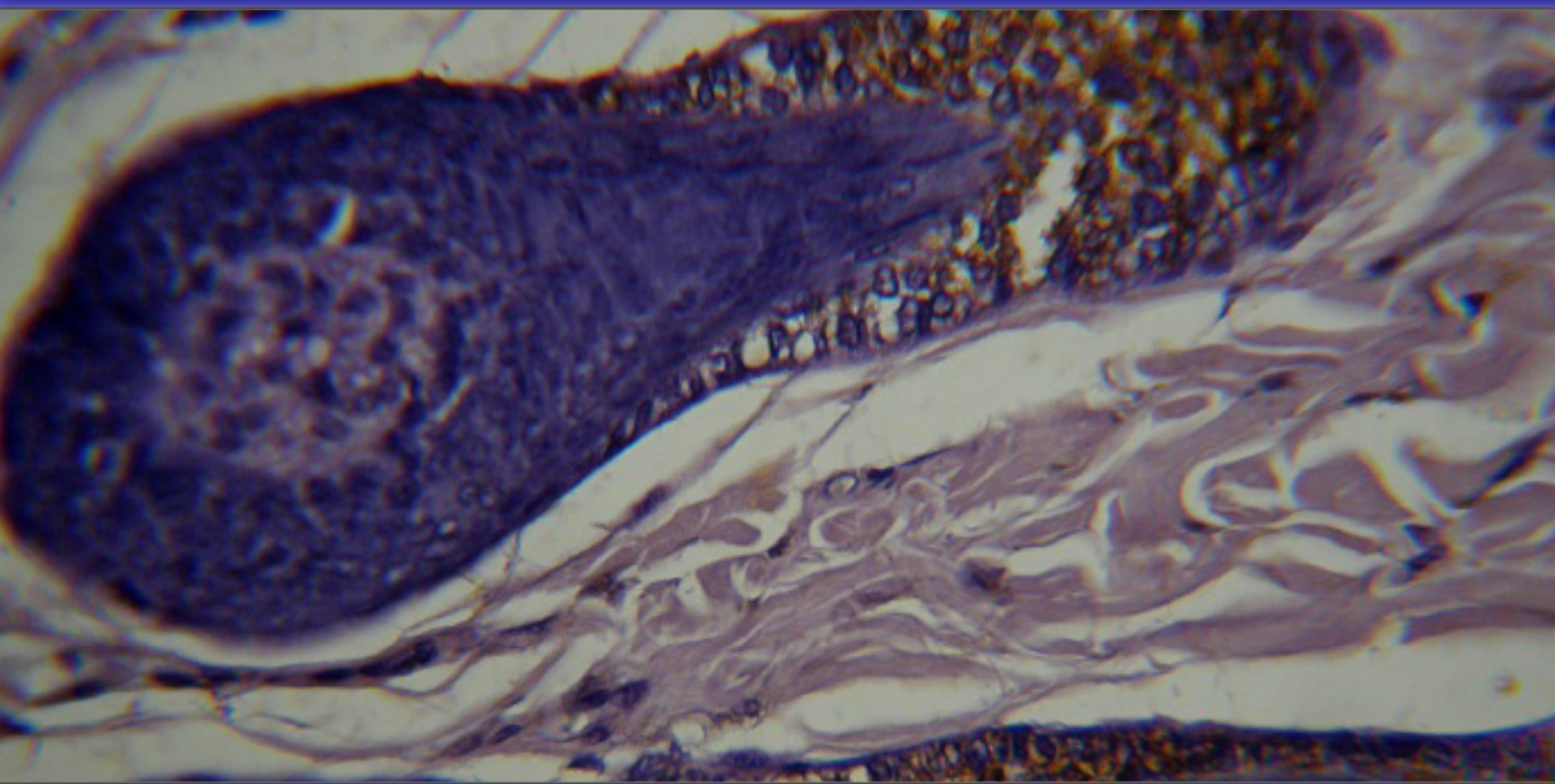


EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE  
ACRÍLICO, LUCITONE®, VALPLAST®  
Y POLIPROPILENO, MEDIANTE LA DETECCIÓN  
IN SITU DE QUIMIOCINAS, CITOCINAS  
PROINFLAMATORIAS Y CÉLULAS DEL  
SISTEMA INMUNE



TESIS DOCTORAL

ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA  
Granada, 2011





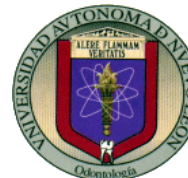


*ugr* | Universidad  
de Granada



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE  
ACRÍLICO, LUCITONE®, VALPLAST® Y POLIPRO-  
PILENO, MEDIANTE LA DETECCIÓN IN SITU  
DE QUIMIOCINAS, CITOCINAS PROINFLAMA-  
TORIAS Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**

TESIS DOCTORAL

ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA  
Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rosa Isela Sánchez Nájera  
D.L.: GR 2746-2011  
ISBN: 978-84-694-4442-9



ugr

Universidad  
de Granada



De acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, **D. SANTIAGO GONZÁLEZ-LÓPEZ**, Profesor Titular de la Universidad de Granada del Departamento de ESTOMATOLOGÍA y **D<sup>a</sup>. VICTORIA BOLAÑOS CARMONA**, Profesora Titular de la Universidad de Granada del Departamento de ESTOMATOLOGÍA **informan:**

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la **Tesis Doctoral titulada: "EVALUACIÓN DE LA BIOCOPATIBILIDAD DE ACRÍLICO, LUCITONE®, VALPLAST® Y POLIPROPILENO, MEDIANTE LA DETECCIÓN IN SITU DE QUIMIOCINAS, CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE"**, presentada por **D. <sup>a</sup> ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA**, han sido realizados bajo nuestra supervisión y dirección, y reúnen las condiciones académicas necesarias para **optar al grado de Doctor**, si así lo considera el Tribunal designado por la Universidad de Granada.

En Granada, a día de mes de dos mil once.

Fdo.: Dr. Santiago González-López

Fdo: Dra. Victoria Bolaños Carmona

PROFESORES TITULARES DE LA UNIDAD DOCENTE DE PATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DENTAL

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE GRANADA



## **Agradecimientos:**

*Hace tres años comenzamos los profesores de la Facultad de Odontología con un sueño, poder obtener nuestro título doctoral y gracias a la visión de los universitarios de dos Instituciones nuestra alma mater Universidad Autónoma de Nuevo León y la Universidad de Granada en España, ahora se hace realidad. Así que mi más sincero agradecimiento para la Dra. Marianela Garza Enríquez y para el Dr. Alberto Rodríguez Archilla decanos de las dos Universidades y a los Subdirectores de Posgrado: Dr. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda y al Dr. Alejandro Ceballos Salobreña.*

*Al Dr. Santiago González-López por haber aceptado ser mi asesor de tesis; doctor, gracias, sus consejos, paciencia y opiniones hacen que me sienta satisfecha por los logros obtenidos en este trabajo de tesis.*

*Al Laboratorio de Histología e Inmunología por darme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo: comparto ésta tesis con ustedes así como mi trabajo del día a día con los maestros, instructores, alumnos y personal administrativo.*

*Gracias al Dr. Juan Manuel Solís Soto, Dra. María Victoria Bolaños Carmona, Dra. Ake-mi Nakagoshi Cepeda, Dra. Lizeth Quintanilla Rodríguez, al MC. Gustavo Martínez González por todo el apoyo que recibí de ustedes.*

*Gracias a todos.*

---





*A mi esposo Ramón por el cariño que siempre me brindas en cada meta que me propongo.*

*A mis hijas Alejandra y Mariana por la paciencia que me tuvieron durante la realización de este trabajo.*



# Indice

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. RESPUESTA INMUNITARIA.....	7
2.2. CITOCINAS .....	8
2.3. INTERLEUCINA 1BETA (1L-1 $\beta$ ).....	9
2.4. INTERLEUCINA 6 (IL- 6).....	10
2.5. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNT ALFA).....	10
2.6. QUIMIOCINAS .....	11
2.7. MATERIALES PARA PRÓTESIS .....	12
2.8. LUCITONE® .....	13
2.9. VALPLAST® .....	13
2.10. POLIPROPILENO.....	14
2.11. ACRÍLICO .....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	19
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
6. RESULTADOS .....	35
6.1. LUCITONE® .....	35
6.2 VALPLAST® .....	43
6.3. POLIPROPILENO .....	51
6.4. ACRÍLICO .....	58
7. DISCUSIÓN .....	67
8. CONCLUSIONES .....	71
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10.APÉNDICES.....	79
10.1. APÉNDICE 1 .....	79
10.2 APÉNDICE 2 .....	83
10.3. APÉNDICE 3 .....	85



# Capítulo 1

## Resumen

**E**l conocimiento de las propiedades de los materiales dentales y el comportamiento celular de los tejidos y su reacción como mecanismos de defensa inmunológica es de suma importancia para que el odontólogo pueda tener bases científicas en la elección de los mismos. **Los Objetivos** de este trabajo de investigación son: evaluar y comparar la biocompatibilidad por medio de la histoquímica y la inmunocitoquímica de cuatro tipos de materiales odontológicos utilizados para la fabricación de prótesis dentales: LUCITONE® (FRS Denstply, México), VALPLAST® (International Corp. Long Island City N.Y), acrílico (Nic Tone, MDC Dental de Zapopan Jalisco México) y polipropileno (Indelpro, Monterrey. N.L. México). Se detecta la producción in situ de quimiocinas (RANTES y MIP3), citocinas proinflamatorias (Interleucina 1 Beta "IL-1 $\beta$ ", Interleucina 6 "IL-6" y TNF alfa) y células del sistema inmune (linfocitos T por medio del CD8 y macrófagos por medio del CD14). **Material y Métodos:** Para el estudio se realizaron inoculaciones en 60 ratones de la cepa BALB/C con materiales que se utilizan para realizar prótesis dentales: VALPLAST®, LUCITONE®, acrílico y polipropileno. Se dividieron en 5 grupos de 12 ratones, uno por cada material experimental y un grupo control. Una vez inoculados, se sacrificaron los animales en períodos de 12 horas, 24 horas y 7 días. Se realizaron las muestras histológicas con la técnica de parafina, se realizaron las tinciones específicas para cada uno de los marcadores de la inflamación estudiados y se observaron las reacciones de los tejidos por medio de recuento celular a través de la microscopía óptica. **Resultados:** En los tejidos inoculados con LUCITONE®, transcurridas 12 horas, se detectaron células del sistema inmune en tejido inflamatorio y dermis, encontrándose CD8 en ambos tejidos y CD14 solo en tejido inflamatorio. Las quimiocinas MIP3 se encontraron en tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso y la quimiocina RANTES solo se encontró en tejido inflamatorio. La máxima expresión correspondió a la citocina proinflamatoria IL-6 que aparece en todos los tejidos, igual que la IL-1 $\beta$  que aparece en todos los tejidos excepto en la epidermis. En cambio el TNF alfa, sólo se detectó en tejido inflamatorio y dermis. En análisis de la respuesta a LUCITONE®, a las 12 horas, se observa que en el tejido inflamatorio se encuentran todos los marcadores estudiados y que, en dermis, estaban presentes todos excepto CD14, MIP3 y RANTES. El análisis a las 24 horas se caracteriza por la desaparición de las células inmunes CD8 y CD14 y las quimiocinas, estando presente MIP3, aunque disminuida. En este periodo la respuesta inflamatoria se caracterizó principalmente por

la presencia de IL-1 $\beta$  y por IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis. El análisis a los 7 días sólo se caracteriza por la presencia de citocinas proinflamatorias y, especialmente, por un incremento de la IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis, con desaparición de la IL-1 $\beta$ . Con VALPLAST®, a las 12 horas, solo se encontró una expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1  $\beta$  y con IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis con máxima expresión en el músculo, donde duplicaron su presencia respecto a otros tejidos. A las 24 horas, se observa un incremento de la cantidad de esas citocinas, principalmente de la IL-6, que se duplica. A los 7 días se produce la desaparición de la IL-1 $\beta$ , persistiendo la presencia de IL-6 en similar número en dermis y tejido inflamatorio pero disminuyendo a la mitad en tejido muscular.

Los tejidos inoculados con polipropileno se caracterizan, a las 12 horas, por una leve presencia de células del sistema inmune con CD14, quimiocinas MIP3 y citocinas proinflamatorias IL-6 en dermis y tejido inflamatorio. No hay presencia de IL-1 $\beta$ . A las 24 horas, se detecta un incremento importante de IL-6 en todos los tejidos con leve presencia de la IL-1 $\beta$  en dermis, tejido inflamatorio y folículo piloso y presencia de escasas células CD14. A los 7 días, se observa IL-6 en cantidad similar a la obtenida en los análisis a las 24 horas, en todos los tejidos.

Los inoculados por acrílico, a las 12 h, demostraron una fuerte expresión de IL-6 en todos los tejidos y de la quimiocina MIP3 en todos los tejidos excepto en la dermis. A las 24 horas, la respuesta se mantiene similar pero con la aparición de células del sistema inmune CD14 en dermis y tejido inflamatorio. A los 7 días, se caracteriza por la presencia exclusiva de un número elevado de células con expresión IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis.

**Conclusiones:** La IL-6 fue la citocina que se expresó en mayor cantidad en todos los tejidos examinados, con los cuatro materiales y en los 3 tiempos del estudio, siendo su expresión máxima a las 24 horas y a los 7 días de su inoculación.

Según la expresión de las células inmunorreactivas en los tejidos inoculados con los diferentes materiales experimentales, en los tres tiempos estudiados, a las 12 h, el polipropileno demuestra la mayor biocompatibilidad y, el acrílico, la menor. Tras 24 h y 7 días se incrementa la expresión de células inmunorreactivas siendo el acrílico el material menos biocompatible.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.





# Capítulo I I

## Introducción

Una de las principales razones por las que acude el paciente a la consulta odontológica es la necesidad de sustituir una o, en la mayoría de los casos, varias piezas ausentes. Cuando faltan varias piezas y el odontólogo decide qué tipo de restauración realizará, en algunos casos se opta por colocar una prótesis parcial removible y, entonces, deberá tener en cuenta el diseño del aparato así como los materiales con los que se realizará dicha prótesis.

Las prótesis removibles son aparatos protésicos de soporte dento-mucoso bilateral, colocados y removidos a voluntad del paciente y sirven para reponer las piezas dentales ausentes, devolviendo a la boca su fisiología, anatomía y estética.

En el mercado hay una amplia variedad de materiales que se utilizan para confeccionar estas prótesis. Entre los materiales que más comúnmente se manejan destacan los basados en acrílico (metacrilato de metilo), VALPLAST® (resina termoplástica), LUCITONE® (resina termoplástica) y actualmente en el mercado se manejan también los basados en polipropileno.

Éstos materiales, debido a sus componentes químicos, presentan cierto grado de citotoxicidad y, dado que éstos materiales estarán en contacto íntimo con la mucosa oral, es muy importante que éstos sean biocompatibles además de que posean otras propiedades deseables como, estabilidad dimensional, estabilidad del color, dureza, elasticidad, superficie homogénea. Ésta última es una característica importante, para disminuir en lo posible la adhesión de placa bacteriana así como bacterias y hongos como la candida albicans<sup>1,2</sup>

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad que tienen algunos materiales de producir una reacción desfavorable en el huésped. Para evaluar la biocompatibilidad se pueden realizar estudios in vivo o estudios in vitro.

En la Universidad de Santiago de Cali en Colombia se llevó a cabo un estudio en el que se investigan las pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico para provocar una respuesta biológica.<sup>3</sup> En ese estudio se describen los diferentes procedimientos, métodos y técnicas de investigación de acuerdo a los protocolos descritos en la literatura y con la normativa universal regida por la ANSI / ADA (Instituto Estadounidense de estándares de la Asociación Dental Norteamericana) las normas del ICONTEC (Instituto Colombiano de

Normas Técnicas) y las normas del ISO (Organización Internacional para la Estandarización). En dichas pruebas se demuestra que a través de los estudios *in vitro* se puede determinar la muerte o el crecimiento celular, la función celular y, en algunos casos, se puede evaluar la integridad del material genético de la célula. Además demuestran que los ensayos *in vitro* resultan muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y tienen como ventajas no requerir el uso de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y su relación costo efectividad. Sin embargo, las respuestas *in vitro* no siempre son indicadoras de reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son solo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*. En ese mismo artículo se explica que los animales de mayor uso, por su similitud con el organismo humano en cuanto a respuesta de tejidos, son los ratones, las ratas, los hámsters, los hurones y los conejos. Las pruebas en animales se subdividen en distintos grupos, como de toxicidad sistémica a largo y corto plazo, de exposición a membranas intactas o dañadas y de sensibilización inmune o respuesta ósea. También hay pruebas que incluyen mutagenicidad, carcinogenicidad y otras situaciones. No obstante, el test más utilizado es el del tejido subcutáneo en ratas, que se emplea con frecuencia para evaluar materiales dentales de uso en la terapia pulpar o la obturación radicular.<sup>3</sup> En la Universidad Estadual de Campinas en Brasil se realizaron investigaciones de biomateriales para ortopedia, como materiales cerámicos, metálicos, poliméricos y compuestos<sup>4</sup>. En ese trabajo se evalúa un hidrogel hecho a base de poli-(2-hidroxi-etil metacrilato) (poliHEMA), material utilizado para la reparación de defectos en el cartílago. Para la evaluación *in vivo*, muestras del hidrogel fueron implantadas en defectos osteonrales (orificios) realizadas en la región intercondílea distal del fémur de ratones. Se demostró que el hidrogel cubría totalmente los orificios, integrándose bien a los tejidos vecinos y activando la reparación de la superficie articular. No se detectó ninguna reacción inflamatoria significativa y se observó la intrusión del tejido hacia el interior de los poros del hidrogel.<sup>4</sup> En la Facultad de Odontología en la Universidad de Salamanca en Madrid, se llevó a cabo un estudio sobre la biocompatibilidad de un cemento óseo con una amina de reducida toxicidad. 4-N, N-dimetilaminobencil alcohol, DMOH, que se comparó con la N-dimetil-4-toluidina, DMT, habitualmente incluida en las formulaciones comerciales. Para ello, realizaron experimentos *in vivo* por implantación intramuscular de varillas de cemento curado en el músculo dorsal de ratas, así como experimentos en conejos mediante la implantación del cemento en su estado pastoso en el fémur del animal con el fin de reproducir la situación clínica. El análisis histológico de varillas explantadas de cemento experimental y control (CMW 3), a las cuatro semanas, reveló, en ambos casos, la formación de una membrana limitante de tejido conectivo laxo infiltrado por leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y eosinófilos. Los resultados obtenidos en el estudio histológico del tejido óseo mostraron restos de necrosis y la presencia de reacciones inflamatorias con aparición de macrófagos y de eosinófilos que demuestran hipersensibilidad del tejido óseo al material.<sup>5</sup>

## - 6 - Tesis Doctoral

## RESPUESTA INMUNITARIA (GENERALIDADES)

El cuerpo humano dispone de diversas formas para defenderse de agentes extraños que lo rodean. La primera línea de defensa que posee es la formada por las barreras físicas que incluyen a la piel, que protege toda la superficie del cuerpo y las mucosas, que revisten todos los órganos huecos y cavidades; estos componentes poseen características que les ayudan a que los microorganismos no puedan penetrar al organismo. El tejido epitelial, que reviste toda la superficie interna y externa del cuerpo, está conformado por células muy juntas entre sí lo cual le proporciona la capacidad de ser impermeable; a su vez, dichas células pueden presentar prolongaciones citoplasmáticas en su superficie apical, que permiten transportar partículas para su eliminación; otra de sus características es la capacidad de algunas glándulas anexas a la mucosa digestiva y respiratoria junto con algunas células epiteliales de producir moco el cual sirve para atrapar, disolver y eliminar partículas. En el mismo sentido, se debe incluir la acción de lavado que producen las lágrimas, saliva y orina, sobre la superficie epitelial. Nuestra superficie epitelial es más que una barrera física a la infección, ya que además produce sustancias químicas que son microbicidas o que inhiben el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, la lisozima y la fosfolipasa A son enzimas antibacterianas, secretadas en las lágrimas y la saliva. El pH ácido del estómago y las enzimas digestivas, sales biliares, ácido gástrico y lisolípidos se encuentran en la parte superior del tracto digestivo, creando una barrera química sustancial a la infección. En la parte inferior del tracto digestivo disponemos de péptidos antibacterianos y antimicóticos, llamados criptidinas o alfa-defensinas, producidos por las células de Paneth en la base de las criptas del intestino delgado.<sup>6,7,8,9</sup>

Si un microorganismo cruza la barrera epitelial y empieza a replicarse en el organismo, en muchos casos éstos son inmediatamente reconocidos por los fagocitos, o macrófagos, que residen en esos tejidos. Los macrófagos maduros provienen continuamente de monocitos que dejan la circulación para migrar dentro de los tejidos. Estas células se encuentran en grandes cantidades dentro del tejido conjuntivo, en la túnica submucosa del tracto intestinal, respiratoria y en el bazo. La segunda mayor familia de fagocitos (los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares), son células que viven en abundancia en los vasos sanguíneos, pero no los encontramos presentes en tejidos normales o sanos. Ambas células fagocíticas juegan un rol clave en la respuesta inmune innata, por lo que pueden reconocer, ingerir y destruir muchos patógenos sin la necesidad de una respuesta inmune adaptativa.

