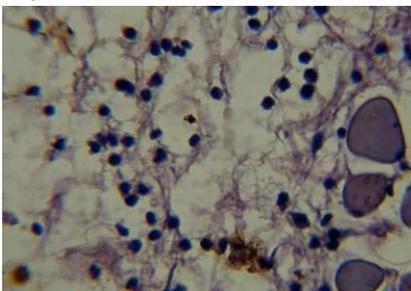


Figura 14.- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio de la piel con el anticuerpo anti MIP-3.

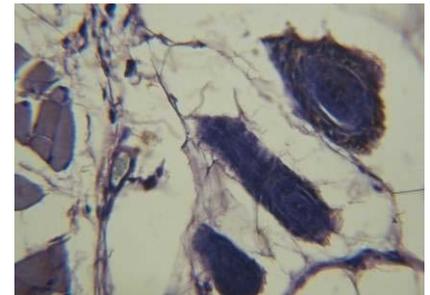


Figura 15.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

Para cada tiempo de inoculación (12 horas, 24 horas y 7 días) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los marcadores expresados por región estudiada (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). Para las muestras obtenidas tras las 12 horas de inoculación con Apexit, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de MIP-3 a nivel del folículo piloso y el músculo. En el caso de la expresión de IL-6, también se encontraron diferencias ($p < 0.05$) a nivel del tejido inflamatorio, el músculo y el folículo piloso (figura 16).

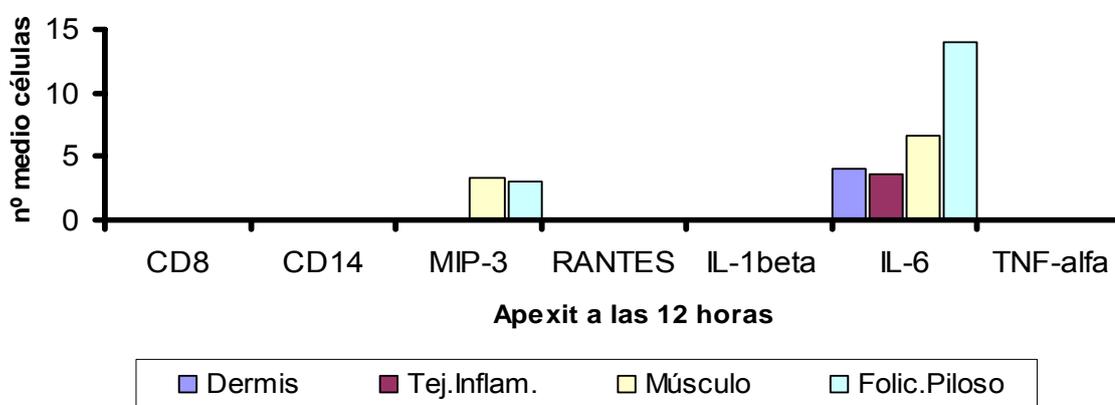


Figura 16.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Apexit a las 12 horas. **Tej. Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic. Piloso:** Folículo piloso.

APEXIT A LAS 24 HORAS

En el caso de la expresión de los distintos marcadores a las 24 horas de la inoculación del cemento Apexit, sólo se apreció expresión de IL-6 con los siguientes recuentos medios de células inmunoreactivas: 5 ± 0 células a nivel del músculo y $14 \pm 5,65$, a nivel del folículo piloso. El resto de marcadores no se expresaron en este intervalo de tiempo (figuras 17 y 18).

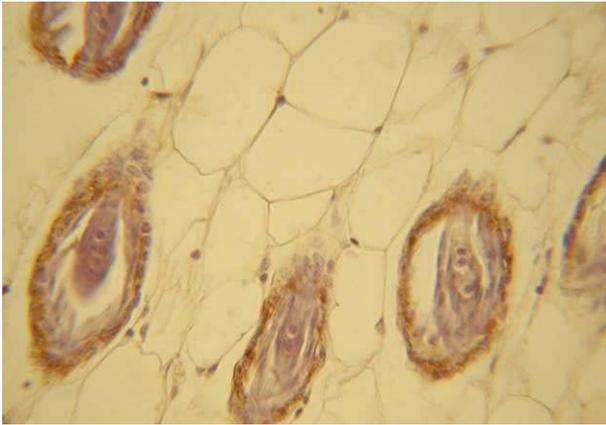


Figura 17.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

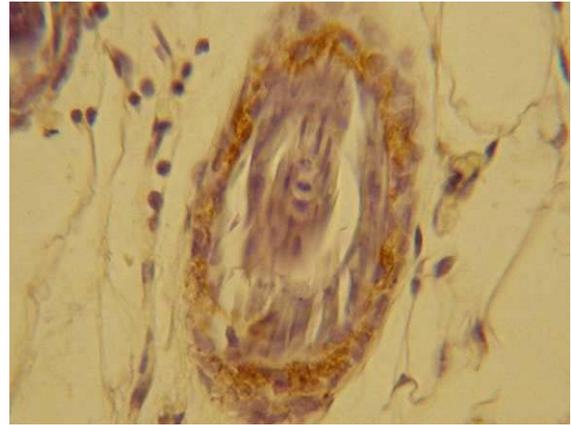


Figura 18.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

En las muestras obtenidas tras las 24 horas de inoculación con Apexit, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de IL-6 a nivel del músculo y del folículo piloso (figura 19).

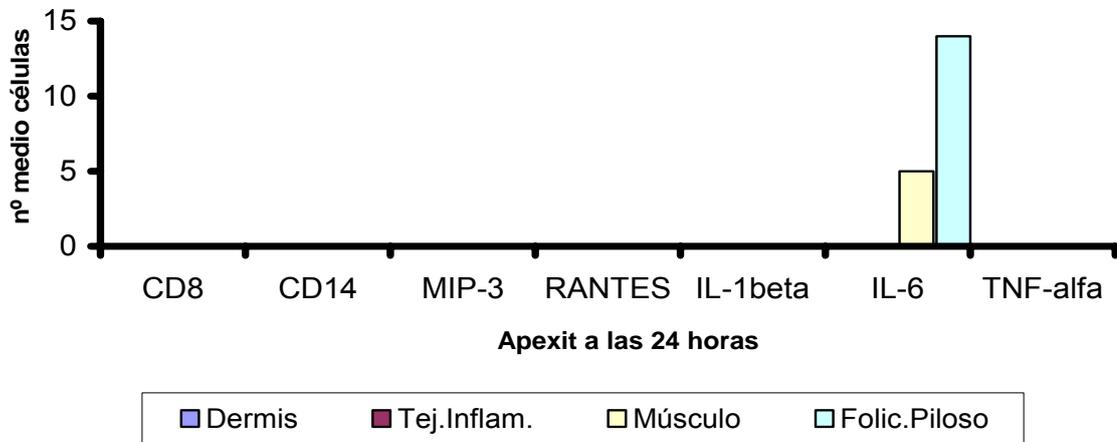


Figura 19.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Apexit a las 24 horas. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Folículo piloso.

APEXIT A LOS 7 DÍAS

Al igual de lo que ocurre a las 24 horas, a los 7 días de inoculación del cemento Apexit, únicamente hubo expresión de IL-6 con los siguientes valores medios: $14 \pm 1,73$ células a nivel

de la dermis; $12,33 \pm 2,51$ a nivel del tejido inflamatorio y $13,3 \pm 4,72$ células a nivel del músculo (figuras 20 y 21).

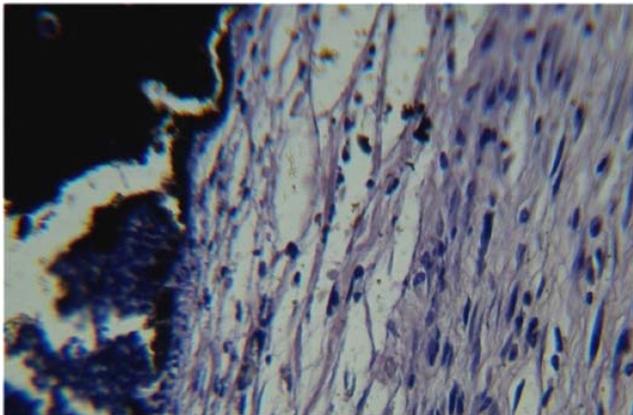


Figura 20.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

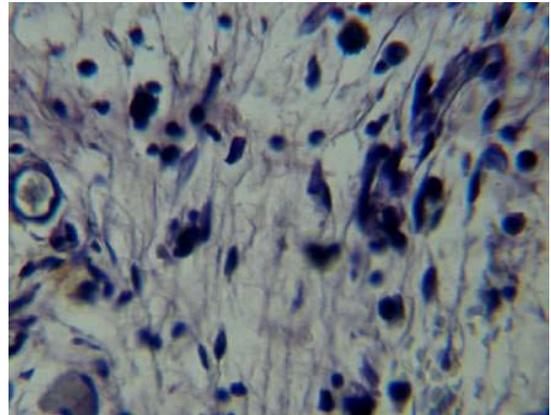


Figura 21.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

A los 7 días de la inoculación, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de IL-6 a nivel de la dermis, el tejido inflamatorio y el músculo (figura 22).

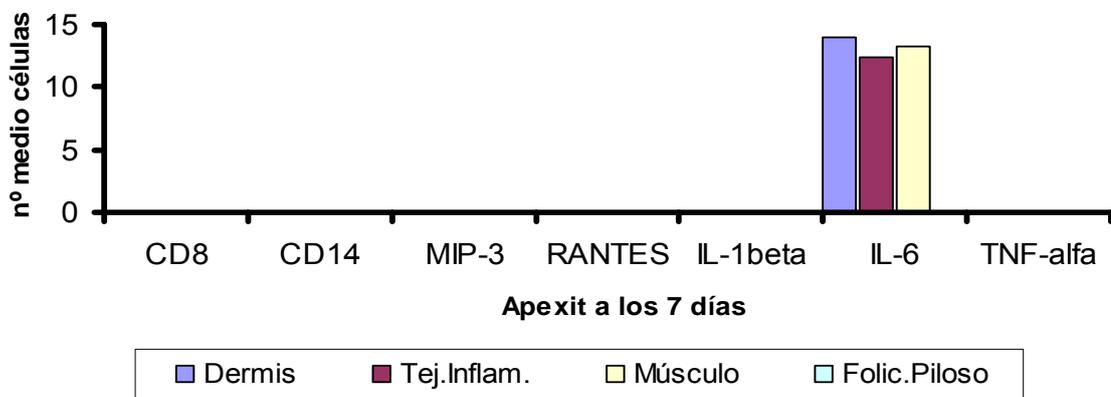


Figura 22.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Apexit a los 7 días. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Foliculo piloso.