Los macrófagos localizados en la submucosa de tejidos son las primeras células en encontrar patógenos y llegan rápidamente, por el reclutamiento previo de un gran número de neutrófilos, al sitio de la infección. Macrófagos y neutrófilos tienen la capacidad de reconocer

patógenos ya que disponen de receptores capaces de discriminar entre las moléculas de superficie expresadas por patógenos y las expresadas por el huésped. Estas células pueden llevar a cabo la fagocitosis, un proceso activo en el cual un patógeno es rodeado por la membrana de la célula fagocítica y, después, es introducido al interior en una vesícula rodeada por membrana llamada fagosoma o vesícula endocítica. El fagosoma se comienza a acidificar, lo que puede matar a muchos patógenos. Además, los macrófagos y neutrófilos tienen en el interior organelos llamados lisosomas los cuales contienen enzimas hidrolíticas como fosfatasa, nucleasas o lipasas. El fagosoma se fusiona con uno o más lisosomas para generar un fagolisosoma en el cual se libera el contenido de los lisosomas para destruir el microorganismo patógeno.<sup>10</sup>

Un importante efecto de la interacción entre patógenos y macrófagos en los tejidos es la activación de éstas células para liberar citocinas, quimiocinas y otros mediadores tisulares del proceso inflamatorio.<sup>11</sup> Además, atraen neutrófilos y proteínas del plasma al sitio de la infección.<sup>10,12</sup>

## CITOCINAS

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles (aproximadamente 25 kDa) secretadas por varios tipos de células. [8] Usualmente, son liberadas 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 paracrina, 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 aquéllas para entrar en la circulación y de su vida media en la sangre.<sup>13,14</sup>

Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a patógenos son un grupo estructuralmente muy diverso que incluyen: IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF alfa. El nombre interleucina (IL) seguido por un número fue adoptado con la finalidad de desarrollar una nomenclatura estandarizada para moléculas secretadas por leucocitos. Hay dos grupos principales de citocinas: la familia de hematopoyetinas, que incluyen hormonas del crecimiento y también muchas interleucinas que juegan papeles importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa; y la familia de Factores de Necrosis Tumoral (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 la familia de TNF. 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.<sup>14,15,16</sup>

### **Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ )**

La familia interleucina 1 (IL-1) es un grupo de citocinas relacionadas que incluye dos proteínas agonistas (IL-alfa y la IL-1  $\beta$ ), 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-1ral, icIL-1ralI).<sup>17</sup>

Interleucina-1 es principalmente una citocina inflamatoria. Biológicamente está más cercanamente 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.<sup>18</sup>

IL-1 juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la respuesta del huésped a la invasión, siendo un importante factor en la iniciación de la respuesta inflamatoria y en la activación de las funciones inmunológicas. Además de esta acción pleiotrópica e inflamatoria, la actividad de IL-1 está 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. Además la regulación de la actividad IL-1 se logra por una estricta jerarquía de afinidad de unión a estos dos receptores, el activador IL-1RI y el inhibidor IL-1RII, en los diversos miembros de la familia IL-1.<sup>17</sup>

La familia de las proteínas humanas IL-1 son mediadores clave de la respuesta a infecciones, lesiones y cambios inmunológicos. El mecanismo por el cual IL-1 activa la

respuesta pro inflamatoria en células blanco, y el plasma de los receptores de membrana involucrados es bastante bien conocido.<sup>19</sup>

### **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 en la reabsorción de hueso. Se ha comprobado que la estimulación de la liberación de IL-6 en células del ligamento periodontal en presencia de *Porfiromonas Endodontalis* puede jugar un papel importante en el progreso de la inflamación y reabsorción del hueso alveolar en las enfermedades periodontal y periapical.<sup>20</sup>

IL-6 tiene efectos sobre múltiples células, incluyendo la promoción y desarrollo de células del sistema inmune y osteoclastos. Se ha comprobado incluso que la delección de IL-6 promueve el desarrollo de la lesión periapical como resultado de la infección en los conductos radiculares.<sup>21</sup>

### **FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF alfa)**

La familia de factor de necrosis tumoral alfa ha sido una de las familias de proteínas más intensamente estudiadas. Está constituida por 19 miembros que median diversas funciones biológicas al unirse a receptores de la superficie de la membrana celular que pertenecen a la familia TNF alfa.<sup>22</sup>

Los miembros de esta familia, por otra parte, pueden ejercer daño en el huésped como sepsis y caquexia en tumores así como en enfermedades autoinmunes. Además, ahora es conocido el papel esencial de los miembros de la superfamilia de TNF, TNF alfa, TNF beta, TNF y LIGHT así como de sus receptores en la organogénesis de órganos linfáticos secundarios y el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos linfáticos.<sup>23</sup>

El factor de necrosis tumoral es una citocina pro inflamatoria que juega un rol crítico en diversos eventos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Está 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 juega un papel crítico durante estas respuestas celulares.<sup>24</sup>

FNT alfa actúa a través de conexiones a receptores específicos sobre la membrana

celular que inician una cascada de eventos entre los que destacan la inducción, activación o inhibición de numerosos genes reguladores de citocinas en el núcleo celular.<sup>25</sup>

## QUIMIOCINAS

A finales de la década de 1960, se observó que los linfocitos T activados secretan linfocinas que poseen una actividad quimio-atrayente muy potente para monocitos y neutrófilos. Desde entonces, se han descrito más de estas citocinas quimio-atrayentes o quimiocinas. Este es uno de los grupos funcionales más grandes de citocinas conocidos.<sup>26</sup>

La mayoría son péptidos pequeños. Ahora se sabe que, virtualmente, 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: quimiocinas individuales no solo regulan la quimiotaxia, sino también la adhesión, desgranulación, 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.<sup>26</sup>

La clasificación más descriptiva y más ampliamente aceptada consiste en un esquema que reorganiza cuatro subfamilias de quimiocinas con base en los rasgos de su secuencia de aminoácidos. La mayoría de las quimiocinas contiene dos o tres pares de residuos cisteína (C) que forman puentes intramoleculares disulfuro los cuales contribuyen a mantener la estructura plegada de la molécula; uno de estos disulfuros generalmente se forma entre C1 y C3, el otro entre C2 y C4. En una subfamilia de quimiocinas C1 y C2 se encuentran separados mediante un solo aminoácido; estas se denominan CXC o quimiocinas<sup>27</sup>.

Otras quimiocinas no poseen ningún aminoácido entre C1 y C2 y se les nombra CC o quimiocinas 13. Una quimiocina humana muy inusual llamada linfotactina posee solo un par de cisteínas y, por lo tanto, es el único miembro de la familia XC o subfamilia y. La quimiocina más grande de todas, llamada fractalcina, posee tres residuos interpuestos entre C1 y C2, por lo que se le conoce como CX3C o quimiocina 8. 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 sólo 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.<sup>27</sup>

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  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) 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.<sup>28</sup>

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 celulares mononucleares. Las quimiocinas CC proinflamatorias generalmente promueven la inflamación crónica y respuestas inmunes adquiridas. Sus receptores son: CCR19.<sup>28</sup>

## MATERIALES PARA PRÓTESIS

El glosario de términos prostodóncicos define la prótesis completa como aquel dispositivo protésico dental removible que sustituye a toda la dentición y a las estructuras asociadas del maxilar o la mandíbula. Dicha prótesis está constituida por dientes artificiales unidos a una base protésica. A su vez, dicha base sustenta su apoyo en el contacto con los tejidos orales subyacentes, los dientes o los implantes.<sup>29</sup>

Aunque las bases protésicas pueden estar fabricadas con metales o aleaciones metálicas, la mayor parte de las mismas se confeccionan con polímeros comunes, los cuales se eligen en función de su disponibilidad, estabilidad dimensional, propiedades de manipulación, color y compatibilidad con los tejidos orales.<sup>29</sup>



**LUCITONE®**

Es una resina dental termopolimerizable, compuesta por resina de polimetacrilato constituida por polvo y líquido. El polvo consta de esferas prepolimerizadas de polimetacrilato y una pequeña cantidad de peróxido de benzoilo que actúa como iniciador, es decir, es el responsable del comienzo del proceso de polimerización, que tiene lugar a una temperatura de 60° C. Estas resinas termopolimerizables contienen dimetacrilato de glicol responsable de la elasticidad que caracteriza a este material.<sup>30</sup>

El LUCITONE® está indicado para la fabricación de dentaduras temporales parciales o de tamaño pequeño a mediano que se pueden extraer completamente, así como para férulas oclusales y protectores de noche.

Algunas especificaciones del LUCITONE® es que se maneja sin el uso de monómero, lo que facilita el pulido de las prótesis según el fabricante.<sup>31</sup> Su resistencia tensil es de 9,000 psi, su fuerza flexural es de 10,000 psi, el punto de fusión es de 240 grados centígrados.

Según las especificaciones de la ADA, el LUCITONE® se clasifica como material Tipo III, Clase 1. Se almacena en temperaturas que oscilan entre los 16 y 32 grados centígrados, su tiempo de proceso de curado es de 17 minutos a 302 grados, tiene una presión de inyección mínima de 75 psi, el tiempo de inyección se estima en un minuto y su tiempo de enfriamiento en 5 minutos.<sup>31</sup>

**VALPLAST®**

Es resultado de una tecnología reciente en el desarrollo de nuevos biomateriales. Se trata de una resina hecha a base de nylon termoplástico. Es un material translúcido, lo que permite una completa mimetización con la encía natural del paciente, cualidad que lo hace prácticamente invisible, a diferencia del acrílico que es opaco y da una apariencia artificial. En un estudio Bravo L. et al <sup>32</sup> tratan de demostrar que el uso de prótesis removibles tipo VALPLAST® provoca un mayor grado de reabsorción ósea que la provocada por prótesis acrílicas convencionales; en este trabajo se enumeran las características físicas de este material, entre las que cabe destacar las siguientes: Tiene un peso específico de 1.04 gramos; una capacidad de absorción al agua en siete días de 10.089 mg/mm<sup>3</sup>; un módulo de elasticidad de 356.23/mm<sup>2</sup>; una fidelidad a las dimensiones de un 2% sin restricción y una resistencia máxima sin rupturas a los 375°F.

## POLIPROPILENO

Polímeros tanto sintéticos como naturales y sus modificaciones, tanto físicas como químicas, están siendo utilizados constantemente ya que conducen a una significativa mejora de la calidad de vida de las personas. Las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los polímeros permiten utilizar estos materiales en diversas aplicaciones que van desde simples materiales de embalaje, construcción o juguetes, hasta el más sofisticado uso en la medicina (prótesis oculares, de extremidades y en prótesis maxilofaciales). Entre los polímeros sintéticos más estudiados se encuentra el polipropileno, el cual, por poseer excelentes propiedades, se utiliza en una amplia gama de productos formados por procesos de extrusión o de inyección.<sup>33</sup> El polipropileno es un termoplástico comercial, semicristalino, blanco semiopaco elaborado en una amplia variedad de calidades y modificaciones. Se considera como polímero lineal por poseer un grupo metilo.<sup>33</sup> Las propiedades del polipropileno son similares a las del polietileno, pero difiere de éste en su menor densidad, intervalo de temperatura de uso más amplio, punto de fragilidad más alto, mayor rigidez y, como desventaja, en su facilidad para oxidarse. La temperatura de transición vítrea es de  $-10^{\circ}\text{C}$ , su temperatura de fusión es de  $173^{\circ}\text{C}$ , la densidad amorfa a los  $25^{\circ}\text{C}$  es de  $0.85\text{ g/cm}^3$ , su peso molecular es de  $42,08\text{ g/mol}$ .<sup>34</sup>

## ACRÍLICO

Fue desarrollado en los años 30 y usado en odontología en los años 40; es un material claro, opaco, que puede teñirse. El monómero metilmetacrilato líquido se mezcla con el polímero en polvo. El metilmetacrilato es un líquido transparente a temperatura ambiente y cuenta con las siguientes propiedades: peso molecular de 100, punto de fusión de  $-48^{\circ}\text{C}$ , un punto de ebullición de  $100.8^{\circ}\text{C}$ , una densidad de  $0,945\text{ g/ml}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  y su calor de polimerización de  $12,9\text{ Kcal/mol}$ .<sup>30</sup>

El primer uso del metilmetacrilato en Odontología fue en la fabricación de bases de dentaduras completas.

Este material es de relativamente fácil manipulación y de baja toxicidad, por lo que pronto se incorporó a muchas especialidades médicas. El metilmetacrilato se ha utilizado en cementos de hueso, lentes de contacto e intraoculares, tornillos de fijación en hueso, relleno para cavidades de hueso, para la estabilización de vértebras en pacientes con osteoporosis,<sup>29</sup> así como para bases de prótesis dentales.<sup>30</sup>

Las bases de dentaduras de resinas acrílicas tienen el potencial de producir irritación, inflamación y respuestas alérgicas en la mucosa bucal. Stenman<sup>35-39</sup> en su estudio para evaluar las reacciones de hipersensibilidad a materiales dentales, refiere que un gran número de

pacientes dieron positivo a pruebas de sustancias orgánicas y que en muchos casos la sustancia que causó la reacción de la piel fue un constituyente conocido de los materiales de prótesis presentes en la cavidad bucal, principalmente restos del monómero. Lo anterior también ha sido reportado por otros autores.<sup>35- 39</sup>

Algunos de los residuos de las resinas acrílicas son el formaldehído y el metilmetacrilato, los cuales se han encontrado en cantidades significativas en saliva humana especialmente cuando se usan resinas de autopolimerizado. Ambas sustancias tienen potenciales citotóxicos que varían de acuerdo a sus concentraciones. El formaldehído es citotóxico a concentraciones más bajas que el metilmetacrilato. Por este motivo, se recomienda la inmersión en agua de las prótesis ya que reduce la liberación posterior tanto del formaldehído como del metilmetacrilato, especialmente si aumentamos la temperatura del agua. Por ello, se recomienda la inmersión de la prótesis en agua caliente (50°C) antes de la colocación en la boca sobre todo cuando al utilizar resinas de autopolimerizado, que se usan comúnmente para los rebases en boca, lo que se minimiza el riesgo de reacciones adversas en los pacientes.<sup>40</sup>

Los resultados de Lefebvre y cols.<sup>41</sup> en un estudio para evaluar la toxicidad de residuos de bases de resinas, sugieren que los componentes que liberan los materiales utilizados en diferentes rangos tienen efectos citotóxicos prolongados sobre las células epiteliales de la mucosa oral.

Además, se ha observado que el efecto de las resinas para base de dentaduras sobre las células epiteliales de la mucosa bucal parece estar relacionado con la formulación específica de los materiales y no tanto con el tipo de polimerización, ya que variar el tiempo de polimerización o utilizar resinas de polimerización con luz parece tener muy poco efecto.<sup>42</sup>

Las reacciones citotóxicas de los monómeros de acrílico se producen principalmente por el metacrilato. Un estudio para evaluar la citotoxicidad del metil-metacrilato sobre monocitos, granulocitos y células endoteliales in vitro muestra que se produce citotoxicidad después de tan solo 1 minuto de incubación con el metacrilato.<sup>43</sup>

Shuster GS y cols.<sup>44</sup> demostraron que las sustancias que se liberan de las resinas de bases de dentaduras pueden inhibir el crecimiento celular e interrumpir varios procesos metabólicos. Estos residuos producen alteraciones en las células adiposas lo cual podría ser una base para alguna evidencia clínica de reacciones citotóxicas y alérgicas.

Por otro lado, el ciclo de polimerización y los tratamientos de post-polimerización influyen sobre la citotoxicidad de las resinas de base de dentaduras, tal como lo mencionan Jorge JH y cols.<sup>45</sup> en un estudio in vitro sobre una población de células L929 para probar el LUCITONE® 550 y QC 20, donde concluyen que el ciclo largo de polimerización incrementa la

citotoxicidad de éstos materiales y que el baño de agua como tratamiento post-polimerización reduce la citotoxicidad de LUCITONE® 550 y QC 20 que hayan sido polimerizados con el ciclo largo.

Kedjarune y cols.<sup>46</sup> mencionan que cuanto más monómero sea agregado a la mezcla, más grande será la cantidad de monómero residual y, por lo tanto, el potencial de citotoxicidad.

Además se ha comprobado que el pH es un factor que puede influir en las cantidades de residuos citotóxicos que liberan las bases de resinas acrílicas.<sup>47</sup>

Huang y cols.<sup>48</sup> realizaron un estudio para determinar la citocompatibilidad de tres diferentes extractos de bases de dentaduras y compararon los efectos citotóxicos de estos materiales sobre una línea de células epiteliales orales humanas KB y de fibroblastos primarios de la mucosa oral humana. La citotoxicidad fue juzgada mediante la prueba de reducción de bromuro de tetrazolium. Las tres resinas (autocurado, curado con calor y curado con luz) fueron citotóxicas en fibroblastos primarios y en células epiteliales humanas, siendo más citotóxicas las de autopolimerizado y las fotopolimerizables, las menos citotóxicas.

Este mismo hallazgo lo encontraron Melilli y cols.<sup>49</sup> en un estudio in vitro para evaluar la citotoxicidad de cuatro resinas sobre fibroblastos de la cepa BALB/C, en el que también las resinas de autopolimerizado son las que muestran la mayor citotoxicidad, mientras que las de curado con luz son las que muestran una óptima biocompatibilidad debido a la ausencia de monómero libre de sus componentes químicos.

En otro trabajo se evaluó el potencial de inducir apoptosis y necrosis por bases de resinas de autopolimerizado y de polimerizado por calor sobre células monoblastoides humanas y, al igual que Huang y cols.<sup>48</sup>, concluyeron que las de autopolimerizado producen una mayor cantidad de muerte celular en comparación con las de polimerizado con calor y que la citotoxicidad dependía de la dosis y del tiempo de exposición.<sup>50</sup>

Lo anterior lo confirma también una revisión bibliográfica acerca de la citotoxicidad de las resinas base de dentaduras donde se concluye que los efectos citotóxicos de resinas acrílicas de base de dentaduras pueden estar relacionadas con el tiempo de almacenamiento, el método de polimerización, el radio del polvo al líquido y el ciclo de polimerización. El monómero residual resultado de la incompleta conversión de monómeros a polímeros tiene un alto potencial de causar irritación, inflamación y reacciones alérgicas en la mucosa oral. Las resinas acrílicas polimerizadas por irradiación con microondas son las menos citotóxicas y el almacenamiento en agua de las prótesis fabricadas con resinas acrílicas puede reducir el nivel de monómero residual resultando en un menos grado de citotoxicidad.<sup>51</sup>

Jorge JH y cols.<sup>52</sup> demostraron en un estudio in vitro que los tratamientos de

postpolimerización, ya sea por microondas o por baños en agua, no influyen sobre la citotoxicidad de las resinas acrílicas, lo cual también fue confirmado por otros trabajos donde se evaluaba si los tratamientos de postpolimerización reducían la citotoxicidad de diferentes resinas de bases de dentaduras.<sup>53,54</sup>

Lai y cols.<sup>55</sup> realizaron un estudio in vitro utilizando fibroblastos, ya que éstas células constituyen el tipo de célula residente del tejido conjuntivo más abundante, donde demuestran que las formas líquidas de los polímeros de base de dentaduras así como sus monómeros causan reacciones citotóxicas.

Por otra parte en otro trabajo donde se investigó la citotoxicidad de resinas para bases de prótesis bucales se encontró que las activadas químicamente son más citotóxicas, seguidas de las activadas con calor y las activadas con microondas.<sup>56</sup>

En otro estudio se demostró que el contacto de fibroblastos con superficies de polímeros de metacrilato sin polimerizar reduce la viabilidad de éstas células de la misma manera que ocurre con sus residuos.<sup>57</sup>

Es posible optimizar el nivel de monómero residual y mantener una baja citotoxicidad si logramos una apropiada selección del poder y tiempo de curado de la resina, manteniendo al mismo tiempo las mejores propiedades mecánicas.<sup>58</sup>

También se pueden utilizar materiales que protegen a las células de los efectos tóxicos de las resinas para prótesis como sellantes, los cuales parecen disminuir la toxicidad de resinas polimerizadas con luz, según un estudio para evaluar la citotoxicidad de éstos materiales sobre células epiteliales bucales.<sup>59</sup>

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo III

## Justificación

**E**l empleo de materiales para placas removibles como VALPLAST®, LUCITONE®, acrílico y polipropileno es indispensable para devolver a los pacientes la funcionalidad, estética y anatomía bucal.

El odontólogo tiene la responsabilidad de elegir el material más adecuado para la elaboración de éstos aparatos según el caso clínico, tomando en cuenta las propiedades que cada material ofrece. Algunas de las propiedades que deben poseer son: dureza, estabilidad de color, elasticidad y superficie homogénea. Además, una propiedad de especial importancia es la biocompatibilidad, dado que estos materiales tendrán contacto íntimo con la mucosa bucal. En la práctica clínica, se requiere conocer cuál de los materiales que se utilizan actualmente para realizar prótesis removibles es más biocompatible y, por lo tanto, cuál de éstos materiales posee mejores características para ser colocado en la boca de los pacientes.

En la actualidad, no disponemos de estudios in vivo en los que se evalúe la biocompatibilidad de éstos materiales. En este estudio se pretende investigar la biocompatibilidad de VALPLAST®, LUCITONE®, acrílico y polipropileno mediante la detección in situ de citocinas y quimiocinas y presencia de células (CD8 y CD14).

Los resultados nos permitirán conocer cuál de éstos materiales es el más aceptado por el organismo; de ésta manera, los odontólogos tendríamos más armas para elegir el material protésico, obviamente tomando en consideración también el resto de sus propiedades para ofrecer un servicio de mejor calidad a nuestros pacientes.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.





# Capítulo IV

## Objetivos

**L**os Objetivos planteados para este trabajo de investigación son los siguientes:

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la biocompatibilidad de materiales de prótesis dentales (acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y polipropileno), mediante un análisis en la expresión de quimiocinas (RANTES Y MIP3), citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF alfa) y células del sistema inmune (linfocitos T CD8 y macrófagos CD14).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la histopatología en tejido subcutáneo del ratón después de la inoculación de acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y polipropileno.
- Investigar el efecto de acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y polipropileno sobre linfocitos citotóxicos (CD8) y macrófagos (CD14).
- Descifrar el efecto de acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y polipropileno sobre quimiocinas MIP3 y RANTES.
- Averiguar el efecto de acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y polipropileno sobre las citocinas IL-1  $\beta$ , IL-6 y TNF alfa.