2. CEMENTO MTA

MTA A LAS 12 HORAS

Al analizar la expresión de los distintos marcadores inflamatorios en diferentes regiones por parte de las células inmunoreactivas a las 12 horas de la inoculación del cemento MTA se

hallaron los siguiente resultados: En la expresión de MIP-3, el número medio de células fue de 18 ± 0 a nivel del músculo y de $19,5 \pm 0,70$ células a nivel del folículo piloso. En la expresión de IL-6 se encontraron 8.6 ± 1.52 células en la dermis; 8.3 ± 0.57 a nivel del tejido inflamatorio; 14.3 ± 4.04 células a nivel del músculo y 12 ± 8.88 a nivel del folículo piloso. De forma análoga al cemento Apexit, no se observó expresión de CD8, CD14, Rantes, IL-1beta o de TNF-alfa. (figuras 23-26)

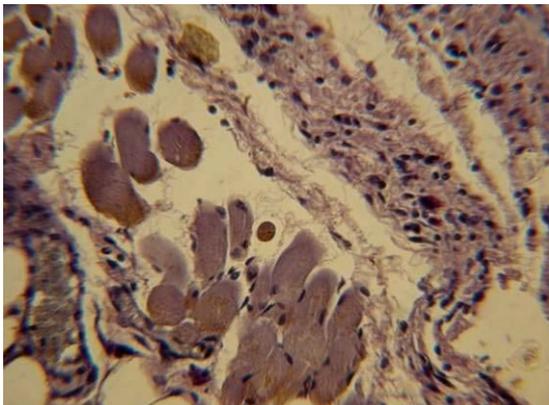


Figura 23.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP-3

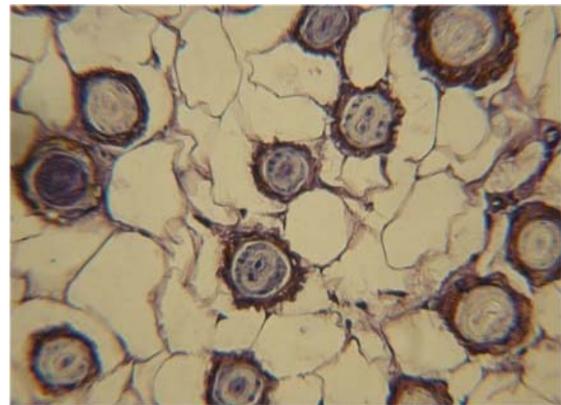


Figura 24.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

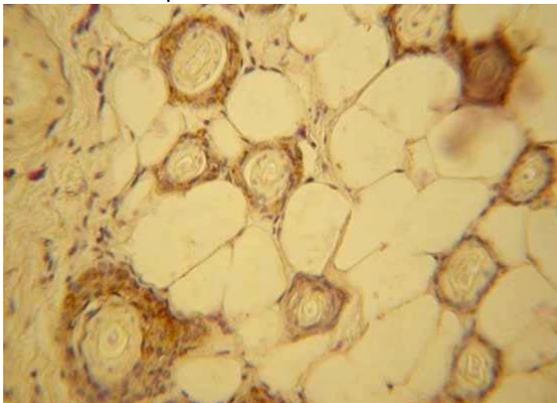


Figura 25.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

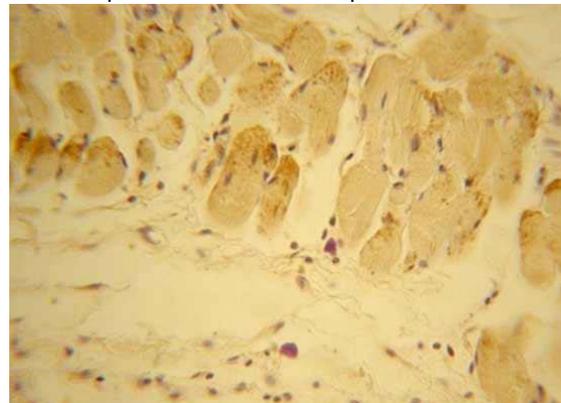


Figura 26.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

Para cada tiempo de inoculación (12 horas, 24 horas y 7 días) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los marcadores expresados por región estudiada (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). Para las muestras obtenidas tras las 12 horas de inoculación con MTA, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

entre la expresión tanto de MIP-3 como de IL-6 a nivel del folículo piloso y el músculo (figura 27).

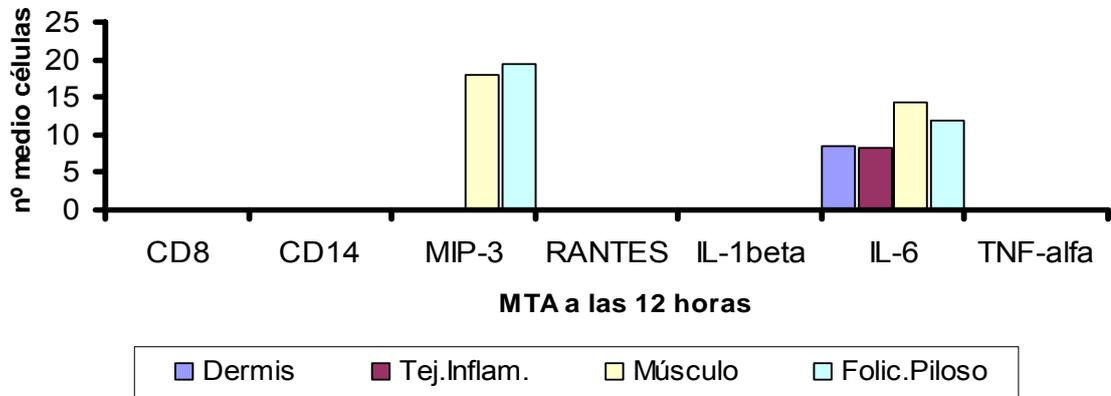


Figura 27.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento MTA a las 12 horas. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Folículo piloso.

MTA A LAS 24 HORAS

En el caso de la expresión de los distintos marcadores a las 24 horas de la inoculación del cemento MTA, hubo expresión de macrófagos (CD14) con los siguientes recuentos medios de células inmunoreactivas en las diferentes localizaciones: $1 \pm 1,73$ a nivel de la dermis; $2,33 \pm 4,04$ células a nivel del tejido inflamatorio y $1,66 \pm 2,88$ a nivel del músculo. También apareció expresión de MIP-3 con un número medio de $10,66 \pm 4,04$ células a nivel de la dermis; $13,33 \pm 5,68$ a nivel del tejido inflamatorio y $15,33 \pm 0,57$ células a nivel del músculo. Finalmente también hubo expresión de IL-6 con las siguientes cifras medias: $14 \pm 15,66$ células a nivel de la dermis; $14,66 \pm 0,57$ a nivel del tejido inflamatorio y $15,66 \pm 1,15$ células a nivel del músculo (figuras 28-32).

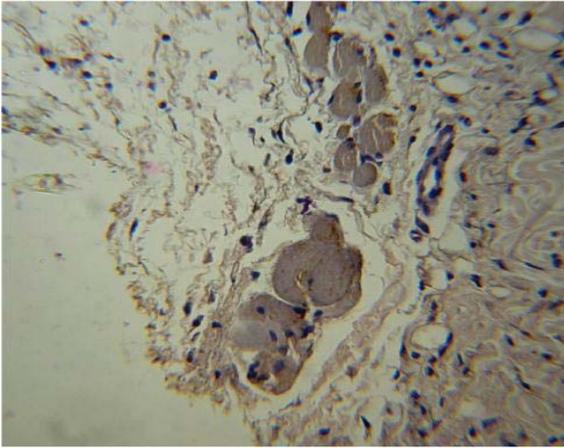


Figura 28.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

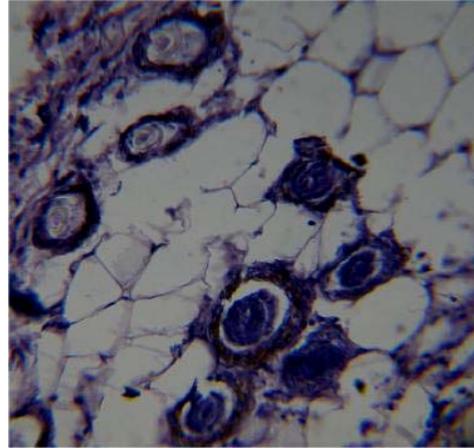


Figura 29.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

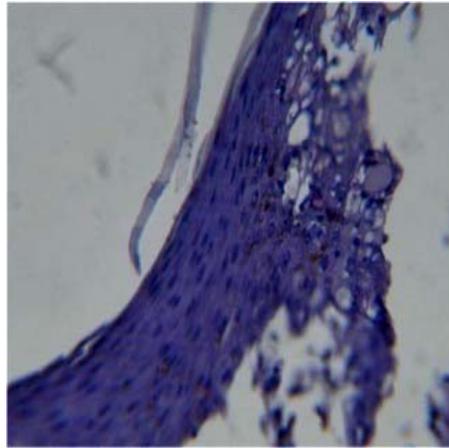


Figura 30.- Células dendríticas inmunoreactivas en la epidermis de la piel con el anticuerpo anti IL-6.