# Tesis Doctoral

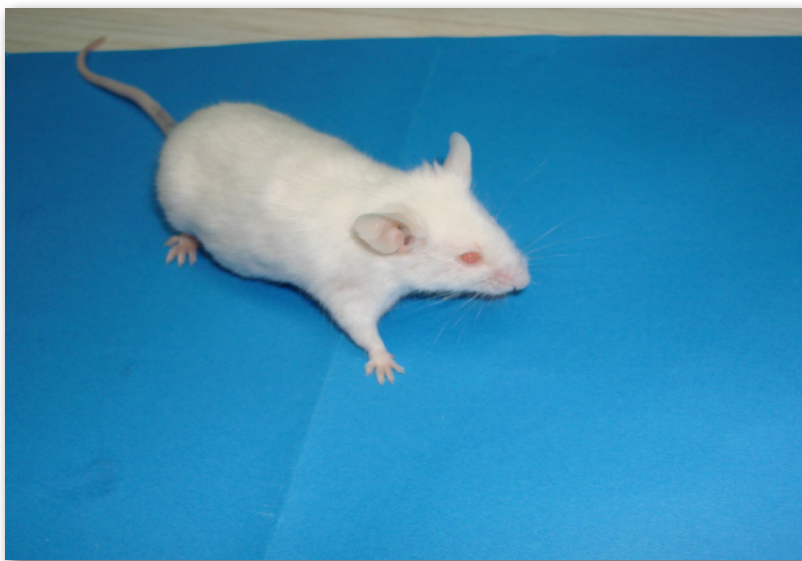
Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo V

## Material y métodos

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/C (Fig.1) del bioterio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL. Todos los procedimientos realizados en los ratones fueron acordes a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.



**Fig. 1.** Ratón de la cepa BALB/C

### **Criterios de Inclusión y de Exclusión.**

Se realizaron 5 grupos de 12 ratones cada uno; 4 grupos fueron experimentales y un quinto grupo actuó como grupo control. En total, por lo tanto, se utilizaron 60 ratones.

- El grupo A corresponde a ratones inoculados con LUCITONE®.
- El grupo B corresponde a ratones inoculados con VALPLAST®.
- El grupo C corresponde a ratones inoculados con polipropileno.
- El grupo D corresponde a ratones inoculados con acrílico.
- El grupo testigo fueron ratones a los que solamente se les realizó la incisión y posteriormente se les colocó un punto de sutura.

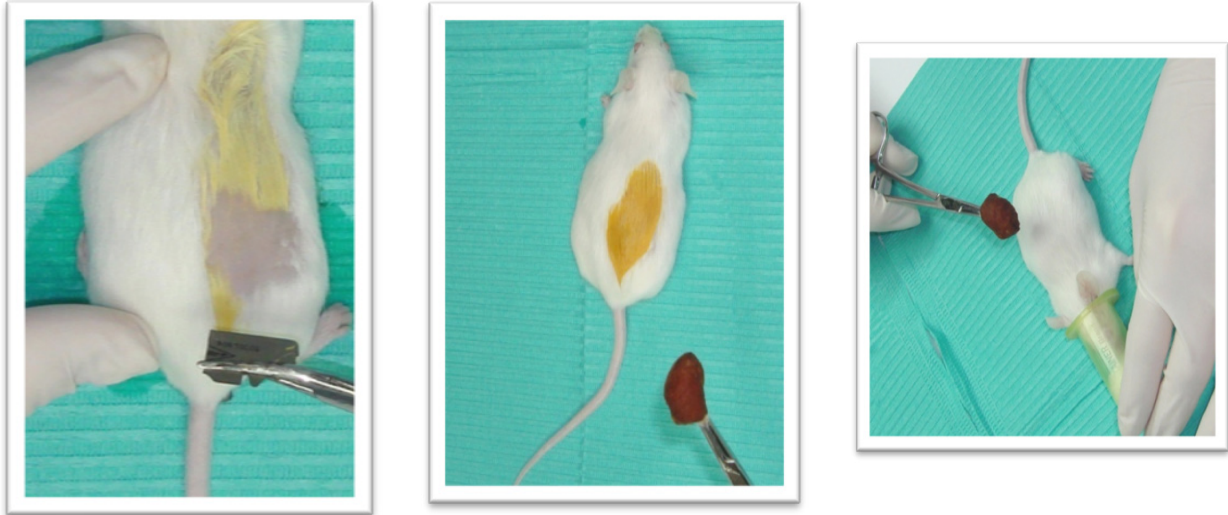
Todos los ratones fueron sometidos a anestesia de corta duración inhalada con éter (Éter etílico, Industrias Monfel S.A. de C.V. en San Luis Potosí México), utilizando una cámara de inhalación de vidrio (de la Industria Mofel S.A. de C.V, en San Luis Potosí México), como se muestra en la Fig. 2 y en la Fig. 3.



**Fig.2.** Cámara de inhalación e instrumental.



**Fig.3.** Impregnación de anestesia a una torunda de algodón de 15x20 y se coloca en la cámara de inhalación donde se introduce al animal.



Se realizó acción de antisepsia con Isodine (Yodo en espuma, Iodopovidona, Colombia, Laboratorio Boehringer, Ingelheim, Promeco) en el área a inocular. Con una navaja de un solo filo se rasuró un área de aproximadamente 1.5 cm<sup>2</sup>, a nivel de las vértebras dorsales del lado derecho. Como se muestra en la Fig. 4.

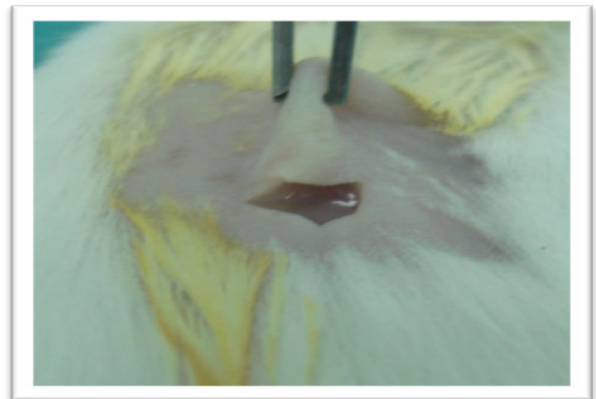
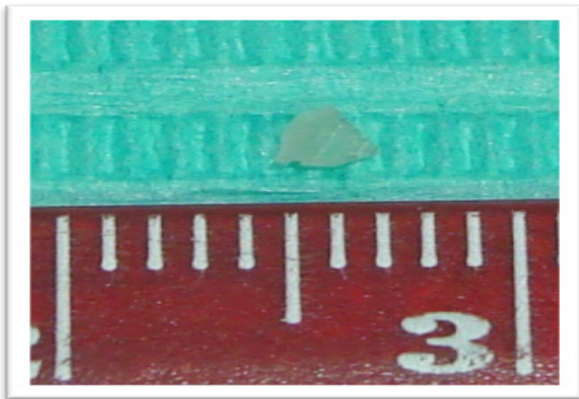


**Fig. 4.** Procedimiento de preparación para la inoculación

Con unas tijeras se realizó una incisión de aproximadamente 5 mm de longitud. Con las mismas tijeras se debridó el tejido subcutáneo (Fig.5) para posteriormente introducir la muestra, la cual midió 1.5 mm<sup>2</sup> aproximadamente. (Fig. 6)



**Fig. 5.** Incisión de la zona dorsal del animal de experimentación



**Fig. 6.** Vista de la incisión y del inóculo de material problema.

### **LUCITONE®**

Se utilizó el LUCITONE® (FRS de la casa comercial Dentsply, D.F. México). Este material ya viene preparado según las recomendaciones del fabricante y se adquiere en presentación de pelets los cuales son fundidos a una temperatura de 300° C durante 22 minutos. Luego fue inyectado en moldes rectangulares de 5cm X 5 cm X 1,5 mm y, una vez fraguado, con una hoja de bisturí del n° 20 se obtuvieron las muestras de aproximadamente 1,5 mm<sup>2</sup>.

### **VALPLAST®**

Se utilizó VALPLAST® (de la compañía International Corp. Long Island, New York). Este material es un nylon que se adquiere en presentación de tubos los cuales son fundidos a una temperatura de 300° C durante 11 minutos para posteriormente ser inyectados en moldes de 5 cm X 5 cm X 1,5 mm. Una vez fraguado, con una hoja de bisturí del n° 20 se obtuvieron las muestras de aproximadamente 1,5 mm<sup>2</sup>.

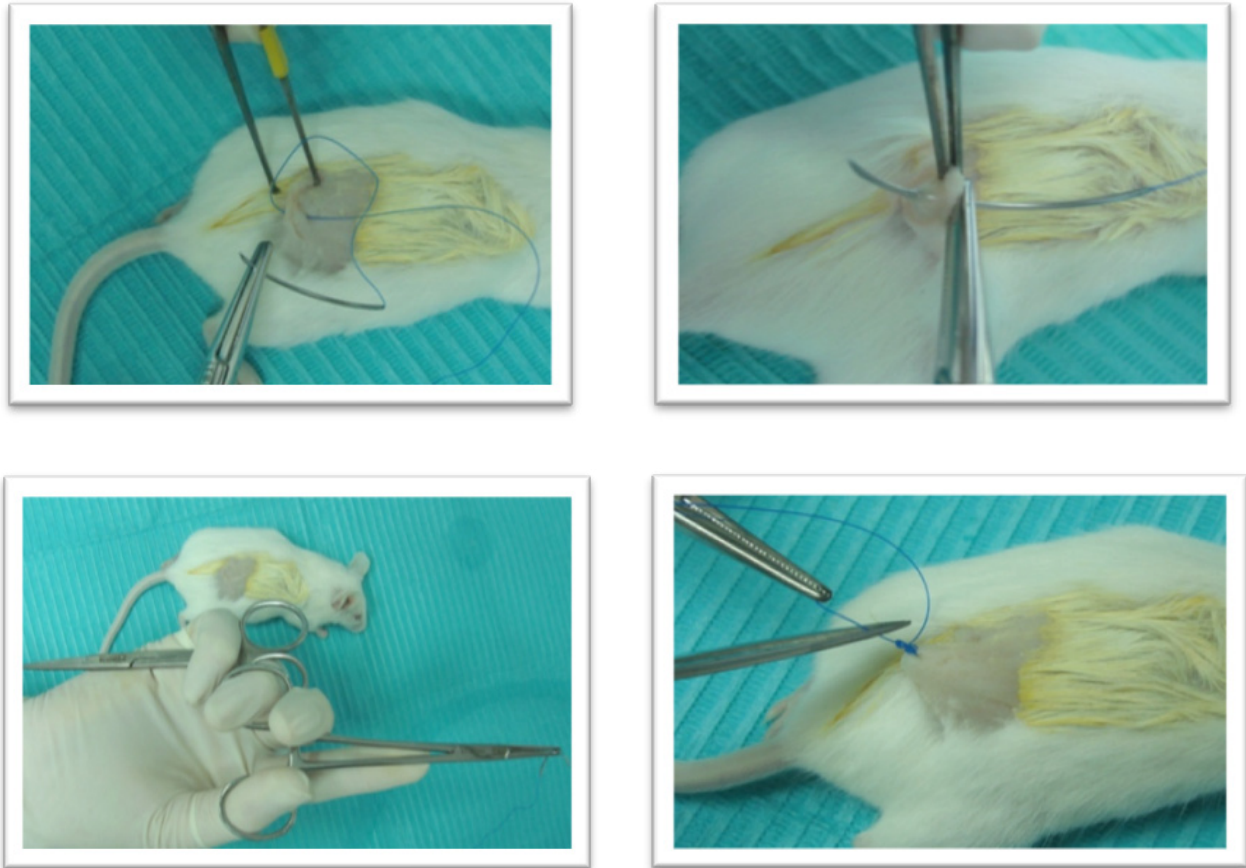
### **Acrílico**

Se utilizó acrílico (de la marca Nic Tone de la casa comercial MDC Dental, Zapopan Jalisco, México), mezclando 30 gr de polímero y 10 ml de monómero, según las proporciones por el fabricante. El método de polimerización utilizado fue por calor. Se colocó el molde de 5cm X 5 cm X 1,5 mm en una mufla, la cual se introdujo en un recipiente con agua. La temperatura del agua durante la primera hora fue de 50° C, durante la segunda hora se fue aumentando la temperatura progresivamente hasta llegar a 80°C, mientras que durante la 3ª hora se mantuvo la temperatura de 80° C. Después del cocido del acrílico, con una hoja de bisturí n° 20 se obtuvieron las muestras de aproximadamente 1,5 mm<sup>2</sup>.

### **Polipropileno**

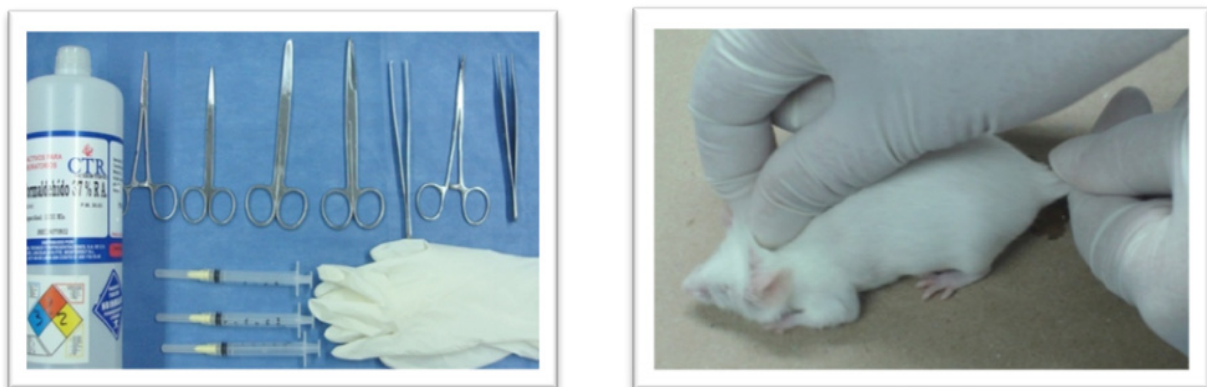
Se utilizó el material polipropileno (de la casa comercial Indelpro, Monterrey N.. México) esta poliamida se distribuye ya preparada para fundirse. Se fusiona a la temperatura de 250°C durante 14 minutos para luego ser inyectada en moldes de 5cm X 5 cm X 1,5 mm. Posteriormente con una hoja de bisturí n° 20 se obtuvieron las muestras de aproximadamente 1,5 mm<sup>2</sup>.

Con hilo de polipropileno para sutura del n° 3-0 (Ethicon, Johnson and Johnson, Brasil) se colocó un punto de sutura de cirujano como se muestra en la Fig.7.



**Fig.7.** Sutura de la incisión tras la inoculación del material de experimentación.

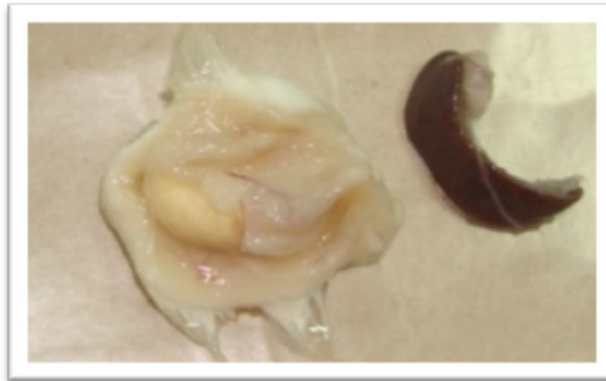
4 ratones de cada grupo fueron sacrificados mediante la técnica de dislocación cervical a las 12 horas, 24 horas y 7 días, siendo en total 20 ratones en cada uno de los tiempos, 16 de los cuales pertenecen a los grupos experimentales y 4 al grupo testigo. (Fig. 8)



**Fig. 8.** Instrumental y sacrificio del animal de experimentación



Con un bisturí se obtuvieron muestras de tejido de aproximadamente 1 cm del tejido subcutáneo donde estaba la muestra. Además se obtuvo el bazo, el cual se colocó junto con la piel como un control positivo (Fig. 9)



**Fig 9.** Controles positivos: muestras de piel y bazo.

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.

Una vez fijadas las muestras se llevó a cabo la deshidratación del tejido colocándolo en soluciones alcohólicas en concentraciones crecientes desde 50% hasta 100%, seguida por el aclarado, que consiste en colocar la muestra en xileno (Hycel de Labequim, Puebla México) dos veces; el tejido debe estar en cada solución aproximadamente 5 minutos.

El siguiente paso de la técnica histológica fue la inclusión, que consiste en impregnar el tejido en bloques de parafina para que tenga solidez y pueda ser cortado. En la Fig.10 se muestra el taco histológico.



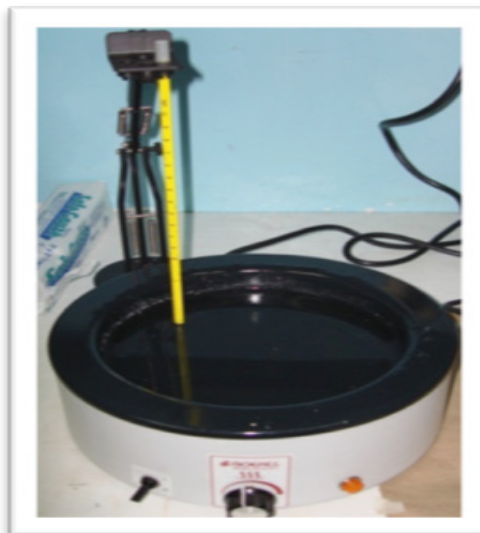
**Fig. 10.** Inclusión de las muestras de tejidos

La microtomía fue el siguiente paso y consiste en obtener cortes histológicos de las muestras de un grosor de 7  $\mu\text{m}$ , con un micrótopo de Minot (Fig.11) de cuchilla fija y platina móvil (modelo RM2145 de la marca Leica de laboratorio Labequim S.A. de C.V. Puebla México)



**Fig. 11.** Microtómo de Minot

Con el fin de lograr que el tejido se extienda, los cortes se colocaron en el baño María (Fig. 12) a una temperatura aproximada de 45°C. Los cortes histológicos se colocaron en portaobjetos de corte diamantado (Modesa, Laboratorios Labequim, Puebla, México) a los cuáles se les colocó previamente fijador de albúmina de Meyer (Hycel, Laboratorios Labequim, Puebla, México)



**Fig. 12.** Los cortes se introdujeron en un baño a 45°C para permitir la extensión del tejido tras su corte.

Enseguida, los cortes se colocaron 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.

Después, los cortes fueron procesados mediante la técnica de inmunohistoquímica. El primer paso es desparafinar el tejido; para ello, los especímenes se colocan 2 veces en recipientes con xileno durante 10 minutos. Después se llevó a cabo la hidratación que consistió en sumergir los tejidos en soluciones alcohólicas en grado decreciente hasta llegar a solución Buffer (solución buffer con salina, Hycel Labequim, Puebla, México) de pH 7.2 – 7.4.

A continuación, los cortes se colocaron en metanol con peróxido de hidrógeno al 0.3% (Hycel, Laboratorios Labequim, Puebla, México) durante 20 minutos, con la finalidad de eliminar la peroxidasa endógena del tejido. Después de ser enjuagados en solución Buffer (Fig. 13) durante 5 minutos, las preparaciones se colocaron en unas cámaras húmedas para, posteriormente, introducir en ellas el primer anticuerpo a una dilución 1:300 en Buffer, incubándose durante 12 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos policlonales (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) en contra de mouse IL-6 (sc-1265 goat), mouse IL-1 $\beta$  (sc-1252 goat), mouse TNF alfa (sc-52618 rat), mouse MIP3 (sc-9778 goat), mouse RANTES (sc-1410 goat), mouse linfocitos T CD8 (sc-69653 rat) y mouse macrófagos CD 14 (sc-699 goat).



**Fig 13.** Baños de solución buffer.

Transcurridas 12 horas, las laminillas se enjuagaron en solución buffer 2 veces y se les colocó el segundo anticuerpo policlonal Donkey anti-goat IgG, F(ab')<sub>2</sub> conjugado con peroxidasa [HRP]; sc3851 y goat anti-rat IgG, F(ab)<sub>2</sub> conjugado con peroxidasa [HRP]; sc-3823. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron los especímenes nuevamente.

La peroxidasa fue visualizada al colocar los especímenes en una solución de diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB, Sigma, USA) en Buffer conteniendo 0.04% de peróxido de hidrógeno.

Después de enjuagar las laminillas y para dar contraste a las estructuras de los tejidos, las preparaciones se colocaron en hematoxilina de Harris (Merck de laboratorio Laberquim, Puebla, México) durante 5 minutos.

Después de lavarlas 2 veces, las laminillas se deshidrataron colocándolas en soluciones alcohólicas en concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol al 100% y después se colocaron en xileno 2 veces, para posteriormente ser montadas con resina Entellan ( Merck, Laboratorio Laberquim, Puebla, México)

### **Análisis morfométrico**

Cada una de las laminillas se observó al microscopio óptico de campo claro con una magnificación de 400x (ocular de 10x, el objetivo de 40x y factor de tubo 1x). Se cuantificó la cantidad de células inmunoreactivas contra los anticuerpos IL-6, IL-1  $\beta$ , TNF alfa, MIP3, RANTES, linfocitos T CD8 y macrófagos (CD 14) en 5 campos (tomados al azar), en cada una de las regiones, es decir, de la epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso de alrededor del material inoculado.

Los controles negativos incluyeron la omisión del anticuerpo primario, absorción líquido-fase con el antígeno homólogo (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) y el uso de suero no inmune. Así también, en cada uno de los preparados se incluyó una sección de bazo como testigo positivo de la tinción.

### **Ficha de Recogida de datos**

Se confeccionó una base de datos que se adjunta en el anexo 1. Se utilizaron las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León así como las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud en el Laboratorio de Odontología de la misma Universidad.