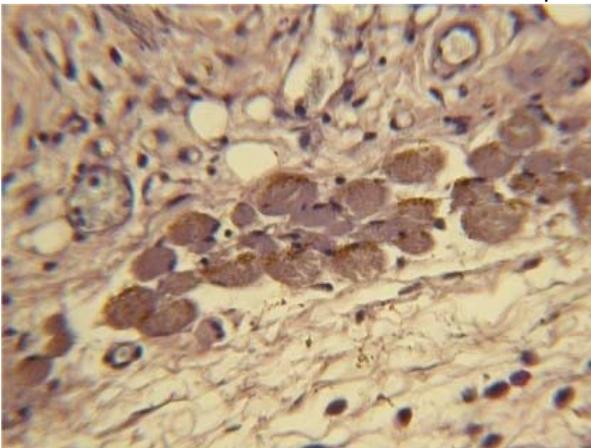


Figura 31.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP-3.

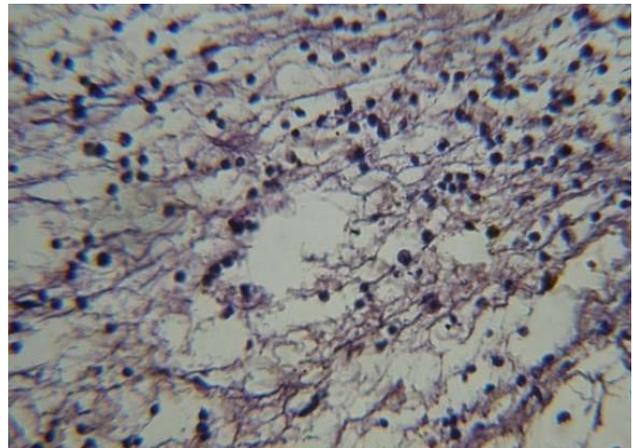


Figura 32.- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio con el anticuerpo anti MIP-3.

En las muestras obtenidas tras las 24 horas de inoculación con MTA, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de MIP-3, de IL-6 y también de macrófagos (CD14) a nivel de la dermis, el tejido inflamatorio y el músculo (figura 33).

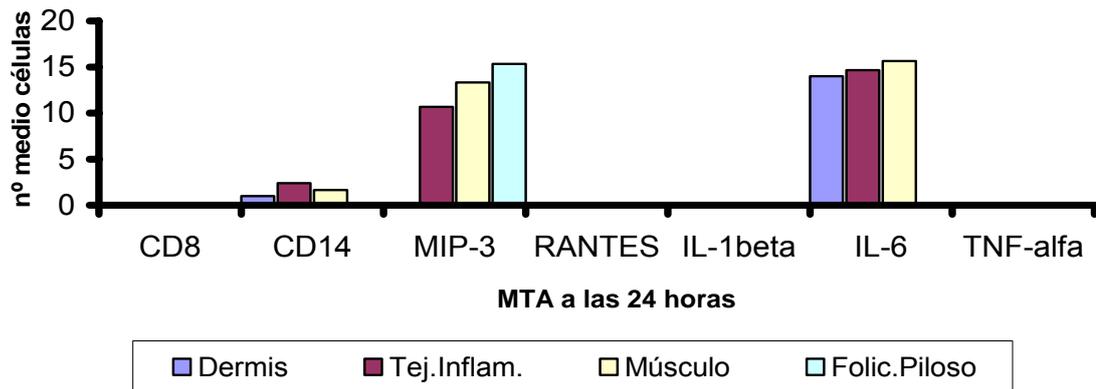


Figura 33.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento MTA a las 24 horas. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Foliculo piloso.

MTA A LOS 7 DÍAS

La expresión de los distintos marcadores inflamatorios en diferentes regiones a los 7 días de la inoculación del cemento MTA arrojó estos resultados: En la expresión de MIP-3, el número medio de células fue de $10,33 \pm 2,88$ a nivel de la dermis; $9,66 \pm 4,04$ a nivel del tejido inflamatorio; $11,33 \pm 1,15$ células a nivel del músculo y $8,33 \pm 7,63$ a nivel del folículo piloso. En la expresión de IL-6 se encontraron cifras medias de $6 \pm 1,41$ células tanto en la dermis como en el tejido inflamatorio; $9,5 \pm 0,70$ células a nivel del músculo y $13,5 \pm 2,12$ a nivel del folículo piloso. Como en casos anteriores, no se observó expresión de CD8, CD14, Rantes, IL-1beta o de TNF-alfa (figuras 34-37).

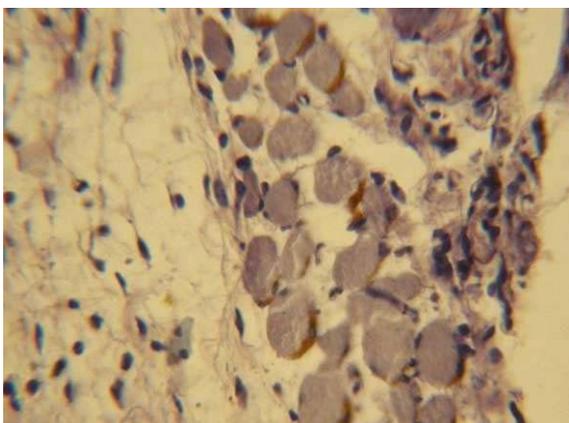


Figura 34.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

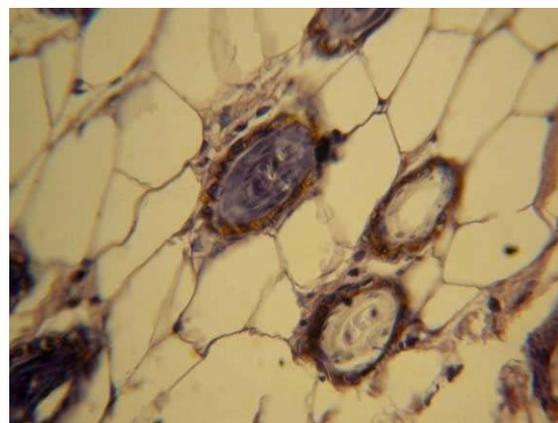


Figura 35.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

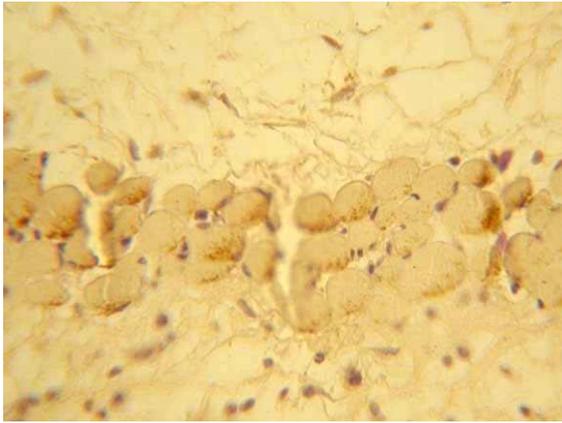


Figura 36.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP-3.

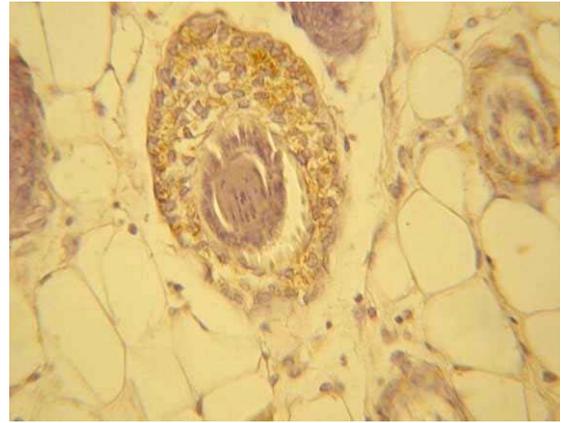


Figura 37.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

A los 7 días de la inoculación, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión tanto de MIP-3 como de IL-6 a nivel de la dermis, el tejido inflamatorio, el músculo y el folículo piloso (figura 38).

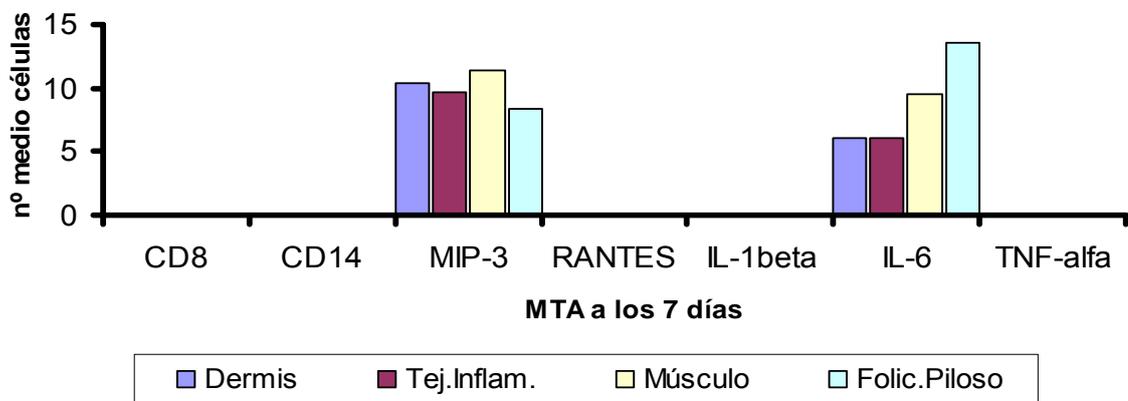


Figura 38.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento MTA a los 7 días. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Folículo piloso.

3. CEMENTO PORTLAND

PORTLAND A LAS 12 HORAS

Quando se revisó la expresión de los distintos marcadores inflamatorios en diferentes regiones por parte de las células inmunoreactivas a las 12 horas de la inoculación del

cemento Portland, se observaron recuentos medios de $8,5 \pm 2,12$ células que expresaron MIP-3 a nivel del tejido inflamatorio y un número medio de $17,33 \pm 2,08$ células que expresaron IL-6 a nivel del músculo. El resto de marcadores no se expresaron en este intervalo de tiempo (figuras 39-41).