### **Método Estadístico**

Una vez obtenidos los datos del análisis morfométrico se realizó una estadística descriptiva (media aritmética y desviación estándar) como medida de variabilidad para indicar la dispersión de los datos.

También se realizó una estadística analítica, mediante Análisis de Varianza (ANOVA), para evaluar las diferencias en la expresión de marcadores inflamatorios en los distintos tejidos entre los cuatro materiales utilizados para la fabricación de prótesis dentales y, en caso de significación, se aplicaron los correspondientes contrastes post-hoc. Finalmente, la prueba de t de Student, permitió realizar la comparación por pares de los recuentos promedio obtenidos, a igualdad de tejido, entre los distintos tiempos de demora.

Se obtuvo el número de células inmunoreactivas para cada anticuerpo (CD8, CD14, MIP3, RANTES, IL-1  $\beta$ , IL-6 y TNF alfa), recogiendo este dato para cada tejido expuesto a los materiales (Epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso) y para cada uno de los tiempos estudiados (12 horas, 24 horas y 7 días). Ver tablas y gráficas en la sección Resultados.

Los datos fueron analizados por medio del programa SPSS. Se consideró significativo todo valor de  $p < 0.05$

# Tesis Doctoral

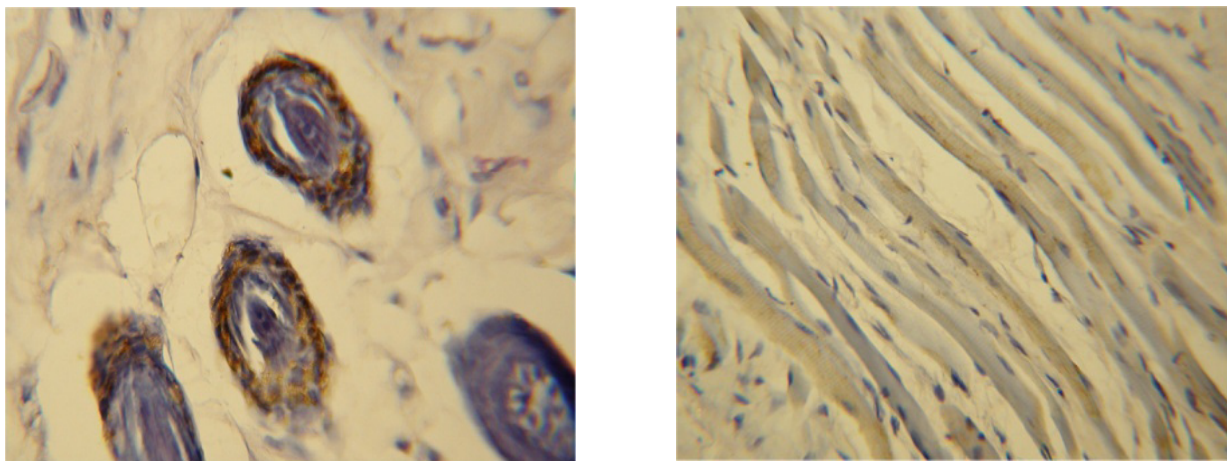
Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo VI

## Resultados

Una vez obtenidas las muestras de los ratones sacrificados a las 12 horas de haberseles inyectado LUCITONE®, se encontró (tabla 1 y figura 14 y 15) en la epidermis un promedio de 3.33 ( $\pm 1.77$ ) células marcadas a IL-6; en dermis, se presentaron CD8 positivos de manera moderada de células por campo óptico. Para IL-1 $\beta$  se encontró un recuento promedio de 10.67 con una desviación estándar de 1.15. El recuento promedio de marcadores positivos para IL-6 fue elevado, mientras que para TNF alfa puede calificarse de moderado. El tejido inflamatorio encontrado en las muestras obtenidas a 12 horas mostraban la presencia de 4.84 a 7.83 linfocitos CD8, de 4.61 a 6.73 macrófagos CD14; también se observó una presencia moderada de proteínas Inflamatorias de MIP3, de quimiocinas RANTES (3.10 a 4.23). IL-1 $\beta$  e IL-6 demostraron una concentración leve o moderada, así como el TNF alfa. En el tejido muscular se encontró la presencia leve de quimiocinas MIP3, y elevada de IL-1 $\beta$  e IL-6. En folículos pilosos se encontró un promedio de 3.67  $\pm$  1.53 MIP3, un promedio de IL-1 $\beta$  18.67 con una D.S. de  $\pm$  1.15, de IL-6 en promedio se encontró 14.00  $\pm$  1.73.



**Fig. 14** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con LUCITONE® sacrificados a las 12 horas. Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6. Y células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

**Tabla 1.** Medias y Desviación estándar para el LUCITONE® a las 12 horas con todos los marcadores.

LUCITONE®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 β		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
12 Horas															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	1.77	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	5.67	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.67	1.15	13.00	3.00	8.67	1.15	p<0.05
Tejido Inflamatorio	6.33	1.53	5.67	1.08	7.00	1.00	3.67	0.58	11.67	2.89	12.33	2.52	8.67	1.15	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.58	0.00	0.00	18.00	0.00	14.00	1.29	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	3.67	1.53	0.00	0.00	18.67	1.15	14.00	1.73	0.00	0.00	p<0.05

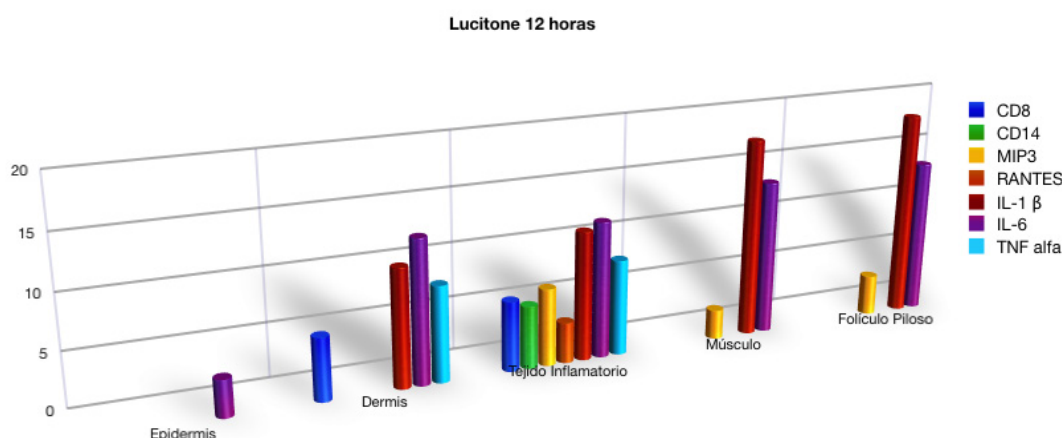


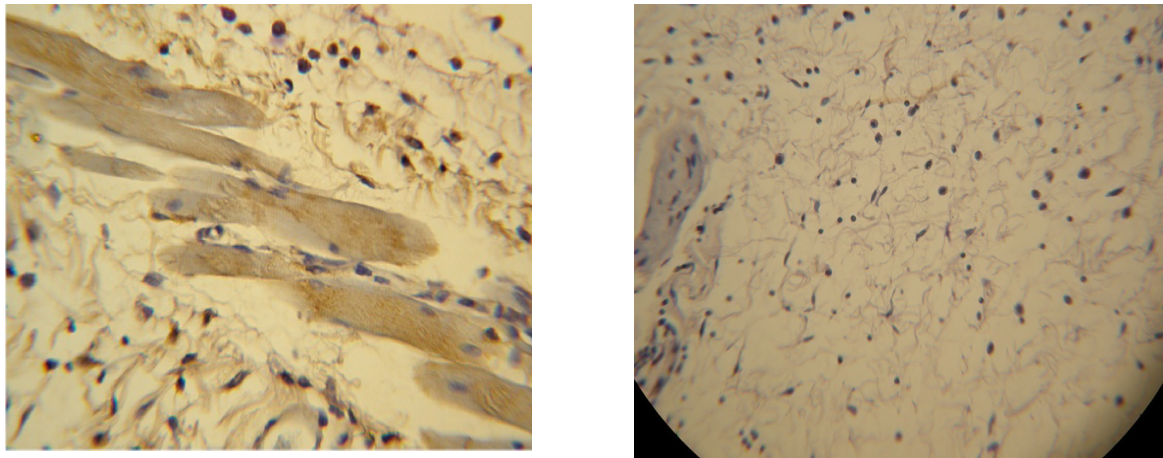
Fig. 15. Grupo experimental: LUCITONE®, 12 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

Para comparar la cantidad de marcadores inflamatorios encontrados en cada uno de los tejidos (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso, tras 12 horas de la inoculación con LUCITONE®, se utilizó el test de ANOVA; en epidermis se obtuvieron diferencias significativas sólo para IL-6 y TNF alfa ( $p < 0.05$ ); en dermis, para CD8, IL-1β, IL-6 y TNF alfa ( $p < 0.05$ ); en el tejido inflamatorio producido tras las 12 horas de inoculación se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la presencia de todos los marcadores inflamatorios; en el tejido muscular y en el folículo piloso se encontraron diferencias significativas para la presencia de MIP3, IL-1β y en IL-6 ( $p < 0.05$ ).

Se sacrificó un segundo grupo de ratones a las 24 horas de la inoculación de LUCITONE® para cuantificar la cantidad presente de citocinas y quimiocinas inflamatorias presentes en los epidermis, dermis, tejido Inflamatorio, músculo y folículo piloso, obteniéndose como resultados que (tabla 2 y fig. 17) en epidermis no se encontró ningún marcador inflamatorio (CD8, CD14, MIP3, RANTES, IL-1β, IL-6 y TNF alfa); en dermis se cuantificó la presencia de IL-1β en  $9.5 \pm 0.78$ , así como de IL-6 en  $19.0 \pm 1.00$ ; en el tejido inflamatorio formado tras 24



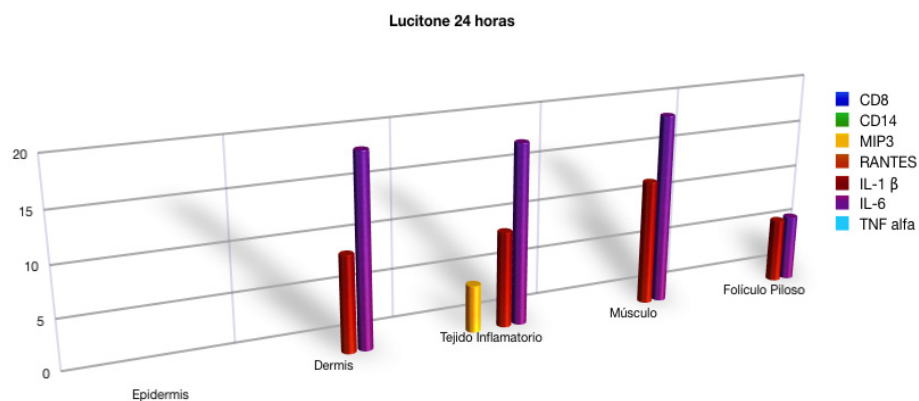
horas se encontró presencia de MIP3 en 4.67, de IL-1 $\beta$  en 9.5 y de IL-6 de 18.00. En el músculo se encontró IL-1 $\beta$  en 12.50 y el recuento de IL-6 fue de 19.00. En el folículo piloso se encontró IL-1 $\beta$  en 6.50 células y de IL-6 en 6.67.



**Fig. 16.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con LUCITONE® sacrificados a las 24 horas. Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo con el anticuerpo anti IL-1 $\beta$ . Células en tejido conjuntivo y musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

**Tabla 2.** Medias y Desviación estándar de marcadores positivos para el LUCITONE® a las 24 horas.

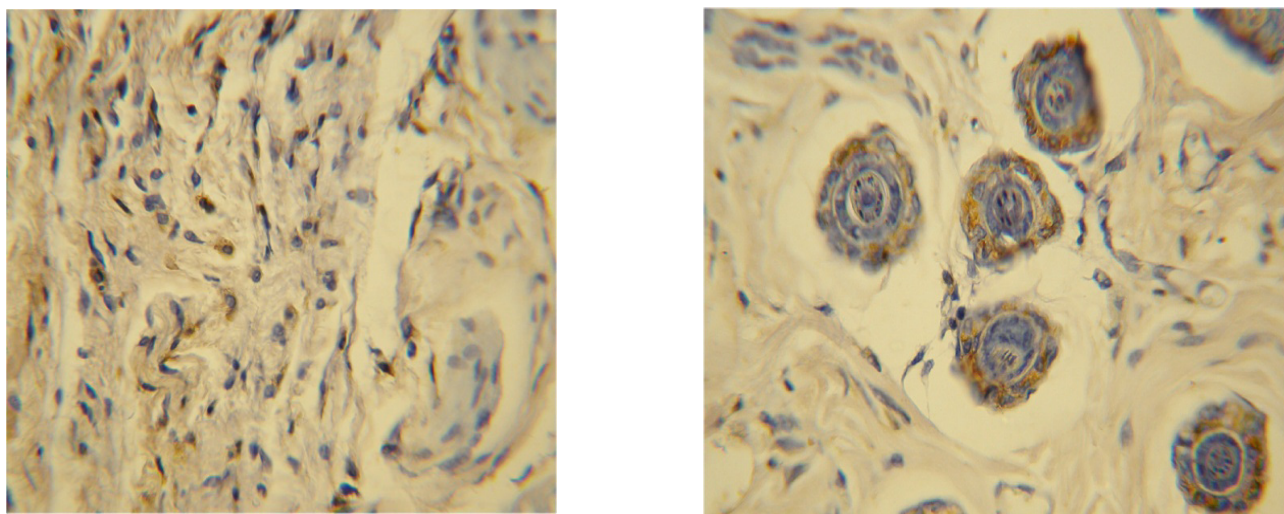
LUCITONE®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
24 Horas	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.50	0.78	19.00	1.00	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	0.00	4.67	0.58	0.00	0.00	9.50	1.78	18.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50	1.54	19.00	1.00	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.50	1.19	6.67	1.55	0.00	0.00	p<0.05



**Fig. 17.** Grupo experimental: LUCITONE®, 24 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

Como en el subgrupo anterior, Se prosiguió con el análisis comparativo de los promedios obtenidos para los marcadores inflamatorios en cada tejido de los ratones sacrificados a las 24 horas de la inoculación. En epidermis, no existieron diferencias significativas en la concentración de los marcadores inflamatorios utilizados ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en la dermis, IL-1 $\beta$ , IL-6 fueron significativamente más abundantes ( $p < 0.05$ ). En el tejido inflamatorio predominaron MIP3, IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p < 0.05$ ). En el músculo y folículo piloso, la presencia de IL 1 $\beta$  e IL-6 fue significativamente más frecuente que el resto de marcadores inflamatorios ( $p < 0.05$ ).

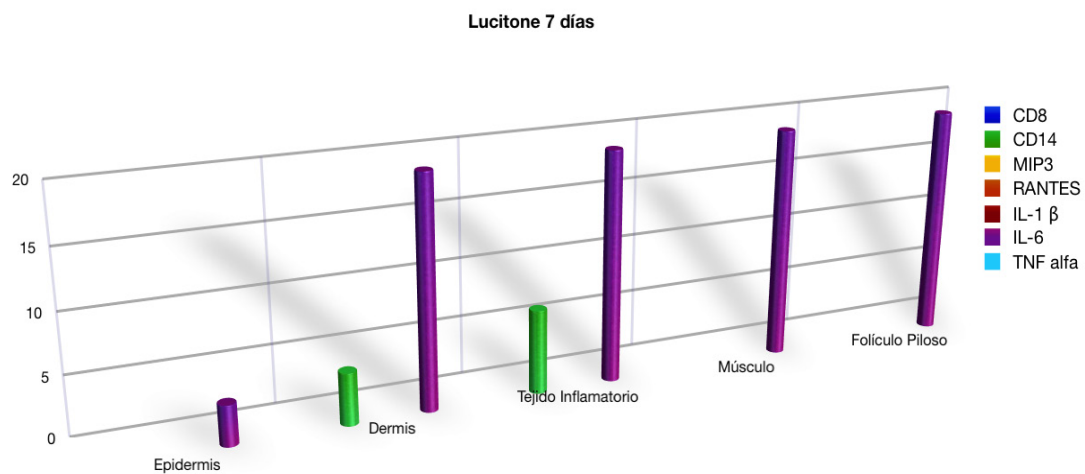
El tercer grupo de ratones se sacrificó 7 días después de la inoculación con LUCITONE®. (Ver Tabla 3 y gráfica de la fig. 18 y 19). En la epidermis se encontró solamente IL-6 con un promedio de  $3.33 \pm 0.89$  marcadores positivos; en dermis se observó la presencia de CD14 (media = 4.33; D.S = 0.58) y IL-6 (media = 19.33; D.S = 1.15). En el tejido inflamatorio presente en ese momento se encontraron en promedio  $7.00 \pm 1.00$  CD14, y IL-6, con un recuento promedio de  $19.33 \pm 1.15$ . En músculo y folículo piloso se encontró la presencia de IL-6 en ambos con una concentración de  $19.33 \pm 1.15$ ; dado el tiempo transcurrido desde la inoculación, ambos se consideraron como marcadores de inflamación crónica.



**Fig. 18.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con LUCITONE® sacrificados a los 7 días. **A** células inmunoreactivas en tejido conjuntivo con el anticuerpo anti IL-6. **B** Células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.

**Tabla 3.** Medias y Desviación estándar de recuentos positivos de todos los marcadores por tejido, a los 7 días de la inoculación de LUCITONE®.

LUCITONE®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1β		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
7 Días															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	4.33	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	1.15	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	7.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	1.15	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	1.15	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	1.15	0.00	0.00	p<0.05



**Fig. 19.** Grupo experimental: LUCITONE®, 7 días. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

Al comparar los marcadores presentes tras los siete días de inoculación con LUCITONE®, en este grupo de ratones, la presencia de positividad para epidermis fue significativamente mayor solo para IL-6 ( $p<0.05$ ). En dermis, los marcadores inflamatorios CD14 e IL-6 fueron significativamente más abundantes ( $p<0.05$ ); similares resultados se obtuvieron en tejido inflamatorio, mientras que en músculo y folículo piloso sólo se observó la presencia de positividad para IL-6 ( $p<0.05$ ).

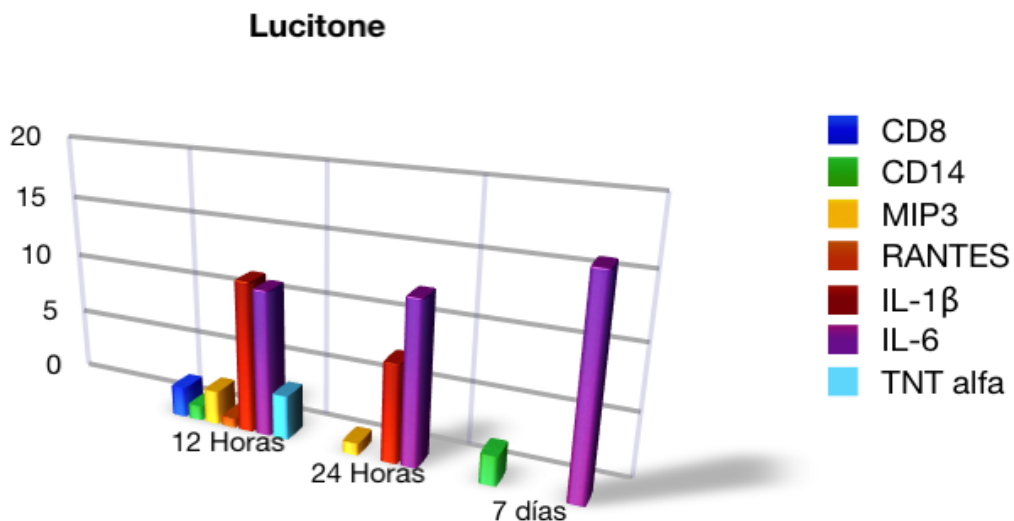
Al explorar, mediante el test t de Student, la existencia de diferencias en la concentración de cada uno de los marcadores en cada uno de los tejidos en función del tiempo tras la inoculación de LUCITONE®, se observó que (Tabla 4 y Fig. 20), entre las 12 horas y 24 horas, en dermis y tejido inflamatorio existían diferencias significativas en la presencia de CD8 ( $p<0.05$ ), así como en la de CD14 en tejido inflamatorio ( $p<0.05$ ). La quimiocina MIP3 fue significativamente más abundante en tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso ( $p<0.05$ ) a las 24 de la inoculación. RANTES demostró diferencias significativas en su concentración en

función del tiempo en tejido inflamatorio ( $p < 0.05$ ), mientras que IL-1 $\beta$  lo hizo en músculo y folículo piloso ( $p < 0.05$ ). Finalmente, la diferencia de concentración de IL-6 a las 12 y 24 horas fue significativa ( $p < 0.05$ ) en epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso.

Se utilizó el mismo test estadístico para detectar la existencia de diferencias significativas en la concentración de cada uno de los marcadores en los tejidos observados, tras inoculación de LUCITONE® de 24 horas y 7 días. Los resultados indican que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración de CD8, CD14, RANTES, TNF alfa entre estos tiempos de inoculación en ninguno de los tejidos estudiados (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). Sí se obtuvieron diferencias significativas para la concentración de quimiocinas MIP3 ( $p < 0.05$ ) entre las 24 horas y 7 días de inoculación pero solo en el tejido inflamatorio formado. La diferencia en la concentración de IL-1 $\beta$  fue significativa ( $p < 0.05$ ) en dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso entre los tiempos de inoculación de LUCITONE® de 24 horas y 7 días; también lo fue la diferencia de concentración de IL-6 en epidermis, tejido inflamatorio y folículo piloso.