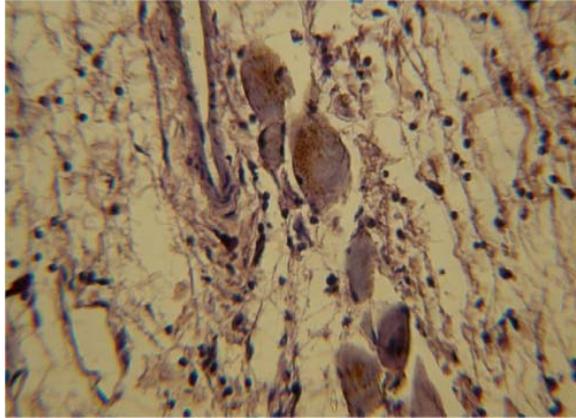


Figura 39.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6

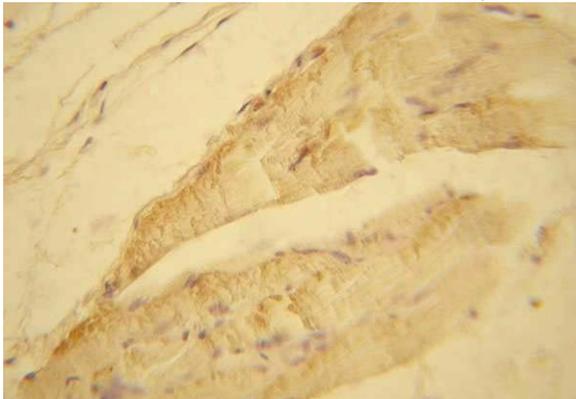


Figura 40.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP-3.

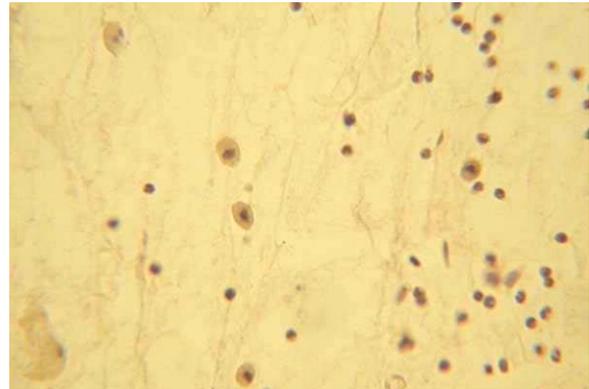


Figura 41.- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio de la piel con el anticuerpo anti MIP-3.

Para cada tiempo de inoculación (12 horas, 24 horas y 7días) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los marcadores expresados por región estudiada (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). A las 12 horas de inoculación del cemento Pórtland no se observó ninguna relación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los distintos marcadores expresados (figura 42).

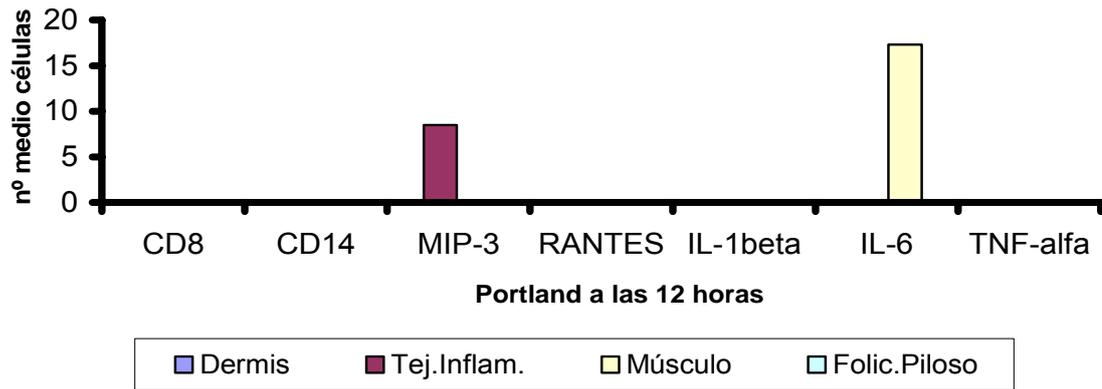


Figura 42.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Portland a las 12 horas. **Tej. Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic. Piloso:** Folículo piloso.

PORTLAND A LAS 24 HORAS

En el caso de la expresión de los distintos marcadores a las 24 horas de la inoculación del cemento Portland, hubo expresión de MIP-3 con los siguientes recuentos medios de células inmunoreactivas en las diferentes localizaciones: $4 \pm 1,73$ células tanto a nivel de la dermis como a nivel del tejido inflamatorio; 10 ± 2 a nivel del músculo y $12,66 \pm 2,51$ células a nivel del folículo piloso. También apareció expresión de IL-6 con un número medio de $10 \pm 7,07$ células a nivel del músculo y $12,50 \pm 3,53$ células a nivel del folículo piloso (figuras 43-46).

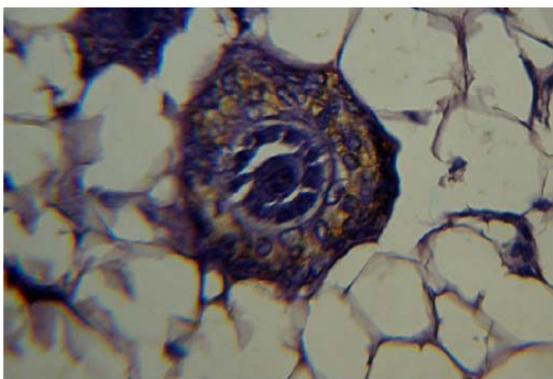


Figura 43.- Células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

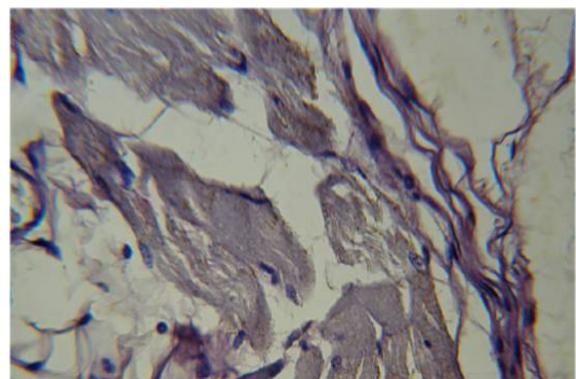


Figura 44.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP-3.

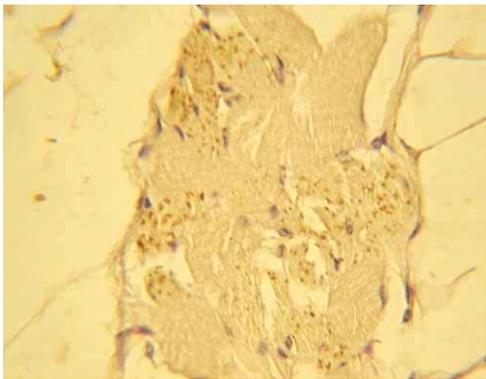


Figura 45.- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6

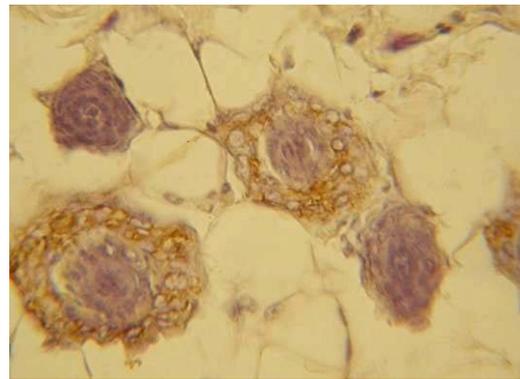


Figura 46.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

Para las muestras obtenidas tras las 24 horas de inoculación con Portland, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión tanto de MIP-3 como de IL-6 a nivel del músculo y del folículo piloso (figura 47).

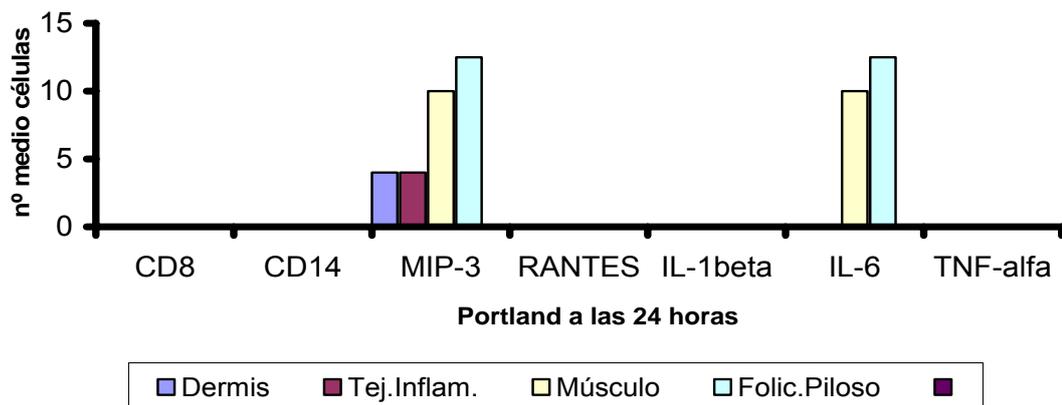


Figura 47.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Portland a las 24 horas. **Tej. Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic. Piloso:** Folículo piloso.

PORTLAND A LOS 7 DÍAS

Al igual de lo que ocurre a las 12 horas, cuando se revisó la expresión de los distintos marcadores inflamatorios a los 7 días de la inoculación del cemento Portland, se observaron recuentos medios de $9,33 \pm 1,15$ células que expresaron MIP-3 a nivel del folículo piloso y un número medio de 7 ± 2 células que expresaron IL-6 a nivel del músculo y de $15,66 \pm 2,08$ que

expresaron IL-6 a nivel del folículo piloso. El resto de marcadores no se expresaron en este intervalo de tiempo (figuras 48-51).

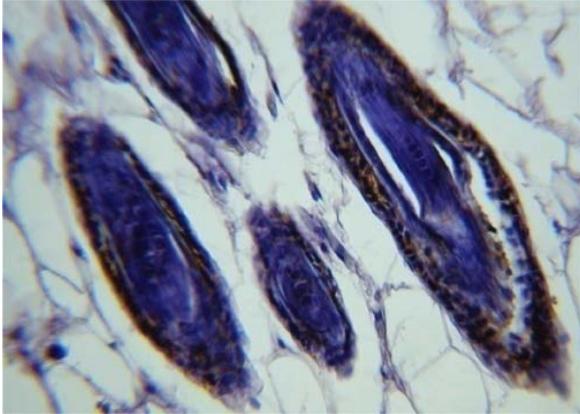


Figura 48.- Células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

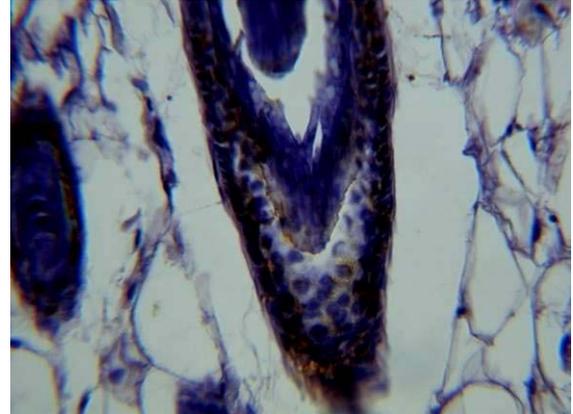


Figura 49.- Células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

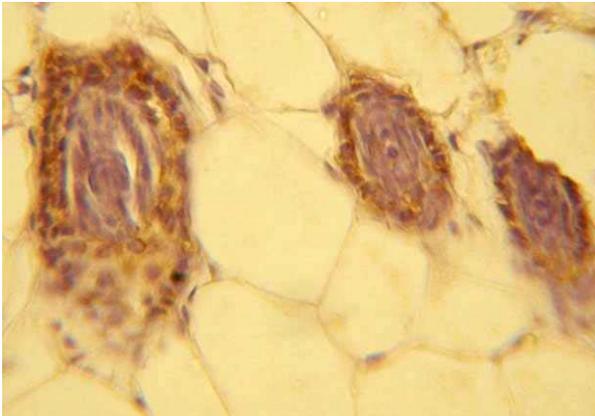


Figura 50.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

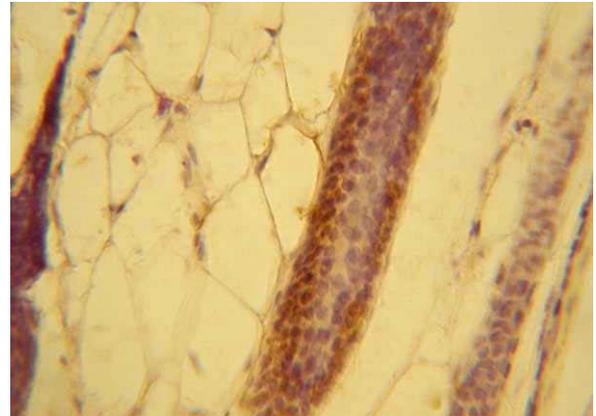


Figura 51.- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP-3.

A los 7 días de la inoculación, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de IL-6 a nivel del músculo y del folículo piloso (figura 52).

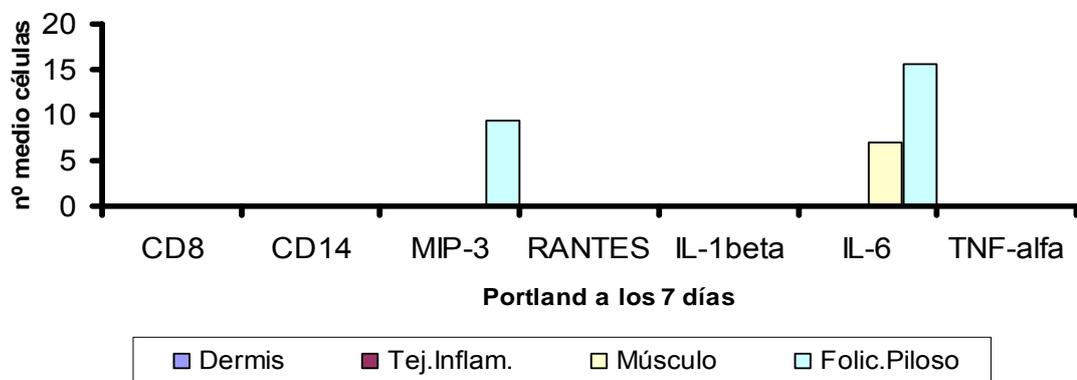


Figura 52.- Expresión de citocinas, quimiocinas y células del sistema inmune en respuesta al cemento Portland a los 7 días. **Tej.Inflam.:** Tejido inflamatorio; **Folic.Piloso:** Folículo piloso.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad de tres materiales empleados actualmente como selladores en la terapia endodóntica. Fueron inoculados en el tejido subcutáneo de ratones y se observaron preparaciones con muestras de tejidos obtenidos del área donde se había inoculado la muestra.

El estudio histopatológico mostró una respuesta inflamatoria leve alrededor del área donde se habían inoculado los tres cementos, encontrándose, en general, una buena biocompatibilidad. No obstante, el análisis inmunocitoquímico evidenció mayor biocompatibilidad del cemento Apexit, seguido del cemento Portland y, finalmente del cemento MTA.

Actualmente se utilizan una gran variedad de pruebas para determinar la biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico. Las pruebas de citotoxicidad "in vitro" permiten evaluar la acción de los materiales de estudio sobre diferentes células, aunque presentan algunas limitaciones. Sin duda, las pruebas "in vivo", facilitan una mejor comprensión de la respuesta general del huésped u hospedador frente a estos materiales. Por esto, hasta que previamente hayan sido testados estos materiales en animales de experimentación, no deben realizarse estas pruebas sobre dientes humanos, ya que la colocación directa sobre los tejidos duros y blandos orales de los cementos selladores puede producir efectos locales y sistémicos nocivos (5).

Es importante señalar que las diferentes pruebas de citotoxicidad pueden presentar discrepancias; esto depende del material utilizado y del cultivo celular que se emplee. Asimismo, algunos resultados de otras investigaciones mostraron que los selladores endodónticos son solubles al ser expuestos durante un tiempo prolongado a un ambiente acuoso, causando posibles reacciones de citotoxicidad variando de moderada a severa (85).

Por otro lado, la inoculación tisular de estos materiales de obturación causan inicialmente inflamación y se vuelven más biocompatibles conforme pasa el tiempo. La inflamación antes mencionada es resultado del trauma y la liberación de sustancias nocivas de estos materiales durante el proceso de endurecimiento (86).

Desde hace tiempo los materiales analizados en este estudio son materiales biocompatibles habitualmente empleados en la terapia endodóntica. Desde el punto de vista histopatológico e inmunológico, los tres cementos (Apexit, MTA y Portland) presentaron una adecuada biocompatibilidad, ya que la cantidad de células inmunoreactivas a los tres elementos fue baja.

Todos los cementos selladores indujeron a las pocas horas de su colocación una respuesta inflamatoria que fue decreciendo en el transcurso del periodo de valoración establecido en el este estudio (12 horas, 24 horas y 7 días). Se han realizado trabajos de investigación similares al presente en tejido conectivo de ratas utilizando otros selladores EndoRez, AH Plus y Epiphany (87). Algunos cementos inducen una respuesta inflamatoria posiblemente ocasionada por el formaldehído liberado durante el fraguado (5).

El MTA está indicado básicamente para el tratamiento de perforaciones radiculares y lesiones de furca, reabsorciones internas, cirugía endodóntica, obturaciones retrógradas, protección pulpar, pulpotomía, apicogénesis y apexificación (7, 8, 11). En el presente trabajo, este material, al igual que el Apexit y el Portland, mostró una baja respuesta inflamatoria, lo que concuerda con otros estudios en los que se pone de manifiesto la baja citotoxicidad y adecuada biocompatibilidad de este material (22).

En un estudio donde se evaluó la biocompatibilidad de diferentes materiales: amalgama, IRM, MTA y una mezcla de MTA con clorhexidina (CHX), todos ellos inoculados en tejido subcutáneo de ratas, evidenciaron una respuesta inflamatoria leve. En el análisis histológico se observó que todos los materiales utilizados fueron rodeados por una cápsula de tejido conectivo, la cual indica que fueron bien tolerados por los tejidos adyacentes (27).

Un estudio señala que ni el MTA regular (gris) ni el MTA blanco son genotóxicos y en ningún caso inducen muerte celular (31). Otro trabajo realizado en cultivos de células MG63 de osteosarcoma humano en presencia del MTA, al cuantificar el crecimiento celular en ensayos de ELISA para determinar la expresión de IL-1 alfa, IL-6, IL-8, IL-11 y M-CSF, demostraron que el MTA es biocompatible y apto para su uso clínico (33).