**Tabla 4.** Expresión de células inmunoreactivas al LUCITONE® tanto en inflamación aguda como en la crónica. Promedios obtenidos para los anticuerpos utilizados como marcadores.

LUCITONE®	CD8	CD14	MIP3	RANTES	IL-1β	IL-6	TNF alfa
12 Horas	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00
Dermis	5.67	0.00	0.00	0.00	10.67	13.00	8.67
Tejido Inflamatorio	6.33	5.67	7.00	3.67	11.67	12.33	8.67
Músculo	0.00	0.00	2.67	0.00	18.00	14.00	0.00
Folículo Piloso	0.00	0.00	3.67	0.00	18.67	14.00	0.00
Promedio	2.40	1.13	2.67	0.73	11.80	11.33	3.47
LUCITONE®	CD8	CD14	MIP3	RANTES	IL-1β	IL-6	TNF alfa
24 Horas	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	9.50	19.00	0.00
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	4.67	0.00	9.50	18.00	0.00
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50	19.00	0.00
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	6.50	6.67	0.00
Promedio	0.00	0.00	0.93	0.00	7.60	12.53	0.00
LUCITONE®	CD8	CD14	MIP3	RANTES	IL-1β	IL-6	TNF alfa
7 Días	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00
Dermis	0.00	4.33	0.00	0.00	0.00	19.33	0.00
Tejido Inflamatorio	0.00	7.00	0.00	0.00	0.00	19.33	0.00
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	0.00
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.33	0.00
Promedio	0.00	2.27	0.00	0.00	0.00	16.13	0.00

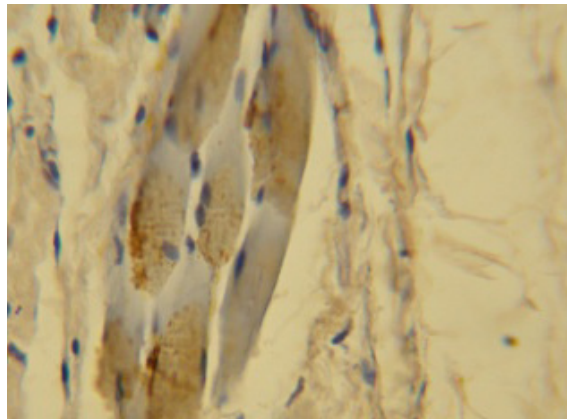


**Fig. 20.** Expresión de células inmunorreactivas al LUCITONE® tanto en inflamación aguda como crónica con los anticuerpos utilizados como marcadores positivos.

Por lo tanto, los tejidos que fueron inoculados con LUCITONE®, a las 12 horas presentaron células del sistema inmune en tejido inflamatorio y dermis, encontrándose CD8 en ambos tejidos y CD14 solo en tejido inflamatorio. Las quimiocinas MIP3 se encontraron en tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso, y la quimiocina RANTES solo se encontró en tejido inflamatorio. La máxima expresión fue de la citocina proinflamatoria IL-6 que aparece en todos los tejidos igual que la IL-1beta que aparece en todos los tejidos excepto en la epidermis. En cambio, el TNF alfa, solo apareció en tejido inflamatorio y dermis. En el análisis de la respuesta a las 12 horas a LUCITONE®, se observa que en el tejido inflamatorio se encuentran todos los marcadores estudiados y que en dermis se encontraron todos excepto CD14, MIP3 y RANTES. El análisis a las 24 horas se caracteriza por la desaparición de las células inmunes CD8 y CD14 y quimiocinas, encontrándose sólo se encontró MIP3, aunque disminuida. En este periodo la respuesta inflamatoria se caracterizó principalmente por la presencia de IL-1 $\beta$  e IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis. El análisis a los 7 días solo se caracteriza por la presencia de citocinas proinflamatorias, con un incremento de la IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis y con la desaparición de la IL-1 $\beta$ .

**VALPLAST®**

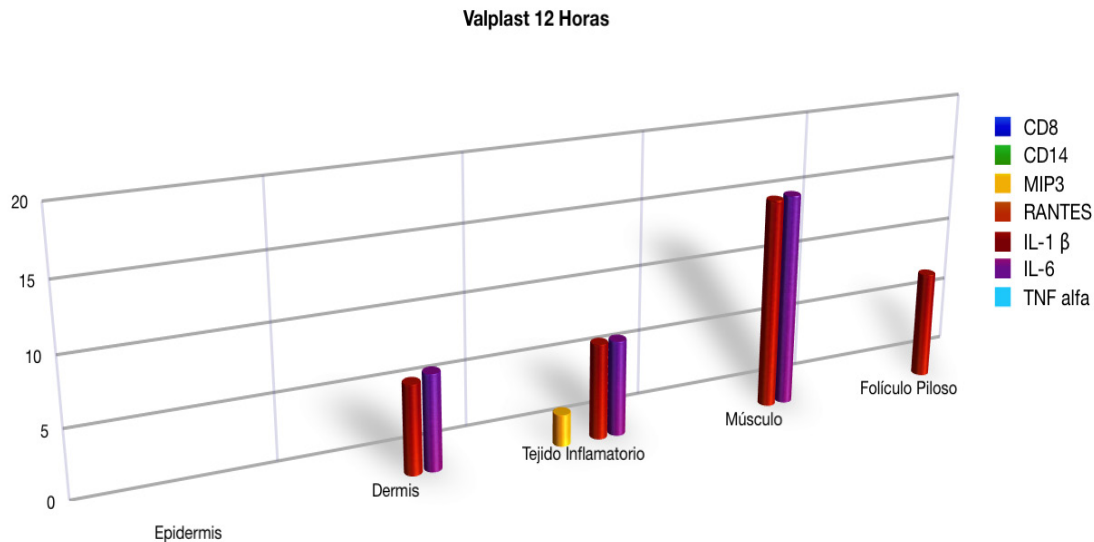
Se determinó la media y desviación estándar (D.S.) de los mismos marcadores del proceso inflamatorio CD8, CD14, MIP3, RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF alfa pero ahora en ratones a los que se les inoculó el material de VALPLAST®, obteniendo que (Ver Tabla No. 5 y fig. 21 y 22) en el grupo de ratones sacrificados a las 12 horas de la inoculación no se encontró presencia de CD8, CD14, RANTES y TNF alfa en ninguno de los tejidos observados (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). La expresión promedio de quimiocina MIP3 fue de  $2.33 \pm 0.58$  en el tejido inflamatorio. En los demás tejidos no se encontraron valores positivos para este marcador, mientras que para IL-1 $\beta$ , se encontró una expresión promedio de 6.50 células en dermis, 7.00 en tejido inflamatorio, 15.50 en músculo, mientras que fue de 8.00 en folículo piloso. Para IL-6, el número de células inmunorreactivas fue en promedio de 7.00 en dermis,  $7.00 \pm 1.73$  en el tejido inflamatorio formado,  $15.67 \pm 1.04$  en músculo. No se encontró presencia de IL-6 en folículo piloso.



**Fig. 21.** Fotomicrografía de biopsia de tejido subcutáneo de ratone inoculado con valplast sacrificados a las 12 horas. Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

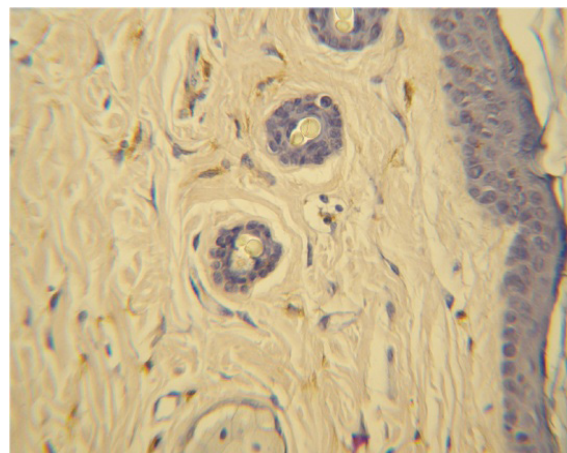
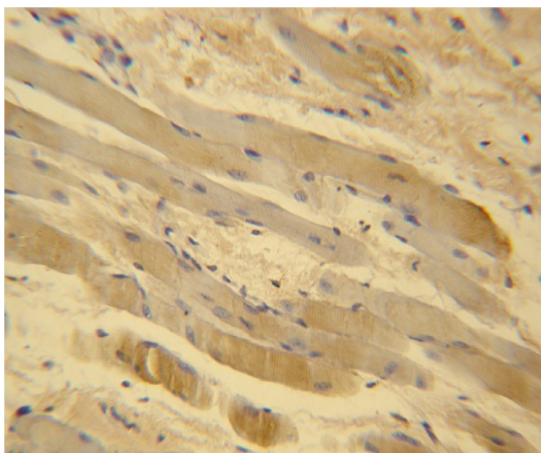
**Tabla 5.** Medias y Desviación estándar de recuentos positivos de marcadores inflamatorios a las 12 horas tras la inoculación de VALPLAST®.

VALPLAST®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
12 Horas	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.50	0.71	7.00	1.73	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	0.00	2.33	0.58	0.00	0.00	7.00	0.00	7.00	1.73	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.50	1.54	15.67	1.04	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.00	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05

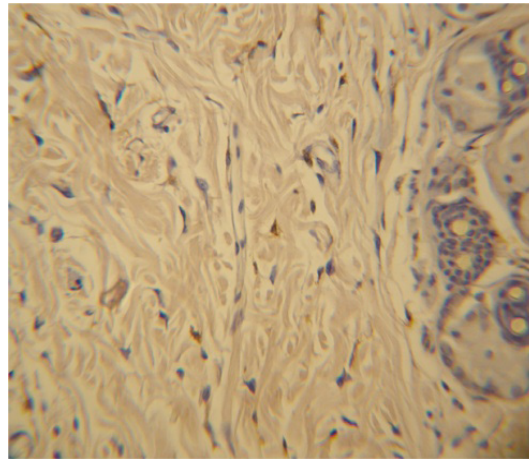


**Fig.22.** Grupo experimental: VALPLAST®, 12 h. Número promedio de células reactivas a cada marcador inflamatorio en los distintos tejidos inoculados.

Se procedió a examinar las muestras obtenidas de los ratones sacrificados tras las 24 horas de la inoculación encontrándose que (ver tabla 6 y fig. 23 y 24) en epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso no existía presencia alguna de CD8, CD14, MIP3, RANTES ni TNF alfa; Para IL-1 $\beta$  se encontró una reactividad promedio de 1.00 con una d.s. de 1.41 en epidermis; en dermis el promedio de este mediador de la inflamación fue de 10.00 en el tejido inflamatorio formado el promedio encontrado fue de 10.67, en músculo se encontró un promedio de  $10.00 \pm 2.00$  y en folículo piloso un promedio de 8.00. El otro marcador que si estaba presente en esta muestra, fue la IL-6 con un promedio de recuentos positivos de  $19.33 \pm 0.58$  en dermis, de 17.67 en tejido inflamatorio, en músculo la concentración promedio fue de 17.00 y, en folículo piloso, el promedio fue de 10.00, sin encontrarse este marcador en epidermis.



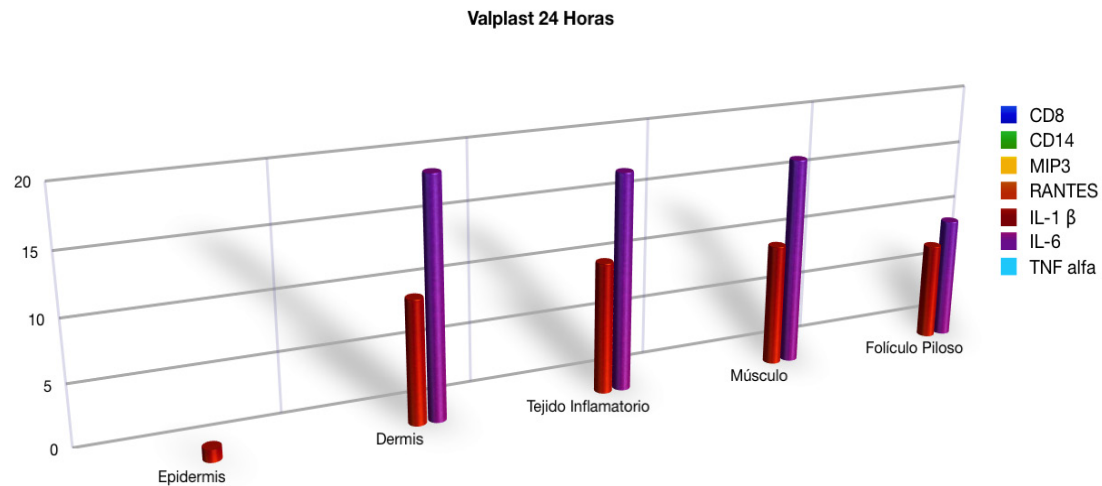




**Fig 23.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con VALPLAST® sacrificados a las 24 horas. Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo de la dermis con el anticuerpo anti IL-6. Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6.

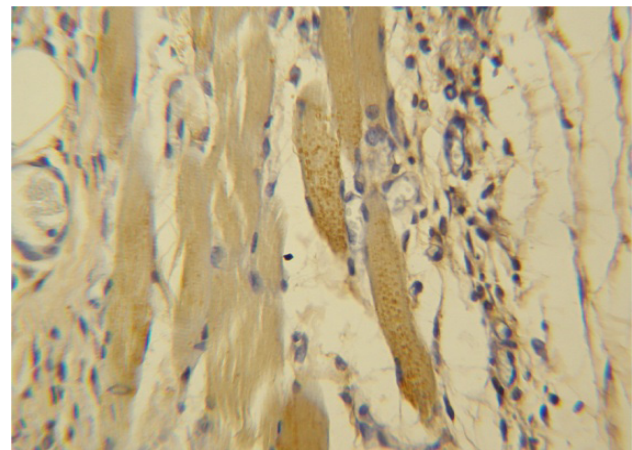
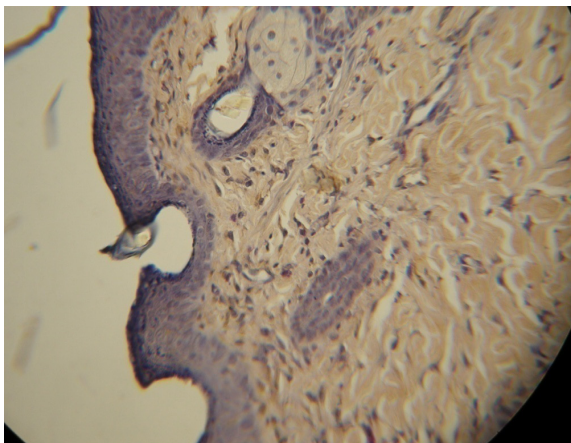
**Tabla No. 6** De Resultados donde se muestran las Medias y Desviación estándar para el VALPLAST® a las 24 horas con todos los marcadores.

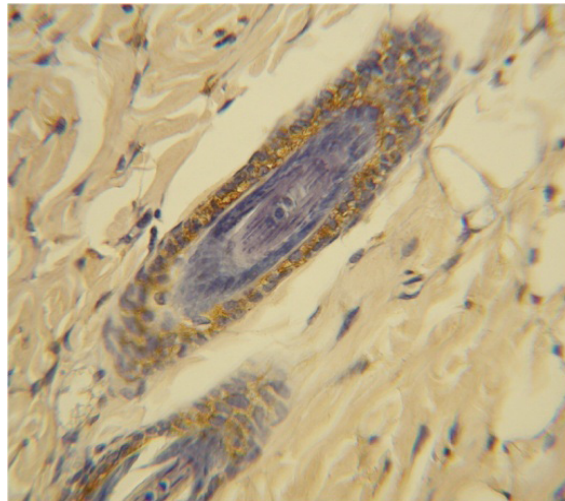
VALPLAST®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		Il-6		TNF - Alfa		
24 Horas	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Anova
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	1.24	19.33	0.58	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.67	1.13	17.67	1.52	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	2.00	17.00	1.73	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.00	0.00	10.00	1.66	0.00	0.00	p<0.05



**Fig 24.** Grupo experimental: VALPLAST®, 24 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

El último grupo de ratones a los que se les inoculó VALPLAST® fue sacrificado tras 7 días del procedimiento. (Ver Tabla 7 y fig. 25 y 26). No se encontró presencia de CD8, CD14, RANTES, IL-1 $\beta$  y TNF alfa; mientras que el promedio de células positivas para MIP3 en epidermis fue de 2.67 con una desviación estándar de  $\pm 0.52$ , en dermis fue de 8.33, en el tejido crónico inflamatorio fue de 5.67; en el tejido muscular y folículo piloso no se presentó MIP3. La IL-6 estuvo presente en esta muestra con un promedio de 4.67 positivos en epidermis, 20.00 en dermis, 19.67 en el tejido inflamatorio crónico, mientras que músculo fue de 6.00. No se encontró en folículo piloso.

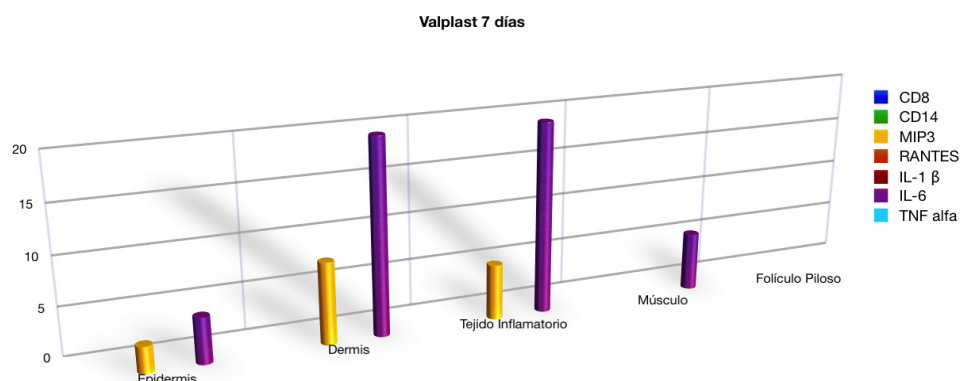




**Fig. 25.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con VALPLAST® sacrificados a los 7 días. Células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6. Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6. Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo de la dermis

**Tabla 7.** Promedio y desviación estándar de la expresión de marcadores inflamatorios tras 7 días tras la inoculación de VALPLAST® .

VALPLAST®	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1β		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
7 Días															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	4.67	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	8.33	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	0.00	5.67	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00	19.67	0.58	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00	1.29	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05



**Fig. 26.** Grupo experimental: VALPLAST®, 7 días. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

Se buscó establecer si existía diferencia significativa entre los marcadores inflamatorios presentes en cada tejido a las 12 horas de la inoculación con VALPLAST® mediante ANOVA de una vía. En epidermis, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los marcadores ( $p > 0.05$ ), mientras que en dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso sí se demostraron diferencias en la distribución de IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p < 0.05$ ), al igual que en tejido inflamatorio para MIP3 ( $p > 0.05$ ). Igual se procedió para determinar si existían diferencias en la distribución de los distintos marcadores por tejido examinado después de 24 horas tras la inoculación de VALPLAST®, encontrándose que no existían diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en epidermis para ningún marcador, mientras que sí existían en dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso para IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p < 0.05$ ).

El último grupo de ratones fueron sacrificados tras 7 días de haberseles inoculado el inserto de VALPLAST®. Sólo se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de MIP3 y de IL-6 ( $p < 0.05$ ) en epidermis, dermis y tejido inflamatorio y en músculo sólo para IL-6. No se obtuvieron diferencias significativas en la distribución de marcadores inflamatorios en folículo piloso ( $p > 0.05$ ).

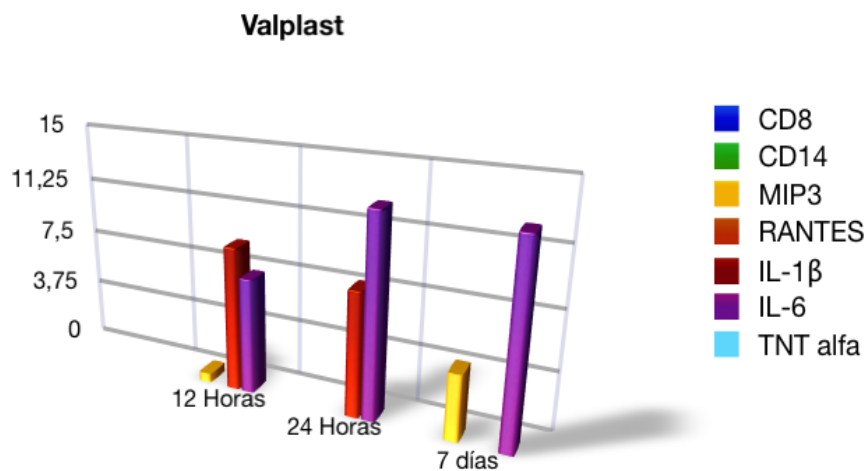
Al comparar las concentraciones de cada marcador en cada tejido (Tabla No.8), entre los distintos tiempos de observación tras la inoculación de VALPLAST®, se observó que los valores obtenidos a las 12 y 24 horas para los marcadores CD8 y CD14, RANTES y TNF alfa fueron similares, en todos los tejidos analizados. Para MIP3 sólo se obtuvieron diferencias significativas en tejido inflamatorio. Sin embargo, para IL-1 $\beta$  se obtuvieron diferencias significativas que indican un aumento del marcador en tejido inflamatorio y una disminución a disminución del marcador en epidermis, dermis y músculo en las muestras obtenidas a las 24 h respecto a las extraídas a las 12 horas de la inoculación. En folículo piloso, la cantidad de IL-1 $\beta$  permaneció estable en este periodo ( $p > 0.05$ ). Para el marcador IL-6 se obtuvo un aumento significativo a las 24 horas epidermis, tejido inflamatorio y folículo piloso, mientras que en epidermis y músculo permaneció con valores estadísticamente similares a los detectados en el grupo de animales sacrificados a las 12 horas de la inoculación ( $p > 0.05$ ).