La respuesta biológica de diferentes cementos incluyendo el MTA a los 7, 15, 30 y 60 días fue estudiada en tejido periodontal de ratas. La mayor proporción de células inflamatorias y osteoclastos se observó a los 7 días de la inoculación. En cambio, a los 60 días, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos manifestando la biocompatibilidad de los diferentes materiales testados (88)

McNamara y cols. evaluaron la biocompatibilidad del MTA examinando la respuesta inflamatoria en ratas a las 2 y 8 semanas de la inoculación tisular del mismo. Se establecieron varios grupos: experimentales, compuestos por ratas en las que se inoculó MTA mezclado con diferentes acelerantes y un grupo control compuesto por ratas en las que se inoculó MTA mezclado con agua esterilizada. A las dos semanas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre las respuestas inflamatorias observadas en los distintos grupos. Sin embargo, a las 8 semanas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.03$) entre la reacción inflamatoria observada en el grupo

de MTA con fluoruro cálcico con respecto al grupo control. El resto de acelerantes no mostró diferencias significativas. Estos hallazgos permiten afirmar que el MTA mezclado con diferentes acelerantes puede constituir una alternativa biocompatible en el tratamiento de conductos. (89)

En este estudio, el cemento Apexit, a base de hidróxido de calcio, fue el material que mostró mayor biocompatibilidad. Otros trabajos realizados con cementos selladores con hidróxido de calcio, como es el caso del sellador endodóntico Sealer 26 (90), mostró una excelente biocompatibilidad, causando una respuesta aguda al inicio que fue disminuyendo a las 24 horas. Esta respuesta inicial puede deberse al alto pH que exhiben las pastas de hidróxido de calcio en un tiempo de 120 horas. Este pH causará una acción cáustica cuando se solubiliza, además de inducir una necrosis superficial controlada. Otro estudio (91) realizado con células L929 de ratón y fibroblastos de ligamento periodontal para evaluar citotoxicidad de cuatro selladores endodónticos, puso de manifiesto que el menos tóxico fue Sealer 26. El cemento "Fill Canal" mostró citotoxicidad en estado fresco y durante el tiempo de endurecimiento. Por otra parte, los materiales N-Rickert y FS fueron los más citotóxicos.

Un reciente estudio realizado con osteoblastos y fibroblastos murinos con el fin de evaluar la adhesión celular al cemento endodóntico MTA mezclado con varios aditivos o con agua puso de manifiesto que la biocompatibilidad de este material observándose una amplia e importante adhesión de osteoblastos y fibroblastos. (92)

Un estudio realizado en 33 ratas sobre las que se inoculó MTA en el tejido conectivo dorsal analizó la respuesta inflamatoria a los 15, 30 y 60 días. A los 15 días, la reacción inflamatoria crónica fue moderada. (93)

Al igual que el presente trabajo, Martínez Lalis y cols. (94) realizaron un estudio comparativo de la biocompatibilidad del cemento Portland y el MTA en tejido subcutáneo de ratas. El infiltrado inflamatorio fue evaluado a los 7, 14 y 30 días tras la inoculación de los cementos. A los 7 días, el grupo del cemento Portland presentaba un infiltrado inflamatorio con varios eosinófilos y tejido conectivo inmaduro; el grupo del cemento MTA presentaba un infiltrado inflamatorio similar sin eosinófilos y con la presencia de tejido necrótico abundante y numerosas células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño. A los 14 días, en el grupo del Portland, el infiltrado crónico con eosinófilos persistía; en el grupo del MTA, todavía podían verse áreas de necrosis y células gigantes. A los 30 días, en ambos grupos se observaba un tejido colagenoso fibroso maduro. Aunque ambos cementos (Portland y MTA) inducen infiltrados inflamatorios crónicos, las áreas de necrosis y las células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño predominan en las muestras de tejido inoculadas con MTA; mientras que la presencia de numerosos eosinófilos es apreciada en las muestras de tejido inoculadas con cemento Portland .

Se ha encontrado citotoxicidad in vitro en células humanas de ligamento periodontal (PDL) y células de hámster (V79) producida por cementos a base de óxido de zinc y eugenol, resina y el de hidróxido de calcio, siendo este último el menos citotóxico en ambos cultivos celulares. Estos investigadores proponen el uso de selladores que contengan como base hidróxido de calcio, puesto que inicialmente favorecen una buena respuesta biológica de los tejidos perirradiculares (95).

La biocompatibilidad de los cementos a base a hidróxido de calcio también ha sido estudiada in vivo usando tres selladores basados en óxido de zinc y eugenol y uno a base de hidróxido de calcio. En todos los casos, los cementos causaban alguna inflamación que decrecía con el

tiempo. No obstante, el cemento de hidróxido de calcio mostró menor reacción inflamatoria comparada con los otros cementos selladores testados. A los tres meses, no se observó reacción inflamatoria con ninguno de los cementos selladores (96).

Kaplan y cols. (97) hicieron un estudio con ratas Wistar para determinar las reacciones tisulares de cinco selladores endodónticos: Procosol y Endomethasone (que contienen OZE), Endion (a base de ionómero de vidrio), AH26 con base de resina epoxi, y el Sealapex con base de CaOH, concluyendo que los cementos menos reactivos fueron Sealapex y AH26.

De igual forma, Molloy y cols. (98), demostraron esta biocompatibilidad al realizar la evaluación microscópica en el tejido conectivo de ratas Sprague-Dawley. Diversos cementos: Sealapex a base de CaOH, Kerr's Sealer y Roth Sealer (OZE) y el cemento AH26 fueron bien tolerados y biocompatibles, además de no existir prácticamente diferencia en la reacción causada por ellos.

De igual manera se ha comparado los niveles de secreción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales de ratones en presencia de un sellador a base de hidróxido de calcio (Sealapex) y otro en base de óxido de zinc y eugenol (Endomethasone), observándose que el sellador a base a hidróxido de calcio indujo una menor cantidad de secreción de TNF-alfa en comparación con el de óxido de zinc y eugenol (13).

La IL-6 es una citocina multifuncional con un importante papel tanto en la inflamación aguda como en la inflamación crónica (65). Desarrolla efectos variados sobre múltiples células, incluyendo la promoción y desarrollo de células del sistema inmune. En este trabajo fue la citocina predominante en todos los intervalos de estudio y para todos los cementos testados.

MIP-3 es una quimiocina proinflamatoria que se libera en las primeras horas de la reacción inflamatorias y sirve para estimular las defensas del huésped. Puede ser secretada a través

de las células T activadas, células dendríticas inmaduras y otros tipos celulares mononucleares (74). Esta quimiocina se encontró con los tres materiales evaluados. Sin embargo, tuvo una expresión variable, quizá debida a reacciones de cuerpo extraño frente al material.

Los trabajos encontrados son estudios donde se evaluó la histopatología o la citotoxicidad in vitro y explican la presencia de células de defensa del hospedador frente al material. La importancia de este trabajo radica en que demuestra la capacidad de los tres materiales analizados para inducir la expresión de estos marcadores, indicando su presencia un posible papel como factores desencadenantes de la reacción inflamatoria del tejido conectivo.

Para finalizar, los tres materiales inoculados presentan en general buena biocompatibilidad, con diferencias mínimas en la estimulación del sistema inmune. El cemento Apexit fue el más biocompatible seguidos del cemento Portland y en el último lugar, el cemento MTA.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. Con el cemento Apexit se encontró expresión de IL-6 en todos los intervalos de tiempo estudiados (12 horas, 24 horas y 7 días), mientras que sólo hubo expresión de MIP-3 a las 12 horas.
2. En el caso del cemento MTA, se observó expresión de MIP-3 e IL-6 en los tres tiempos evaluados. A las 24 horas, hubo expresión de CD14.
3. Respecto al cemento Portland, apareció expresión de MIP-3 e IL-6 a las 12 horas, a las 24 horas y a los 7 días.
4. Considerando la expresión de los diferentes marcadores, el cemento Apexit fue el más biocompatible seguidos de los cementos Portland y MTA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lucena-Martin C, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Robles-Gijón V, Navajas-Rodríguez de Mondelo JM. A comparative study of apical leakage of endomethasone, Top Seal and Roeko Seal sealer cements. *J Endod.* 2002;28:423-26.
2. Johnson WT, Gutmann JL. Obturación del sistema de conductos radiculares una vez limpios y remodelados. En: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Vías de la pulpa*. 9ª ed. Madrid: Elsevier; 2007. p. 365-406.
3. Figueiredo JAP de, Estrela C. Obturação do canal radicular. In: Estrela C, Figueiredo JAP de, eds. *Endodontia: princípios biológicos e mecânicos*. Sao Paulo: Artes Medicas; 1999. p. 656-690.
4. Lee CQ, Chang Y, Cobb CM, Robinson S, Hellmuth EM. Dimensional stability of thermosensitive gutta-percha. *J Endod.* 1997;23:579-82.
5. Weine FS. *Terapéutica en endodoncia*. 2 ed. Barcelona: Salvat; 1991. p. 387-434.
6. Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J Endod.* 1976;2:166-175.
7. Ingle JI, West JD. Obturación del espacio radicular. En: Ingle JI, Bakland LK, editors. *Endodoncia*. 4ªed. México: MacGraw-Hill Interamericana; 1996. p. 244.
8. Canalda Salhi C, Brau Agudé E. *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. Barcelona: Masson; 2001. p. 194-215
9. Brekalo I, Pezelj-Ribaric S, Abram MS, Ferreri S And Glazar I. Cytotoxicity of Three Root Canal Sealers. Disponible en: URL:
http://iadr.confex.com/iadr/2003Goteborg/techprogram/abstract_33960.htm
- 10.- Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002;28:784-6.

- 11.- Beltes P, Koulaouzidou E, Kotoula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11:245-9.
- 12.- Silva LA, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod.* 1997;23:86-90.
- 13.- Perassi FT, Filho IB, Berbert FL, Carlos IZ, de Toledo Leonardo R. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *J Endod.* 2004;30:534-7.
- 14.- Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205
- 15.- Steffen R, Van Waes, H. Understanding mineral trioxide aggregate/Portland-cement: a review of literature and background factors. *Eur Arch Paediatr Dent J.* 2009;10:93-7.
- 16.- Casella G, Ferlito S. The use of mineral trioxide aggregate in endodontics. *Minerva Stomatol.* 2006;55:123-43.
- 17.- Ensaldo Fuentes E., et al. Mineral trióxido agregado. *Episteme.* 2005 .Disponible en: URL: <http://www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero2-05/>
- 18.- Srinivasan V, Waterhouse P, Whitworth J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19:34-47
- 19.- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater.* 2008;24:149-64.
- 20.- Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82:84-8.