En la comparación de la concentración de marcadores inflamatorios obtenidos 24 horas y 7 días tras la inoculación de VALPLAST®, se observan valores estables para CD8, CD14, RANTES y TNF alfa en todos los tejidos analizados, mientras que se aprecia un aumento significativo de MIP-3 en función del tiempo transcurrido, en epidermis, dermis y tejido inflamatorio, aunque no en músculo ni en folículo piloso ( $p > 0.05$ ). IL-1 $\beta$  disminuyó significativamente en dermis, tejido inflamatorio y músculo con el paso de los días. IL-6

aumentó significativamente entre las 24 horas y los 7 días tras inoculación en epidermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso, permaneciendo en valores similares en dermis, respecto a los obtenidos en este tejido a las 24 horas del inserto. (Tabla 8. Fig. 27).

**Tabla 8.** Expresión de células inmunorreactivas al VALPLAST® tanto en inflamación aguda como en la crónica (7 días) con los anticuerpos utilizados como marcadores positivos.

VALPLAST®	MIP3	IL-1β	IL-6
12 Horas	Media	Media	Media
Dermis	0.00	6.50	7.00
Tejido Inflamatorio	2.33	7.00	7.00
Músculo	0.00	15.50	15.67
Folículo Piloso	0.00	8.00	0.00
Promedio	0.58	9.25	7.42
VALPLAST®	MIP3	IL-1β	IL-6
24 Horas	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	1.00	0.00
Dermis	0.00	10.00	19.33
Tejido Inflamatorio	0.00	10.67	17.67
Músculo	0.00	10.00	17.00
Folículo Piloso	0.00	8.00	10.00
Promedio	0.00	7.93	12.80
VALPLAST®	MIP3	IL-1β	IL-6
7 Dias	Media	Media	Media
Epidermis	2.67	0.00	4.67
Dermis	8.33	0.00	20.00
Tejido Inflamatorio	5.67	0.00	19.67
Músculo	0.00	0.00	6.00
Promedio	4.17	0.00	12.58

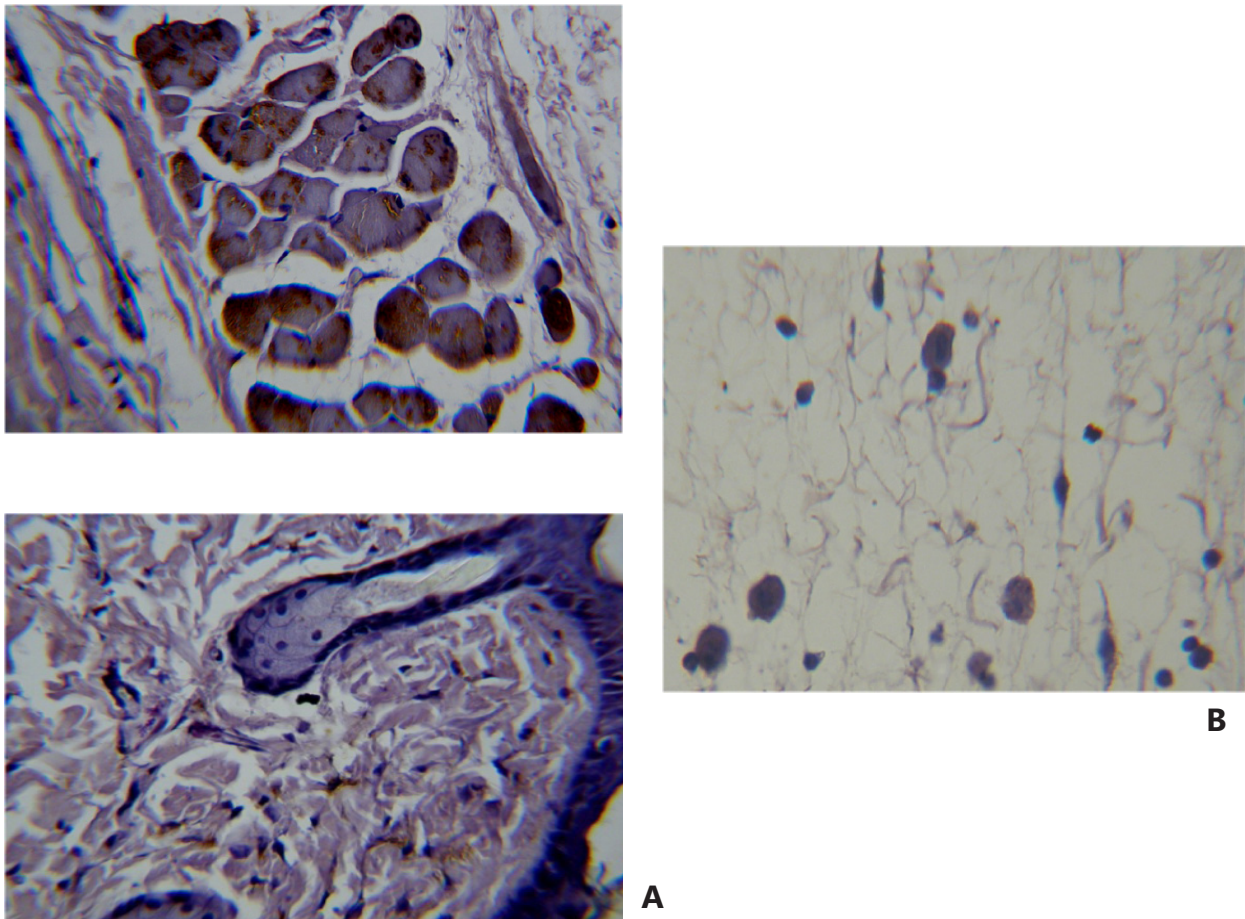


**Fig. 27.** Expresión de células inmunorreactivas al VALPLAST® tanto en inflamación aguda como crónica con los anticuerpos utilizados como marcadores positivos.

Por lo tanto con VALPLAST® a las 12 horas solo se encontró una expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis con una máxima expresión en el músculo del doble que en los otros tejidos. A las 24 horas se caracteriza por un incremento de la cantidad de esas citocinas, principalmente de la IL-6 a más del doble. A los 7 días se produce la desaparición de la IL-1 $\beta$ , persistiendo la presencia de IL-6 en similar número en dermis y tejido inflamatorio pero disminuyendo a la mitad en tejido muscular.

**POLIPROPILENO**

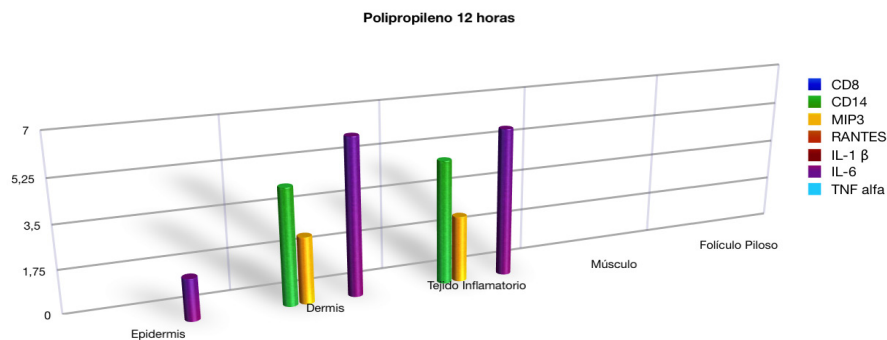
Otro grupo de ratones fueron sacrificados en tres tiempos distintos, 12 horas, 24 horas y 7 días, después de la inoculación con polipropileno. En la tabla 9 y fig. 29 se describen los recuentos promedio para la positividad de los marcadores inflamatorios de este estudio a las 12 horas de la inoculación. Cabe destacar que no se encontraron rastros de CD8, RANTES, IL-1 $\beta$  y TNF alfa en ninguno de los tejidos. CD14 se encontró en dermis y en tejido inflamatorio. MIP3 no fue detectable en epidermis, músculo y folículo piloso aunque sí lo estuvo, con recuentos bajos en dermis y tejido inflamatorio. Por último, se encontró positividad para IL-6 en epidermis, dermis y en tejido inflamatorio de 6 mientras que en músculo y folículo piloso no estuvo presente.



**Fig. 28.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculado con polipropileno sacrificados a las 12 horas. Células inmunoreactivas en el tejido conjuntivo de la dermis. Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6. Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo con el anticuerpo anti MIP3.

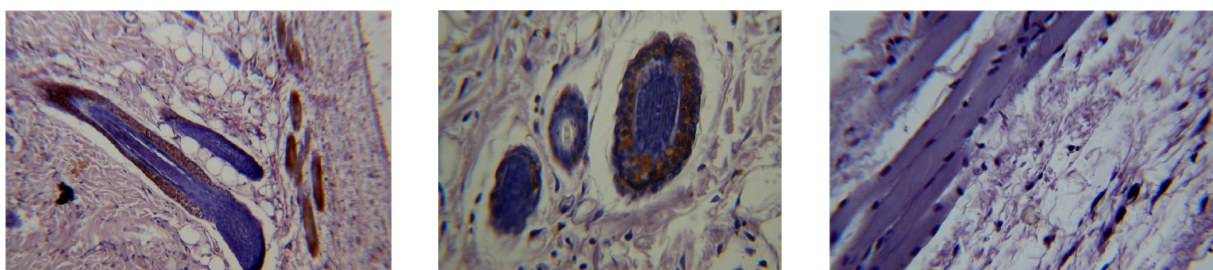
**Tabla 9.** Media y Desviación estándar del recuento de marcadores inflamatorios en los distintos tejidos tras inyección de polipropileno. Resultados a las 12 horas.

Polipropileno	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
12 Horas															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	4.67	0.58	2.67	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	6.33	1.53	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	5.00	0.00	2.67	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00	0.65	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05



**Fig. 29.** Grupo experimental: polipropileno, 12 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

En el grupo de ratones sacrificados a las 24 horas (ver tabla 10 y fig. 30 y 31) de ser inoculados con polipropileno, no se encontraron los marcadores CD8, MIP-3, RANTES y TNF alfa; las concentraciones de CD14 en epidermis, dermis, músculo y folículo piloso fueron nulas, mientras que en tejido inflamatorio se cuantificó un promedio de  $4.33 \pm 1.15$  células reactivas. IL-1 $\beta$  no se detectó en epidermis y músculo, aunque sí, con valores moderados, en dermis, tejido inflamatorio y en folículo piloso. IL-6 se expresó con claridad en epidermis, en dermis, tejido inflamatorio, en músculo y folículo piloso. Los recuentos promedio se presentan en la tabla 10.

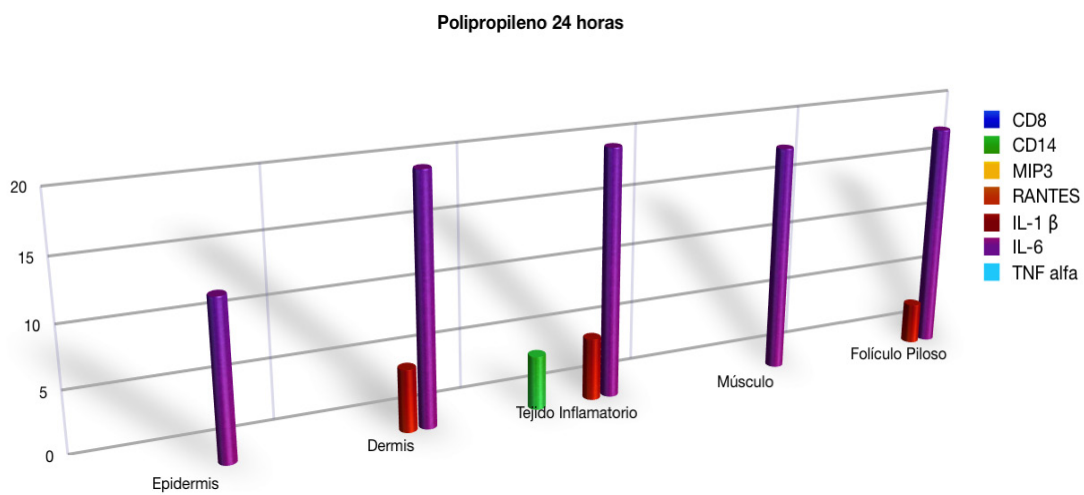


**Fig. 30.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculado con polipropileno sacrificados a las 24 horas. macrófagos inmunoreactivos en el tejido conjuntivo. Células en los folículos pilosos y células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti IL-6. Células en los folículos pilosos inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP3

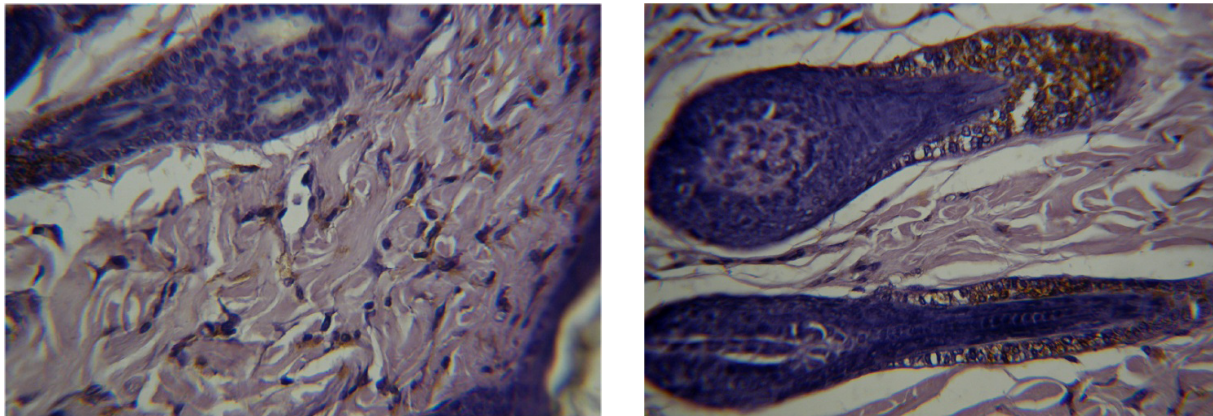


**Tabla 10.** Media y desviación estándar del recuento de marcadores inflamatorios en los distintos tejidos inoculados con polipropileno a las 24 horas.

Polipropileno	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 Beta		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
24 Horas															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.67	1.43	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.66	20.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	4.33	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.66	20.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18.33	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	0.77	18.33	0.89	0.00	0.00	p<0.05



**Fig. 31.** Grupo experimental: polipropileno, 24 h. valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

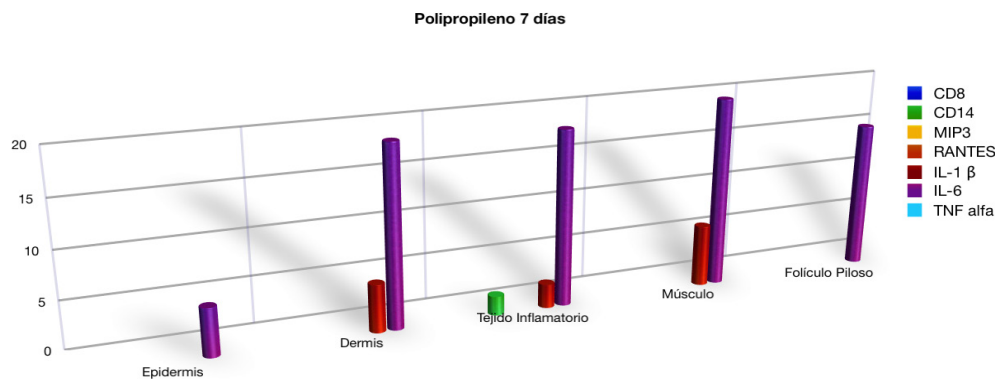


**Fig. 32.** Fotomicrográficas de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculados con polipropileno sacrificados a los 7 días. células inmunoreactivas en folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6. Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo de la dermis con el anticuerpo anti IL-6

En el último grupo de ratones inoculados con polipropileno, que fueron sacrificados tras 7 días, no se encontraron CD8, MIP-3, RANTES y TNF alfa en las muestras de los tejidos de epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso. CD14 demostró una presencia débil sólo en tejido inflamatorio. En epidermis y folículo piloso no se encontró IL-1 $\beta$ , mientras que en dermis, en tejido inflamatorio y en músculo, su presencia fue escasa a moderada. IL-6 demostró inmunorreactividad moderada en epidermis, pero estuvo presente en dermis, en tejido inflamatorio, en músculo y en folículo piloso (Ver tabla 11 y Figura No. 32 y 33).

**Tabla 11.** Recuentos promedio y d.e. de células inmorreactivas a los marcadores inflamatorios en los distintos tejidos analizados, a los 7 días de la inoculación de polipropileno.

Polipropileno	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
7 Días															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	19.00	1.41	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.54	18.50	1.12	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.50	0.71	20.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.50	0.71	0.00	0.00	p<0.05



**Fig. 33.** Grupo experimental: polipropileno, 7 días. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

Al estudiar la distribución de marcadores inflamatorios en los distintos tejidos, a las 12 horas de la inoculación de polipropileno. La presencia de CD14, MIP3 e IL-6 fue significativamente mayor en epidermis y, en dermis y tejido inflamatorio lo fueron as concentraciones de CD14, MIP3 e IL-6. En músculo y folículo piloso no se detectaron diferencias en la concentración de ninguno de los marcadores.

En las muestras de 24 horas, IL-6 demostró una concentración significativamente mayor que el resto de los marcadores en epidermis. IL-1 $\beta$  e IL-6 fueron los marcadores con significativamente mayor presencia en dermis. En tejido inflamatorio predominaron significativamente CD14, IL-1 $\beta$  e IL-6, en músculo sólo IL-6 y, en folículo piloso, IL-1 $\beta$  e IL-6. La concentración de IL-6 fue significativamente más intensa en todos los tejidos extraídos tras 7 días desde la inoculación con polipropileno.

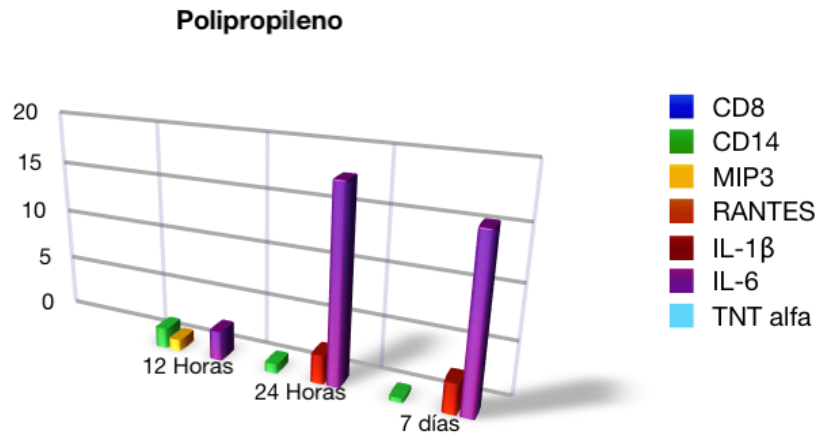
En cuanto a la presencia de cada uno de los marcadores en cada tejido en función del tiempo transcurrido desde su inoculación con polipropileno, se pudo comprobar que entre los periodos de 12 horas y 24 horas de inoculación, existía un aumento significativo de positividad para IL-6 en todos los tejidos (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso) (t de Student). las concentraciones de CD14 y MIP-3 disminuyeron significativamente (t de Student) con el paso de las horas en dermis y tejido inflamatorio ( $p < 0.05$ ); en cambio, la diferencia de concentración de IL-1 $\beta$  fue significativamente mayor en dermis, tejido inflamatorio y folículo piloso ( $p < 0.05$ ) a las 24 horas respecto a las 12 horas de la inoculación del producto.

La misma comparación (test t de Student) entre los periodos de 24 horas y 7 días post-inoculación de polipropileno, demostró una diferencia de concentración significativa ( $p < 0.05$ ) para IL-6 en todos los tejidos (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso). CD14 experimentó una disminución significativa con el tiempo en tejido

inflamatorio y IL-1 $\beta$  disminuyó significativamente en tejido inflamatorio y folículo piloso, y aumentó significativamente en tejido muscular. (Tabla 12 y fig. 34).

**Tabla 12.** Expresión de células inmunorreactivas al polipropileno tanto en inflamación aguda como en la crónica con los anticuerpos utilizados como marcadores.