- 21.- Unal GC, Maden M, Isidan T. Repair of Furcal Iatrogenic Perforation with Mineral Trioxide Aggregate: Two Years Follow-up of Two Cases. *Eur J Dent.* 2010;4:475-81.
- 22.- Göhring KS, Lehnert B, Zehnder M. Indications for use of MTA, a review. Part 1: Chemical, physical and biological properties of MTA. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2004;114:143-53.
- 23.- Colán-Mora PM, García-Rupaya CR. Microfiltración apical in vitro de tres cementos utilizados en la obturación de conductos radiculares. *Rev. Estomatol. Herediana* 2008;18:9-15.
- 24.- Pace R, Giuliani V, Pagavino G. Mineral trioxide aggregate as repair material for furcal perforation: case series. *J Endod.* 2008;34:1130-3.
- 25.- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate for Repair of Lateral Root Perforations. *J. Endod.* 1993; 19:541-4.
- 26.- Fernández-Yáñez Sánchez A, Leco-Berrocal MI, Martínez-González JM. Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:180-5.
- 27.- Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod.* 2006;32:1094-6.
- 28.- Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod.* 2004;30:95-9.
- 29.- Xia L, Jiang L, Zhu YQ. Cytotoxicity of MTA, Dycal and GIC on human periodontal ligament cells in vitro. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2007;16:647-51

- 30.- Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod.* 2005;31:605
- 31.- Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on chinese hamster ovary CHO.- cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:258-61.
- 32.- Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:432-9.
- 33.- Economides N., Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate MTA.- as root-end filling material. *Int Endod J.* 2003;36:44-8.
- 34.- Perinpanayagam H. Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J Can Dent Assoc.* 2009;5:369-72
- 35.- Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;73:123-8.
- 36.- Rezende TM, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, de Oliveira Mendes ST, Jorge ML, Ribeiro Sobrinho AP. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J.* 2007;40:603-11.
- 37.- Fastlicht S. Dental inlays and fillings among the ancient mayas. *J History Med.Allied Sci.* 1962;18:392-401

- 38.- Komabayashi T, Spångberg LS. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod.* 2008;34:94-8.
- 39.- Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, Son HH, Oh WM. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:96-102.
- 40.- Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:809-15.
- 41.- Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:54-7.
- 42.- Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2007;33:1235-8.
- 43.- Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H, Bidad S. Comparative SEM study of the marginal adaptation of white and grey MTA and Portland cement. *Aust Endod J.* 2007;33:2-6.
- 44.- De-Deus G, Coutinho-Filho T. The use of white Portland cement as an apical plug in a tooth with a necrotic pulp and wide-open apex: a case report. *Int Endod J.* 2007;40:653-60.
- 45.- Gallego D, López L, Hansford D, Klemas J. El cemento Portland y su potencial uso en ingeniería de tejido óseo. Fase I: Estudios de biocompatibilidad-efectos del hidróxido de calico. *Rev Fac Ing Antioq* 2006;37:21-30.

- 46.- Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *J Endod.* 2007;33:163-6.
- 47.- De-Deus G, Reis C, Brandão C, Fidel S, Fidel RA. The ability of Portland cement, MTA, and MTA Bio to prevent through-and-through fluid movement in repaired furcal perforations. *J Endod.* 2007;33:1374-7.
- 48.- Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007;49:41-5
- 49.- Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res.* 2006;20:303-6.
- 50.- Fischer E, Arens D, et al Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with Zinc-free amalgam, intermediate restorative material and super EBA as a root-end filling material. *J. Endod.* 1998;24:176-9.
- 51.- Camilleri J, Montesin FE, Juszczuk AS, Papaioannou S, Curtis RV, Donald FM, Ford TR. The constitution, physical properties and biocompatibility of modified accelerated cement. *Dent Mater.* 2008; 24;3:341-350
- 52.- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the aquired immune response. *Science.* 1996; 272:50-3
- 53.- Baggiolini M. Chemokynes and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392: 565-568
- 54.- Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989; 320:365-76

- 55.- DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ, On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol.* 1999; 11: 95-104.
- 56.- Snyderman R, Goetzl EJ, Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science.* 1981;213: 830-837.
- 57.- Banchereau J, Steinman RM, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-52.
- 58.- Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P., and Palmberg, G. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells *Inflammation.* 1999; 23:217-230.
- 59.- Ozato, K., Tsujimura, H. and Tamura, T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques.* 2002, Suppl:66-69, 70-72
- 60.- Svanborg, C., Godaly, G., and Hedlund, M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999;2:99-105.
- 61.- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 2000; 273:221-227.
- 62.- Lamkanfi M, Dixit VM. The inflammasomes. *PLoS Pathog.* 2009;5:100-5.
- 63.- Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. Structure-function relationship in the IL-1 family. *Front Biosci.* 1996;1:270-308.
- 64.- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 2006;176:3877-83.

- 65.- Ogura N, Shibata Y, Kamino Y, Matsuda U, Hayakawa M, Oikawa T, Takiguchi H, Izumi H, Abiko Y. Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. *Biochem Med Metab Biol.* 1994;53:130-6.
- 66.- Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92:83-8.
- 67.- Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod.* 2005;31:679-83.
- 68.- Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene.* 2005;350:1-13.
- 69.- Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:185-91.
- 70.- Lata S, Raghava GP. Prediction and classification of chemokines and their receptors. *Protein Eng Des Sel.* 2009;22:441-4.
- 71.- Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev.* 2007;28:492-520.
- 72.- DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin DJ. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *J Immunol.* 2006;176:401-15.
- 73.- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998;392:565-8.

- 74.- Luster AD, Cardiff RD, MacLean JA, Crowe K, Granstein RD. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998;110:183-96.
- 75.- Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, and Koch AE, Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci* 2010;2:153–167.
- 76.- Jay A, Levy J. The Unexpected Pleiotropic Activities of RANTES. *Immunology* 2009;182;3945-3946
- 77.- Harant H, Eldershaw SA, Lindley IJ. Human macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20/LARC/Exodus/SCYA20 is transcriptionally upregulated by tumor necrosis factor-alpha via a non-standard NF-kappaB site. *FEBS Lett*. 2001;509:439-45.
- 78.- Ragueiro González JR, López Larrea S, González Rodríguez E, Martínez Naves E. *Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune*. México: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- 79.- Kenneth M, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. 7a ed . México: Mc Graw Hill; 2009.
- 80.- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited . *J Leukocyte Biol*. 1993;53: 602-618.
- 81.- Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullman G, Pulmonary macrophages. *Fr Eur Respir J*. 1994;7:1678–89.
- 82.- Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 2009;6:15-25.

- 83.- Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. A Pivotal Role for Interleukin-27 in CD8+ T Cell Functions and Generation of Cytotoxic T Lymphocytes. *J Biomed Biotechnol.* 2010;23:35-42.
- 84.- Whishaw IQ, Metz GA, Kolb B, Pellis SM. Accelerated nervous system development contributes to behavioral efficiency in the laboratory mouse: a behavioral review and theoretical proposal. *Dev Psychobiol.* 2001;39:151-70.
- 85.- Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod.* 1995;21:622-4.
- 86.- Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 2004;30:348-51.
- 87.- Bernáth M, Szabó J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endod J.* 2003;36:256-61.
- 88.- da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J.* 2011;44:100-10.
- 89.- McNamara RP, Henry MA, Schindler WG, Hargreaves KM. Biocompatibility of accelerated mineral trioxide aggregate in a rat model. *J Endod.* 2010;36:1851-5.
- 90.- Veloso HH, do Santos RA, de Araújo TP, Leonardi DP, Baratto Filho F. Histological analysis of the biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2006;14:376-81.

- 91.- Araki K, Suda H, Spångberg LS. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 1994;20:67-70.
- 92.- AlAnezi AZ, Zhu Q, Wang YH, Safavi KE, Jiang J. Effect of selected accelerants on setting time and biocompatibility of mineral trioxide aggregate MTA.-. 1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111:122-7.
- 93.- Danesh F, Tootian Z, Jahanbani J, Rabiee M, Fazelipour S, Taghva O, Shabaninia S. Biocompatibility and mineralization activity of fresh or set white mineral trioxide aggregate, biomimetic carbonated apatite, and synthetic hydroxyapatite. *J Endod.* 2010;36:1036-41.
- 94.- Martínez Lalis R, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2009;20:112-7.
- 95.- Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *Journal of Endodontics* 2001; 27: 571-3.
- 96.- Mittal M, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod.* 1995; 21: 622-4.
- 97.- Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2003;36:527-32.
- 98.- Molloy D, Goldman M, White RR, Kabani S. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73: 490-3.

APÉNDICES

APÉNDICE 1.**TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA.**

1.- COLOCAR EN ESTUFA A 70 °C

Hasta que se disuelva la parafina (aproximadamente 5 minutos)

2.- DESPARAFINAR CON XILOL 10 minutos (2 veces)

3.- SE COLOCA EN ALCOHOL-XILOL (250 ml alcohol y 250 ml de xilol)

4.- HIDRATAR CON ALCOHOL DE MAYOR A MENOR CONCENTRACIÓN

a) OH 100% 5 minutos

c) OH 70% 5 minutos

b) OH 90% 5 minutos

d) OH 50% 5 minutos

5.- SOLUCIÓN DE BUFFER P.B..

a) Lavar con solución Buffer P.B. 5 minutos (2 veces)

6.- SE LAVARAN CON AGUA DESTILADA

7.-METANOL CON H₂O₂ (0.3%) (500 ml Y 4.95 ml de H₂O₂)

20 minutos

8.- SE LAVARAN CON AGUA DESTILADA

9.- SOLUCIÓN DE BUFFER P.B.. (0.2 M, pH 7.2-7.4, 0.1% Triton X 100)

Lavar con solución Buffer P.B. 5 minutos (2 veces)

10.- SOLUCIÓN DE CÓCTEL DE SUERO DE RATA Y CONEJO (DEPENDE DE ANTICUERPOS)

1 hora (A temperatura ambiente) **NO MOVER CAJAS**

11.- SOLUCIÓN DE BUFFER PBS (0.2 M, pH 7.2-7.4, 0.1 Triton X 100)

a) Lavar con solución Buffer PBS 5 minutos (Se pueden lavar en el mismo Buffer todas las laminillas)

12.- INCUBACIÓN DEL PRIMER ANTICUERPO

12 horas a temperatura ambiente **NO MOVER CAJAS**

13.- SOLUCIÓN DE BUFFER PBS

Se lavan por separado las laminillas de cada anticuerpo

14.- INCUBACIÓN DEL SEGUNDO ANTICUERPO

1 a 2 horas a temperatura ambiente

15.- SOLUCIÓN DE BUFFER PBS

Se lavan las laminillas por separado dependiendo el anticuerpo

16.- APLICACIÓN DE DAB al 0.05% + H₂O₂ al 0.04% en Buffer PBS) usar guantes

a) Ver tabla anexa

17.- SOLUCIÓN DE BUFFER PBS

a) Lavar con solución Buffer P.B. 5 minutos (2 veces)

18.- SE COLOCARAN EN HEMATOXILINA (1 MINUTO)

19.- SE LAVAN CON AGUA CORRIENTE 2 VECES (HASTA QUE DEJE DE PINTAR EL AGUA)

20.- DESHIDRATAR CON OH DE MENOR A MAYOR CONCENTRACIÓN

a) OH 50 % 5 minutos

c) OH 70 % 5 minutos

b) OH 60 % 5 minutos

d) OH 100 % 5 minutos

21.- ACLARAR CON XILOL

a) Aclarar con xilol por 5 minutos (2 veces).