Polipropileno	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
12 Horas	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	1.67
Dermis	4.67	2.67	0.00	6.33
Tejido Inflamatorio	5.00	2.67	0.00	6.00
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00
Promedio	1.93	1.07	0.00	2.80
Polipropileno	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
24 Horas	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	12.67
Dermis	0.00	0.00	5.00	20.00
Tejido Inflamatorio	4.33	0.00	5.00	20.00
Músculo	0.00	0.00	0.00	18.33
Folículo Piloso	0.00	0.00	3.33	18.33
Promedio	0.87	0.00	2.67	17.87
Polipropileno	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
7 Dias	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	5.00
Dermis	0.00	0.00	5.00	19.00
Tejido Inflamatorio	2.00	0.00	2.50	18.50
Músculo	0.00	0.00	6.50	20.00
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	15.50
Promedio	0.40	0.00	2.80	15.60

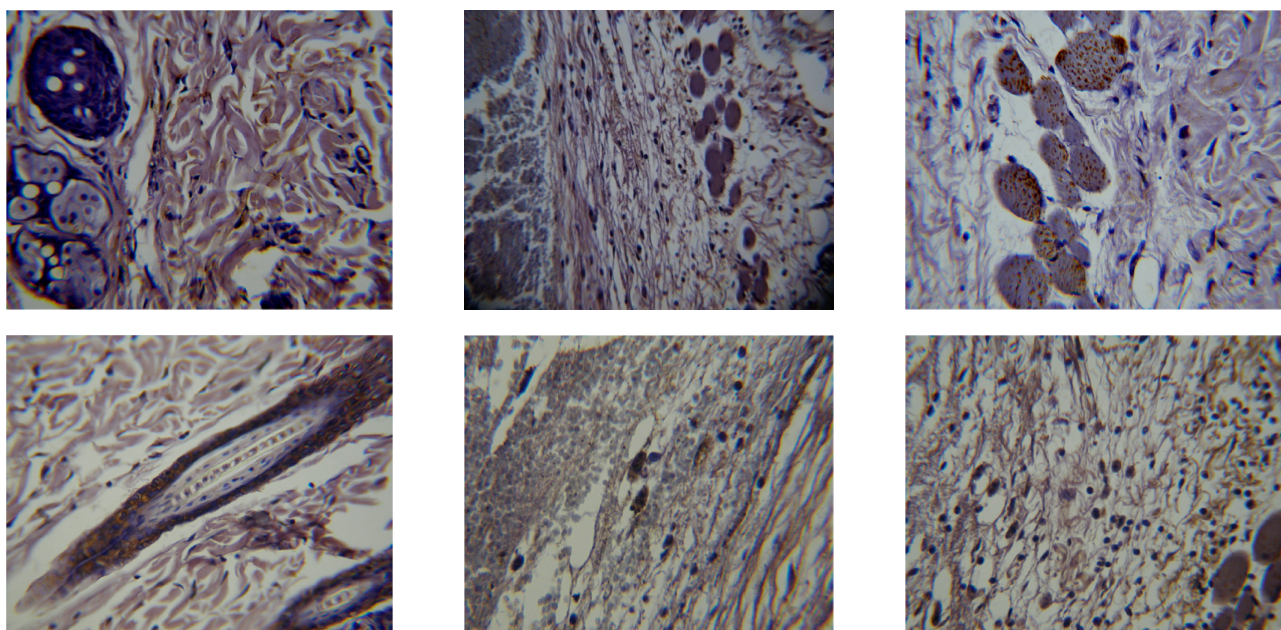


**Fig. 34.** Expresión de células inmunorreactivas al polipropileno tanto en inflamación aguda como crónica con los anticuerpos utilizados como marcadores.

En resumen, la reacción inflamatoria al polipropileno, se caracteriza, a las 12 horas de su inoculación, por una ligera presencia de células del sistema inmune con CD14, quimiocinas MIP3 y citocinas proinflamatorias IL-6 en dermis y tejido inflamatorio. No hay presencia de IL-1 $\beta$ . A las 24 horas se detecta un incremento importante de IL-6 en todos los tejidos con ligera presencia de la IL-1 $\beta$  en dermis, tejido inflamatorio y folículo piloso, con solo la presencia de pocos números de células con CD14. A los 7 días se caracteriza por la presencia de IL-6 en número similar a las 24 horas en todos los tejidos.

## ACRÍLICO

El último material al cual se midió la biocompatibilidad con los tejidos mediante la detección de CD8, CD14, MIP3, RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF alfa fue el acrílico. En la evaluación sobre tejidos obtenidos de ratones sacrificados a las 12 horas de haber sido inoculados (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso), no se observó la presencia de CD8, Rantes y TNF alfa. En el mismo tiempo post-inoculación, se observó una concentración promedio de CD14 de  $3.50 \pm 0.71$  en dermis y de  $5.00 \pm 0.00$  en tejido inflamatorio. En epidermis, músculo y folículo piloso estaba ausente este marcador. Las quimiocinas MIP3 se detectaron en dermis, en tejido inflamatorio y músculo con concentraciones que podemos calificar como moderadas (de 10 a 13,50, según el marcador. Ver tabla 13). IL-1 $\beta$  se observó, a concentraciones pequeñas en tejido inflamatorio y en epidermis. IL-6 demostró una presencia más bien escasa en epidermis y moderada o alta en folículo piloso, músculo y tejido inflamatorio, con un recuento de  $16.33 \pm 0.89$ . (Ver tabla 13 y Figura No. 35 y 36 ).

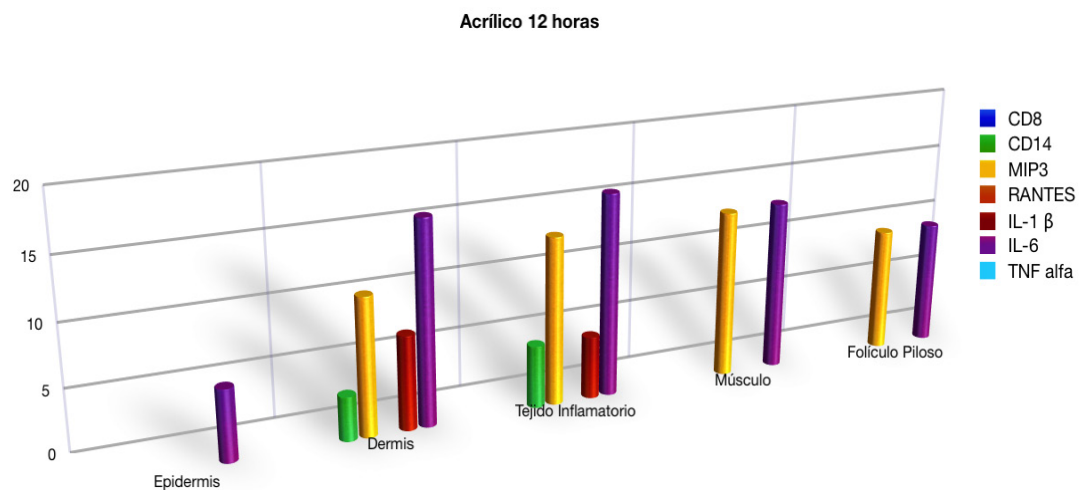


**Fig. 35.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculado con acrílico sacrificados a las 12 horas.

- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio con el anticuerpo anti CD-14.
- Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP3.
- Células inmunoreactivas en tejido conjuntivo de la dermis con el anticuerpo anti MIP3.
- Células inmunoreactivas en los folículos pilosos con el anticuerpo anti IL-6.
- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio y músculo con el anticuerpo anti IL-6.
- Células inmunoreactivas en el tejido inflamatorio con el anticuerpo anti IL-6.

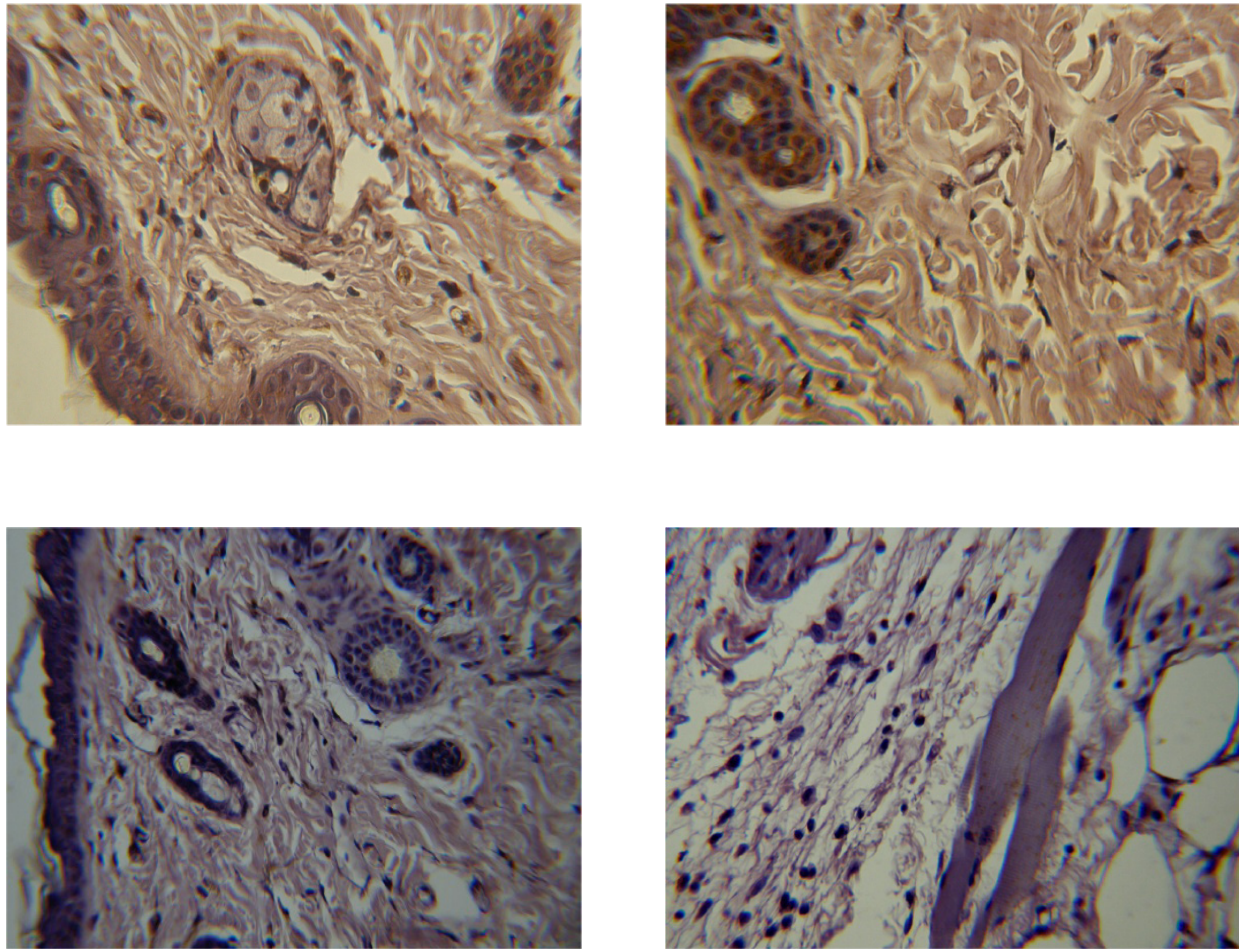
**Tabla 13.** Media y desviación estándar del recuento de marcadores inflamatorios para el acrílico a las 12 horas de su inoculación.

Acrílico	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
12 Horas															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.67	1.15	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	3.50	0.71	11.00	1.41	0.00	0.00	7.50	1.54	16.33	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	5.00	0.00	13.50	1.12	0.00	0.00	5.00	0.00	16.33	0.89	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	13.50	1.12	0.00	0.00	0.00	0.00	13.67	1.04	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	1.00	0.00	0.00	p<0.05



**Fig. 36.** Grupo experimental: acrílico, 12 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

En la muestra procedente del grupo de ratones inoculados con acrílico, tras 24 horas de exposición, también estuvieron ausentes CD8, RANTES, IL-1 $\beta$  y TNF alfa en todos los tejidos observados. La concentración de CD14 promedio en dermis y tejido inflamatorio fue de  $10.00 \pm 0.83$ . MIP3 demostró una presencia moderada en dermis y tejido inflamatorio y recuentos elevados en músculo y folículo piloso; sin embargo, fue indetectable en epidermis. En cuanto a IL-6, demostró una presencia escasa en epidermis ( $2.33 \pm 1.04$ ) recuentos moderados en folículo piloso  $10.00 \pm 1.00$  y elevados en dermis, tejido inflamatorio y en músculo. (Tabla 14 y Fig. 37 y 38).

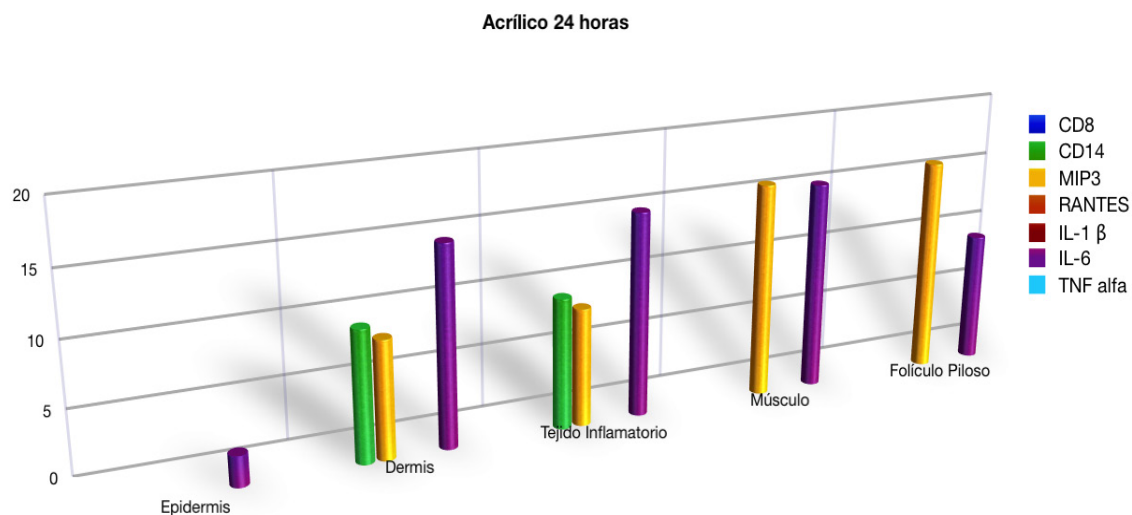


**Fig 37.** Fotomicrografías de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculado con acrílico, sacrificados a las 24 horas. Células inmunorreactivas en el tejido conjuntivo de la dermis y en folículos pilosos con el anticuerpo anti MIP3. Células en los folículos pilosos inmunoreactivas así como en el tejido conjuntivo de la dermis con el anticuerpo anti IL-6. Células inmunoreactivas en el tejido conjuntivo con el anticuerpo anti CD-14.

**Tabla 14.** Media y desviación estándar del recuento de células inmunorreactivas a anticuerpos anti-marcadores inflamatorios para el acrílico a las 24 horas de su inoculación.

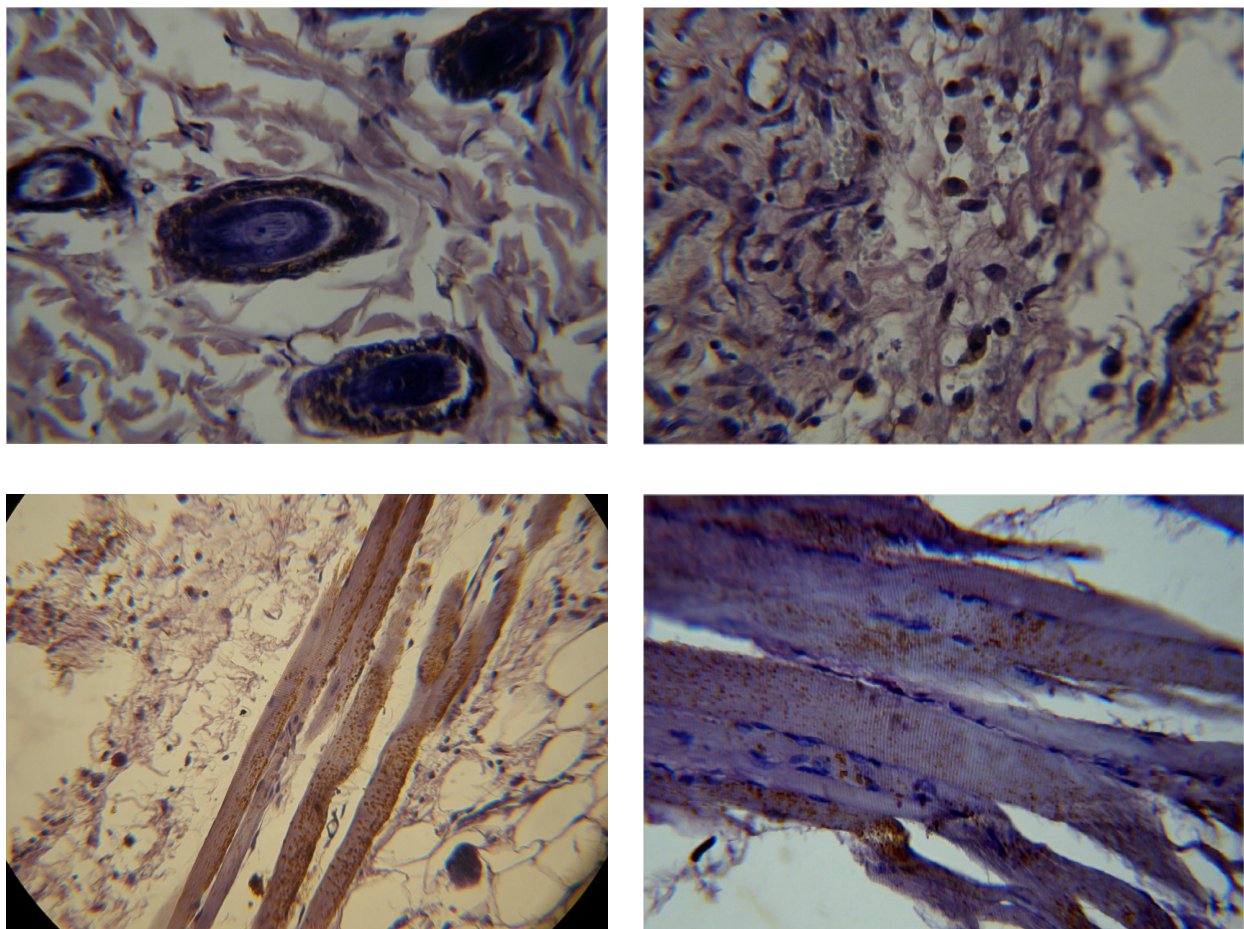
Acrílico	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1β		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
24 Horas															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.33	1.04	0.00	0.00	p<0.05
Dermis	0.00	0.00	10.00	0.83	9.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	15.33	2.08	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	10.00	0.83	9.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	15.67	0.58	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	16.50	1.12	0.00	0.00	0.00	0.00	16.00	1.73	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	16.50	1.12	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	1.00	0.00	0.00	p<0.05





**Fig. 38.** Grupo experimental: acrílico, 24 h. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

En el último grupo de ratones, que fueron sacrificados tras 7 días de inoculación con acrílico no se encontraron CD8, CD14, RANTES, IL-1 $\beta$  y TNF alfa presentes en las muestras de los tejidos de epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso. La concentración promedio de MIP3 fue escasa tanto en músculo como en folículo piloso, mientras que en epidermis, dermis y tejido inflamatorio no estaban presentes. El marcador con mayor inmunoreactividad en este grupo fue IL-6, con recuentos elevados en dermis ( $18.67 \pm 1.53$ ), tejido inflamatorio ( $18.33 \pm 1.53$ ), en músculo ( $18.00 \pm 0.00$ ) y en folículo piloso ( $19.00 \pm 1.00$ ); estuvo, sin embargo ausente en las muestras procedentes de epidermis. (Ver Tabla 15 y fig. 39 y 40)

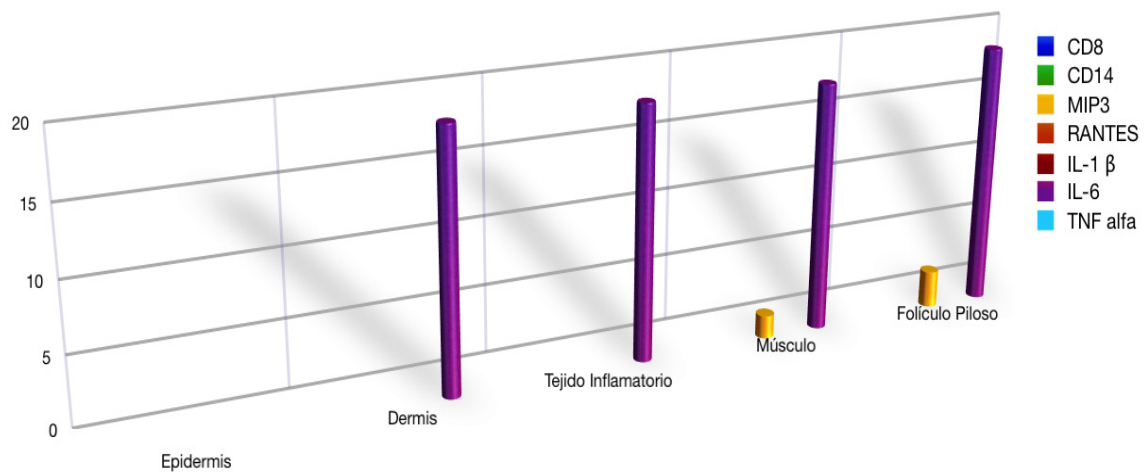


**Fig. 39.** Fotomicrográficas de biopsias de tejido subcutáneo de ratones inoculado con Acrílico sacrificados a los 7 días. Células inmunoreactivas en el tejido conjuntivo de la dermis, folículos pilosos y células musculares con el anticuerpo anti IL-6. Células musculares inmunoreactivas con el anticuerpo anti MIP3

**Tabla 15.** Media y desviación estándar del recuento de marcadores inflamatorios para el acrílico a los 7 días de su inoculación.

Acrílico	CD8		CD14		MIP3		RANTES		IL-1 $\beta$		IL-6		TNF alfa		Anova
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
7 Días															
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p>0.05
Dermis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18.67	1.53	0.00	0.00	p<0.05
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18.33	1.53	0.00	0.00	p<0.05
Músculo	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	18.00	0.00	0.00	0.00	p<0.05
Folículo Piloso	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	19.00	1.00	0.00	0.00	p<0.05

Acrílico 7 días



**Fig. 40.** Grupo experimental: acrílico, 7 días. Valores promedio por tejido del número de células inmunorreactivas a cada uno de los marcadores utilizados.

En las comparaciones (ANOVA) de la concentración de cada marcador, en cada tejido y tiempo post-inoculación, se observó que, a las 12 horas, CD8, CD14, MIP3, RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF alfa exhibían diferencias significativas en todos los tejidos (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso) ( $p < 0.05$ ). Del mismo modo, resultó ser significativa ( $p < 0.05$ ) en todos los tejidos muestreados tras 24 horas de inoculación. Las concentraciones de marcadores fueron significativamente diferentes en las muestras obtenidas de los 7 días de inoculación para dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso, mientras que no lo fueron en epidermis. ( $p > 0.05$ ).