22.- MONTAR (Dejar los cortes en Xilol, NO SACARLOS) CON ENTALLAN Y UN CUBREOBJETOS

APENDICE 2.

<i>BUFFER P.B.S.</i>	<i>DAB</i>	H₂O₂
1 ml	0.0005 g	0.00132 ml
2 ml	0.001 g	0.00264 ml
3 ml	0.0015 g	0.00396 ml
4 ml	0.002 g	0.00528 ml
5 ml	0.0025 g	0.0066 ml
6 ml	0.003 g	0.00792 ml
7 ml	0.0035 g	0.00924 ml
8 ml	0.004 g	0.01056 ml
9 ml	0.0045 g	0.01188 ml
10 ml	0.005 g	0.0132 ml

Solución Buffer P.B.S. (0.2M, pH 7.2-7.4)

H₂O₂ = 2 litros

Fosfato de Sodio Dibásico (**Na₂ HPO₄**) = **43.6 gr**

Fosfato de Sodio Monobá

sico Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) = 12.8 gr

Tritón X 100= 2 ml

Para el anticuerpo:

200 μl de Buffer por cada laminilla

1 μl de anticuerpo por cada 300 μl de Buffer

APÉNDICE 3.

TECNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA

1- Desparafinar

a) Colocar en estufa a 70° C (hasta que la parafina se disuelva aproximadamente de 5 a 10 minutos).

b) Xilol (5 minutos)

c) Xilol (5 minutos)

2.- Hidratar

a) OH 100% (5 minutos)

b) OH 70% (5 minutos)

c) OH 50% (5 minutos)

d) Buffer PBS (5 minutos)

e) Buffer PBS (5 minutos)

3.- Hematoxilina (5 minutos)

4.- Enjuagar

a) Agua destilada (5 minutos)

b) Agua destilada (5 minutos)

5.- Eosina (3 minutos)

6.- Enjuagar

- a) OH 90 % (5 minutos)
- b) OH 100% (5 minutos)
- c) OH 100% (5 minutos)

7.- Aclarar

- a) Xilol (5 minutos)
- b) Xilol (5 minutos)

8.- Montaje

APÉNDICE 4.**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ ODONTOLOGÍA

COMITÉ DE BIOÉTICA**Comisión de Revisión Bioética**

Para: Dra. en C Myriam A. De La Garza-Ramos
Fecha recepción: 12 Noviembre de 2010
Titulo: *"Biocompatibilidad de selladores endodónticos mediante la detección de quimiocinas, citocinas y células del sistema inmune"*
Para: CD. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos en dicha aplicación conformada por las reglas y el reglamento de el DHHS y de la FDA en relación con los temas de uso humano. La aprobación se otorga durante un año. La siguiente revisión será en Octubre del 2011.

Como condición para aprobar la investigación, el Responsable de la Investigación debe de haber leído, establecido, y firmado el escrito adjunto de nuestro Documento Federal de Seguridad

Además el Responsable de la Investigación acuerda lo siguiente:

- 1.- A dar información mediante un reporte de revisión periódica, necesaria para la revisión de este protocolo por parte del comité, en intervalos apropiados para evitar el riesgo y asegurar que el protocolo esta siendo guiado con las recomendaciones y la supervisión del comité, pero dichos intervalos no deben de tener mas de un año desde su inicio.
- 2.- Proveer al comité la forma del reporte periódico de revisión, así como el reporte final cuando concluya su proyecto.
- 3.- El uso como documento de consentimiento informado para este estudio, el reporte final aprobado por el comité IRB impreso definiendo su periodo de aprobación
- 4.- Reportar cualquier evento adverso relacionado con el estudio, y que pudiera afectar la salud mental y física del paciente.
- 5.- Este estudio esta sujeto a registro durante este periodo de tiempo.

Los registros relacionados con las acciones del comité referentes a este protocolo están en el archivo en la oficina de División de Estudios Superiores y de Investigación de esta Facultad.

Dr. E. Aguirre Pequeño y Silao
Col. Mitras Centro
Monterrey, Nuevo León, México.
Tels. (81) 83480173 - 83475175



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ ODONTOLOGÍA

Fecha de aprobación 12 de Noviembre de 2010
 Período aprobado 12 de Noviembre 2009– 12 Noviembre de 2010
 Responsable de la Investigación CD. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda
 Coautor

Comité Institucional de Investigación y Bioética



Dra. en C Myriam Angélica de la Garza R.
 Presidente

DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACIÓN

MEO Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda
 Subdirector de Posgrado

Dra. Rosalva González Meléndez
 Secretaria



Dra. Paula Palomares Gorham

COMITÉ DE BIOÉTICA
FAC DE ODONT U.A.N.L

La siguiente información describe las responsabilidades tomadas del Documento de archivo de Múltiple Seguridad, de La Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, junto con la Ley federal de Salud en Materia de Investigación para la Salud (SS,1987) ANEXO I

La aprobación del protocolo esta sujeta a estas reglas.

- a) Los investigadores declaran y aceptan su responsabilidad para la protección de los derechos y el bienestar del humano así como garantizar su integridad
- b) Los investigadores que intenten involucrar investigaciones con humanos no estarán exentos de la aplicación de nuestras leyes federales y universitarias.
- c) Los investigadores son responsables de otorgar una copia de la aprobación del IRB firmada, y el documento de consentimiento de cada periodo de tiempo, a menos que el IRB elimine este requerimiento. Todos los documentos de consentimiento firmados serán guardados en la oficina administrativa de investigación.
- d) Los investigadores reportaran con rapidez los cambios propuestos en las actividades de investigación relacionados con humanos al IRB. Los cambios propuestos no deberán de iniciar sin la supervisión y la aprobación del IRB, excepto cuando sea necesario eliminar un inminente daño.
- e) Los investigadores son responsables para reportar el progreso de la investigación a la oficina de administrativa de investigación, tan a menudo como se describe en las bases de riesgos del IRB, pero no menos de una vez al año.

Dr. E. Aguirre Pequeño y Silao
 Col. Mitras Centro
 Monterrey, Nuevo León, México.
 Tels. (81) 83480173 - 83475175



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ ODONTOLOGÍA

- f) Los investigadores deberán reportar inmediatamente los daños y/o problemas que sean riesgo para los sujetos y para otros miembros de la comunidad
- g) Ni el investigador, ni asociados interinstitucionales, no institucionales en acuerdos de investigación podrán buscar para su beneficio, obtención de créditos, la utilización de la información de las intervenciones con el paciente que constituyan una violación a las garantías de su atención médica, sin la aprobación del IRB. Un médico deberá proveer seguridad ética/médica al paciente con la revisión y aprobación del IRB, exigida por la ley.
- h) Los investigadores deberán notificar al IRB, a la oficina de Investigación Administrativa y a las instituciones oficiales el intento para la admisión de Material humano que vayan a ser utilizados en los protocolos de investigación.

Capítulo 1, Capítulo 13. Prevalecerá el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, por lo cual se solicitará a los pacientes su aprobación voluntaria.

Artículo 14 Fracción V. Se contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación, en este caso se solicitará el consentimiento informado del paciente previo a la aplicación de los instrumentos.

Fracción VI. Todos los estudios serán realizados por profesionales de la salud con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud.

Fracción VII y VIII. Se contará con el dictamen favorable de la Comisión de Investigación y Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León; la colecta de los datos se realizará solo cuando se cuente con dicha autorización.

Artículo 16 Se protegerá la privacidad del sujeto investigado, ya que no se solicitará identificación.

Artículo 17. Fracción I Esta investigación (es) debe de considerarse como riesgo mínimo.

Artículo 18 y 21. Para considerar existente el consentimiento informado del sujeto de investigación recibirá una explicación clara y completa de lo siguiente:

- 1) Justificación de los objetivos de investigación
- 2) Los procedimientos que vayan a usarse y su propósito, incluyendo la identificación de los procedimientos que son experimentales
- 3) Las molestias o riesgos esperados
- 4) Los beneficios que pueda obtener
- 5) Los procedimientos alternativos que pudieran ser verificados por el sujeto.
- 6) La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación en el tratamiento del sujeto.

Dr. E. Aguirre Pequeño y Silao
Col. Mitras Centro
Monterrey, Nuevo León, México.
Tels. (81) 83480173 - 83475175



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ ODONTOLOGÍA

- 7) La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello creen prejuicios para continuar su cuidado y tratamiento
- 8) La seguridad de que no se identificara al sujeto y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

I. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.

- 1) La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.
- 2) Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.
- 3) El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.
- 4) La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".
- 5) El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.
- 6) En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.
- 7) El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.
- 8) En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.
- 9) La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.
- 10) Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares

Dr. E. Aguirre Pequeño y Silao
Col. Mitras Centro
Monterrey, Nuevo León, México.
Tels. (81) 83480173 - 83475175