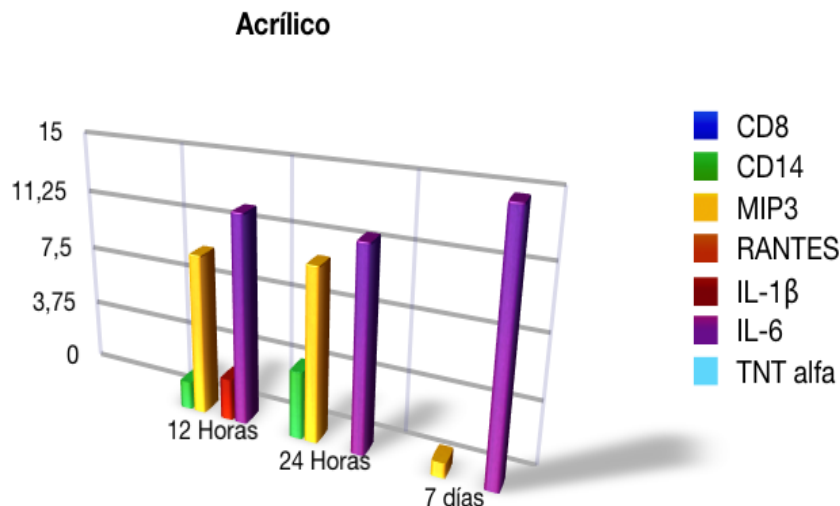
Finalmente, se compararon las concentraciones de cada marcador inflamatorio en cada tejido entre distintos tiempos post-inoculación. Los resultados demuestran que, entre las 12 horas y 24 horas de inoculación, CD8, RANTES y TNF alfa presentaron concentraciones similares en todos los tejidos (epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso) ( $p > 0.05$ ).

CD14 aumentó significativamente a las 24 horas, respecto a los valores obtenidos a las 12 horas en dermis y tejido inflamatorio. La concentración de MIP3 aumentó de forma significativa en músculo y folículo piloso ( $p < 0.05$ ), disminuyó en dermis y tejido inflamatorio, manteniéndose sin cambios significativos en epidermis. IL-1 $\beta$  disminuyó significativamente en dermis entre las 12 y las 24 horas de observación y, finalmente, IL-6 en epidermis experimentó un aumento significativo en epidermis, disminuyó significativamente en músculo y se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas en dermis, tejido inflamatorio y folículo piloso.

En segundo lugar, se establecieron las mismas comparaciones (por tejido y marcador) entre los periodos de 24 horas y 7 días tras la inoculación, sin obtener diferencias significativas en las concentraciones CD8, RANTES, IL-1 $\beta$  y TNF alfa. CD14 disminuyó significativamente con el tiempo en dermis y tejido inflamatorio. También disminuyó significativamente la concentración de MIP3 en dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo piloso. Finalmente, se observó un incremento significativo de IL-6 en epidermis, dermis, tejido inflamatorio, músculo y folículo ( $p < 0.05$ ). Ver tabla 16 y fig. 40 y 41.

**Tabla 16.** Expresión de células inmunoreactivas a marcadores de inflamación aguda y crónica presentes en los tejidos tras la inoculación de acrílico.

Acrílico	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
12 Horas	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	5.67
Dermis	3.50	11.00	7.50	16.33
Tejido Inflamatorio	5.00	13.50	5.00	16.33
Músculo	0.00	13.50	0.00	13.67
Folículo Piloso	0.00	10.00	0.00	10.00
Promedio	1.70	9.60	2.50	12.40
Acrílico	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
24 Horas	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	2.33
Dermis	10.00	9.00	0.00	15.33
Tejido Inflamatorio	10.00	9.00	0.00	15.67
Músculo	0.00	16.50	0.00	16.00
Folículo Piloso	0.00	16.50	0.00	10.00
Promedio	4.00	10.20	0.00	11.87
Acrílico	CD14	MIP3	IL-1 $\beta$	IL-6
7 Dias	Media	Media	Media	Media
Epidermis	0.00	0.00	0.00	0.00
Dermis	0.00	0.00	0.00	18.67
Tejido Inflamatorio	0.00	0.00	0.00	18.33
Músculo	0.00	1.67	0.00	18.00
Folículo Piloso	0.00	2.67	0.00	19.00
Promedio	0.00	0.87	0.00	14.80



**Fig. 41.** Expresión de células inmunorreactivas al acrílico tanto en inflamación aguda como crónica con los anticuerpos utilizados como marcadores positivos.

Por lo tanto la reacción tisular al acrílico, a las 12 horas, se caracteriza por una fuerte expresión de IL-6 en todos los tejidos y de la quimiocina MIP3, también en todos los tejidos excepto en la dermis. A las 24 horas la respuesta se mantiene similar pero con la aparición de células del sistema inmune CD14 en dermis y tejido inflamatorio. A los 7 días se caracteriza por la presencia exclusiva de un número elevado de células con expresión IL-6 en todos los tejidos excepto en la epidermis.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo VII Discusión

**E**n esta investigación se evaluó la biocompatibilidad de 4 materiales empleados como material base para prótesis bucales, LUCITONE®, VALPLAST®, polipropileno y acrílico. Insertos de similares forma y tamaño fueron inoculados en el tejido subcutáneo de ratones y se observaron preparaciones con muestras de tejidos diferentes obtenidos del área donde se había inoculado la muestra. El estudio histopatológico mostró una leve respuesta inflamatoria alrededor del área de inserción de los cuatro materiales, lo que indicó buena biocompatibilidad en general, aunque el análisis inmunocitoquímico demostró una mejor tolerancia al polipropileno y menor aceptación al acrílico.

En el cuerpo humano existen cuatro tejidos básicos: el tejido epitelial, el tejido conectivo, el tejido muscular y el tejido nervioso. Los estudios de biocompatibilidad se deben de realizar en el tejido conectivo debido a que en él se encuentran las células de reacción inmediata a las infecciones y a las inflamaciones: células (fibroblastos, neutrófilos, plasmáticas, linfocitos, neutrófilos, macrófagos), fibras (colágena, elásticas y reticulares) y sustancias amorfas (Glucosaminoglucanos como el Ac. hialurónico, proteínas, agua)<sup>66</sup>

La inflamación es un estado en que el tejido conectivo reacciona ante la presencia de algún cuerpo extraño y tiene lugar durante las primeras horas del encuentro celular. Por eso, en este estudio se analizan las reacciones ocurridas durante las primeras horas tras la inoculación de los distintos materiales; dado que, pasada la primera semana, el organismo tiende a adaptarse al material extraño o bien a rechazarlo, originándose entonces una infección.<sup>66</sup>

Desde hace tiempo los materiales analizados en este estudio han sido reconocidos como materiales biocompatibles en clínica<sup>60-63</sup>, por lo que han sido empleados en la fabricación de prótesis dentales. En este estudio, desde un punto de vista general, es decir, incluyendo células, quimiocinas y citocinas proinflamatorias, el polipropileno y el VALPLAST® mostraron una excelente biocompatibilidad, teniendo en cuenta que estos materiales sólo van a tener contacto con la mucosa y no van a penetrar en su interior.

Los linfocitos citotóxicos CD8 están de manera constitutiva en las mucosas y, en menor medida, en la piel<sup>64</sup>. En este trabajo, estas células permanecieron sin incrementarse en número con la mayoría de los materiales evaluados. Sólo con LUCITONE® se observó un

ligero aumento en éstas células, que se detectó únicamente a las 12 horas, mientras a las 24 horas y a los 7 días no hubo presencia de células inmunoreactivas.

El marcador CD14 está presente principalmente en macrófagos-monocitos.<sup>65</sup> Los macrófagos participan en una variedad de respuestas, principalmente fagocitando el material extraño. En este estudio, estas células fueron detectadas sobre todo en la respuesta aguda y en tejido inflamatorio.

La IL-6 es una citocina multifuncional con importante papel tanto en la inflamación aguda como en la inflamación crónica.<sup>20</sup> Tiene efectos variados sobre múltiples células, incluyendo la promoción y desarrollo de células del sistema inmune. Encontramos que fue la citocina que predominó en todos los tiempos estudiados tras inocular con LUCITONE®. Así, se presentó en todos los tejidos a las 12 horas, a las 24 horas, excepto en epidermis y, a los 7 días se volvió a presentar en todos los tejidos estudiados. Al inocular con VALPLAST® se presentó sobre todo en dermis, tejido inflamatorio y músculo en los 3 tiempos estudiados. En las inoculaciones de polipropileno y acrílico hubo presencia en todos los tejidos estudiados en los 3 tiempos, lo cual sugiere la actividad pleiotrópica de esta citocina, por lo que constituye un excelente marcador para definir estudios de biocompatibilidad, tanto en inflamaciones agudas como crónicas.

MIP3 es una quimiocina CC proinflamatoria y se produce durante las primeras horas del curso de reacciones inflamatorias o inmunes y sirven para movilizar las defensas del huésped. Puede ser secretada a través de células T activadas, células dendríticas inmaduras y otros tipos celulares mononucleares.<sup>28</sup> Esta fue la quimiocina que predominó con los cuatro materiales. Sin embargo tuvo un comportamiento variable: en presencia de LUCITONE® y de acrílico y fue disminuyendo de las 12 horas a las 24 horas hasta que desapareció a los 7 días. En presencia de VALPLAST® aumentó de las 12 horas a los 7 días, aunque fue muy escasa su secreción, mientras que en presencia de polipropileno no se observó MIP3. Esta quimiocina es secretada al detectarse, por las células, el material extraño. Quizá la variabilidad encontrada es debida al irregular acceso de éstas células al material y cabe mencionar que el material no se disemina, se mantiene en el lugar inoculado.

TNF alfa es una citocina proinflamatoria que juega un rol crítico en diversos eventos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis <sup>24</sup>. Además, puede ejercer daño en el huésped como sepsis, caquexia en tumores así como en enfermedades autoinmunes.<sup>23</sup> En este estudio esta citocina fue detectada en cantidades mínimas, sin diferencias respecto al grupo control, lo cual es un resultado esperado, ya que esta citocina se eleva elevada principalmente en condiciones infecciosas.

IL-1 $\beta$  es una citocina inflamatoria que juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la



respuesta del huésped a la invasión, siendo un importante factor en la iniciación de la respuesta inflamatoria y en la activación de las funciones inmunológicas<sup>17</sup> y, además, es mediador de la respuesta a infecciones, lesiones y cambios inmunológicos.<sup>19</sup> Encontramos que IL-1 $\beta$  estuvo presente durante la inflamación crónica de forma moderada en presencia de LUCITONE®, de forma similar a como se observó en presencia de VALPLAST®. En presencia de polipropileno, la expresión de IL-1 $\beta$  fue muy escasa y solo fue evidente a las 24 y 7 días. En presencia de acrílico solo hubo expresión de IL-1 $\beta$  a las 12 horas. Esta citocina es de las principales causantes de inflamación en respuesta a un material extraño. Las diferencias en el número de células que tuvieron acceso a los materiales podría explicar las diferencias encontradas.

Los 4 materiales inoculados presentan en general buena compatibilidad, con diferencias mínimas en la estimulación del sistema inmune innato, aunque, siendo estrictos, podemos establecer que el material más biocompatible es el polipropileno y el de menos compatibilidad es el acrílico.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo VIII

## Conclusiones

**A**nalizando la histopatología en tejido subcutáneo del ratón después de la inoculación de LUCITONE®, VALPLAST®, polipropileno y acrílico y se consideramos la respuesta inflamatoria de 0 a 5 leve, de 6 a 12 moderada y mas de 12 severa podemos concluir que :

- **Las células del sistema inmune CD8 y CD14 no aparecen** o presentan una presencia escasa en dermis y tejido inflamatorio en respuesta a los cuatro tejidos estudiados y en los tres tiempos **a excepción del acrílico que presenta una respuesta moderada a las 24 horas.**
- Con respecto al efecto de los materiales en los tejidos expuestos a las quimiocinas MIP-3 y RANTES se concluye que **RANTES prácticamente no se expresó** con ninguno de los materiales estudiados. En cambio, **MIP3 se encontró en respuesta a LUCITONE® sólo en las primeras 12 horas** de forma moderada mientras que, a las 24 horas, disminuyó hasta no presentarse a los 7 días. Con **VALPLAST® se presentó una inflamación crónica moderada a los 7 días.** En el **grupo expuesto al polipropileno la respuesta inflamatoria fue prácticamente nula** y, en el sometido **al acrílico, la respuesta inflamatoria fue severa en dermis y tejido inflamatorio a las 12 horas** y moderada a las 24 horas, no existiendo respuesta a los 7 días. **MIP3 Este marcador fue el único que se expresó de forma moderada a las 12 en epidermis y músculo** y alta en músculo y folículo piloso a las 24 horas.
- La **IL-6 fue la citocina que se expresó en mayor cantidad con los cuatro materiales en los tres tiempos** y en todos los tejidos examinados, siendo su expresión máxima a las 24 horas y a los 7 días. En cambio la **IL-1 $\beta$  tuvo una presencia moderada** en respuesta a LUCITONE® y VALPLAST® a las 12 y 24 horas. Con el acrílico se expresó sólo en las primeras 12 horas y, con polipropileno, a las 24 horas y a los 7 días en dermis, tejido inflamatorio y músculo.
- De acuerdo a la **expresión de las células inmunoreactivas** en tejidos inoculados con los diferentes materiales experimentales en los tres tiempos estudiados **se concluye que, a las 12 horas, el material más biocompatible es el polipropileno y el menos biocompatible, el acrílico.** A las 24 horas y 7 días se incrementa la expresión de células inmunoreactivas siendo el acrílico el material menos biocompatible.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Capítulo IX

## Bibliografía

- 1.- Villanueva J, Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Revista Mexicana de Micología Nacional 2007;25:91-104.
- 2.- Carreño N, Moronta G, Rignanese R, Guillarte C. Uso de la microscopía electrónica de barrido para observar la adherencia de *Candida albicans* en mucosa bucal u otras superficies. Acta Odontológica Venezolana 2009;47:4.
- 3.- Villegas A, Naranjo E, Gómez D. Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: revisión de la literatura. Revista Estomatológica de la Universidad de Santiago de Cali 2008;16:38-44.
- 4.- Zavaglia C. Investigaciones en biomateriales para ortopedia y odontología, realizadas en la Universidad Estadual de Campinas. Revista Impresiones 2009; Congreso Internacional de Biomateriales, Brasil. CLII2.
- 5.- Torre B, Vázquez B. Estudio experimental de cementos óseos acrílicos de reducida toxicidad para cirugía ortopédica. Mapfre Medicina 2002;13:155.
- 6.- Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Nomark. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol 2002;3:1033-1040.
- 7.- Risso A. Leucocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. J. Leukoc. Biol 2002; 68: 785-792.
- 8.- Gallo R, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides J. Allergy Clin. Immunol 2002;110:823-831.
- 9.- Gudmundsson, G.H., Agerbeth, B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. J. immunol. Methods 1999;232:45-54.
- 10.- Aderem A, Underhill D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev Immunol 1999;17:593-623.
- 11.- Beutler B, Rietschel E. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxine Nat. Rev. Immunol 2003;3:169-176.
- 12.- Harrison R, Grinstein S. Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton Biochem. Cell Biol 2002; 80:509-515.
- 13.- Larsson, B, Larsson K, Malmberg P, Palmberg G. Gram positive bacteria induced IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells Inflammations. Inflammation 1999;23:217-230.
- 14.- Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine

- gene expression in the immune system. *Biotechniques* 2002;Suppl:66-69.
- 15.- Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Microbiol* 1999;2:99-105.
- 16.- Guidotti L, Chisari, F.V. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 2000;273:221-227.
- 17.- Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. Structure-function relationship in the IL-1 family. *Front Biosci.* 1996;1:270-308.
- 18.- Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. Structure-function relationship in the IL-1 family. *Front Biosci.* 1996;1:270-308.
- 19.- 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. *Journal Immunol.* 2006;176:3877-83.
- 20.- 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.
- 21.- 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.
- 22.- Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of FNT family members in osteoclasts. *Gene* 2005;350:1-13.
- 23.- Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;4:185-91.
- 24.- Liu ZG. Molecular mechanism of FNT signaling and beyond. *Cell Res* 2005; 15:24-7.
- 25.- 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. *Journal Endod* 2004;30:534-7.
- 26.- DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin DJ. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *Journal Immunol.* 2006;176:401-15.
- 27.- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392:565-8.
- 28.- 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.
- 29.- Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP. An essential material in medicine and dentistry *J. Long Term Eff Med Implants* 2005;15:629-39.
- 30.- Anusavice KJ. *Phillips Ciencia de los materiales dentales*, Elsevier, 11°. Ed. Madrid España:2008.

- 31.-Prado GV. Laboratorios Dentsply International Inc. LUCITONE® FRS. Flexible dental Resin 2009;1:26.
- 32.- Bravo RL, Flores C, Fuentes N. Evaluación del Grado de Reabsorción ósea provocado por el uso de prótesis removibles no convencionales. Concurso de Proyectos de Investigación. Berlín.1991;1:1-13.
- 33.-Mehrdad Y, Calderón K, Quijada R. Funcionalización de polipropileno en solución mediante injerto de monometil itaconaro. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 2000;45:2.
- 34.- Brandrup J, Immergut E.H, Grulke EA. Ploymer Handbook, 6°. Edición, Editorial. Wiley-Interscience: New York:2003.
- 35.-Stenman E, Bergman M. Hypersensitivity reactions to dental materials in a referred group of patients. Scand J Dent Res 1989; 97:76-83.
- 36.- Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. J Prosthet Dent 1980;43:138-42.
- 37.- McCabe JF, Basker RM. Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. Br Dent J 1976;140:347-50.
- 38.- Ali A, Bates JF, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. Br Dent J 1986;20:444-7.
- 39.-Tucker TN.Allergy to acrylic resin denture base. J Prosthet Dent 1981;46:602.
- 40.- Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. J Prosthet Dent 1994;71:618-24.
- 41.- Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. Journal Prosthet Dent 1994;72:644-50.
- 42.-Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, Caughman WF. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. Int Journal Prosthodont 1991;4:371-6.
- 43.- Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T. Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro.Acta Orthop Scan 1994;65:147-153.
- 44.- Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. Int J Prosthodont. 1995;8:580-6.
- 45.- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments.Gerodontology. 2007;24:52-7.
- 46.- Kedjarune U, Charoenworluk N, Koontongkaew S.Release of methylmethacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. Aust Dent J 1999;44:25-30.
- 47.- Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL.The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. Int J Prosthodont 1995;8:122-8.

- 48.- Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 2001;14:439-43.
- 49.- Melilli D, Curró G, Perna AM, Cassaro A. Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol* 2009;58:425-34.
- 50.- Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000;108:59-69.
- 51.- Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *Journal Prosthet Dent* 2003; 90:190-3.
- 52.- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci* 2006; 14:203-7.
- 53.- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: efecto of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont* 2004;17:340-4.
- 54.- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci*. 2006;14:203-7.
- 55.- Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro *Journal Oral Rehabil* 2004;31:1165-72.
- 56.-Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int Journal Prosthodont*. 1997;10:73-7.
- 57.-Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device *J Biomed Mater Res* 1999;45:214-22.
- 58.- Azzarri MJ, Cortizo MS, Alessandrini JL.Effect of the curing conditions on the properties of an acrylic denture base resin microwave-polymerised. *J Dent* 2003;31:463-8.
- 59.- Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW, Barron DJ. The cytotoxic effects of denture base resin sealants. *Int J Prosthodont* 1992;5:558-62.
- 60.- Apple DJ, Mamalis N, Brady SE, Loftfield K, Kavka-Van Norman D, Olson RJ. Biocompatibility of implant materials: a review and scanning electron microscopic study. *J Am Intraocul Implant Soc* 1984;10:53-66.
- 61.- Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magrufov A, Tamura Y, Umeda H, Kishimoto M, Nakamura T, Ito J. Experimental regeneration of canine larynx: a trial with tissue engineering techniques. *Acta Otolaryngol Suppl* 2007;557:66-72.



- 62.- Gardner GD, Dunn WJ, Taloumis L. Wear comparison of thermoplastic materials used for orthodontic retainers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:294-7.
- 63.- Vehof JW, Fisher JP, Dean D, van der Waerden JP, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Bone formation in transforming growth factor beta-1-coated porous poly (propylene fumarate) scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2002;60:241-51.
- 64.- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:275-308.
- 65.- Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993;14:121-5.
- 66.- Gartner L, Hiatt J; *Histología, Texto y Atlas*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.2000.

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Apéndice 1

## TECNICA DE INMUNOCITOQUIMICA.

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

b) OH 90% 5 minutos

c) OH 70% 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3%) (500 ml Y 4.95 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

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 (DEPENDIENDO DE ANTICUERPOS)**

1 hora (A temperatura ambiente)

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

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

**12.- INCUBACIÓN DEL PRIMER ANTICUERPO**

12 horas a temperatura ambiente

**13.- SOLUCIÓN DE BUFFER P.B.**

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 P.B.**

Se lavan las laminillas por separado dependiendo el anticuerpo

**16.- APLICACIÓN DE DAB al 0.05% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.04% en Buffer P.B.) usar guantes**

a) Ver tabla anexa

**17.- SOLUCIÓN DE BUFFER P.B.**

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

b) OH 60 % 5 minutos

c) OH 70 % 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

BUFFER P.B.S.	DAB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
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

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.



# Apéndice 2

## Preparación de solución Buffer

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

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 2 litros

Fosfato de Sodio Dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 43.6 gr

Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) = 12.8 gr

Tritón X 100 = 2 ml

## Diluciones del anticuerpo

200 ml de Buffer por cada laminilla

1 ml de anticuerpo por cada 300 ml de Buffer (1:300)

# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.





# 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

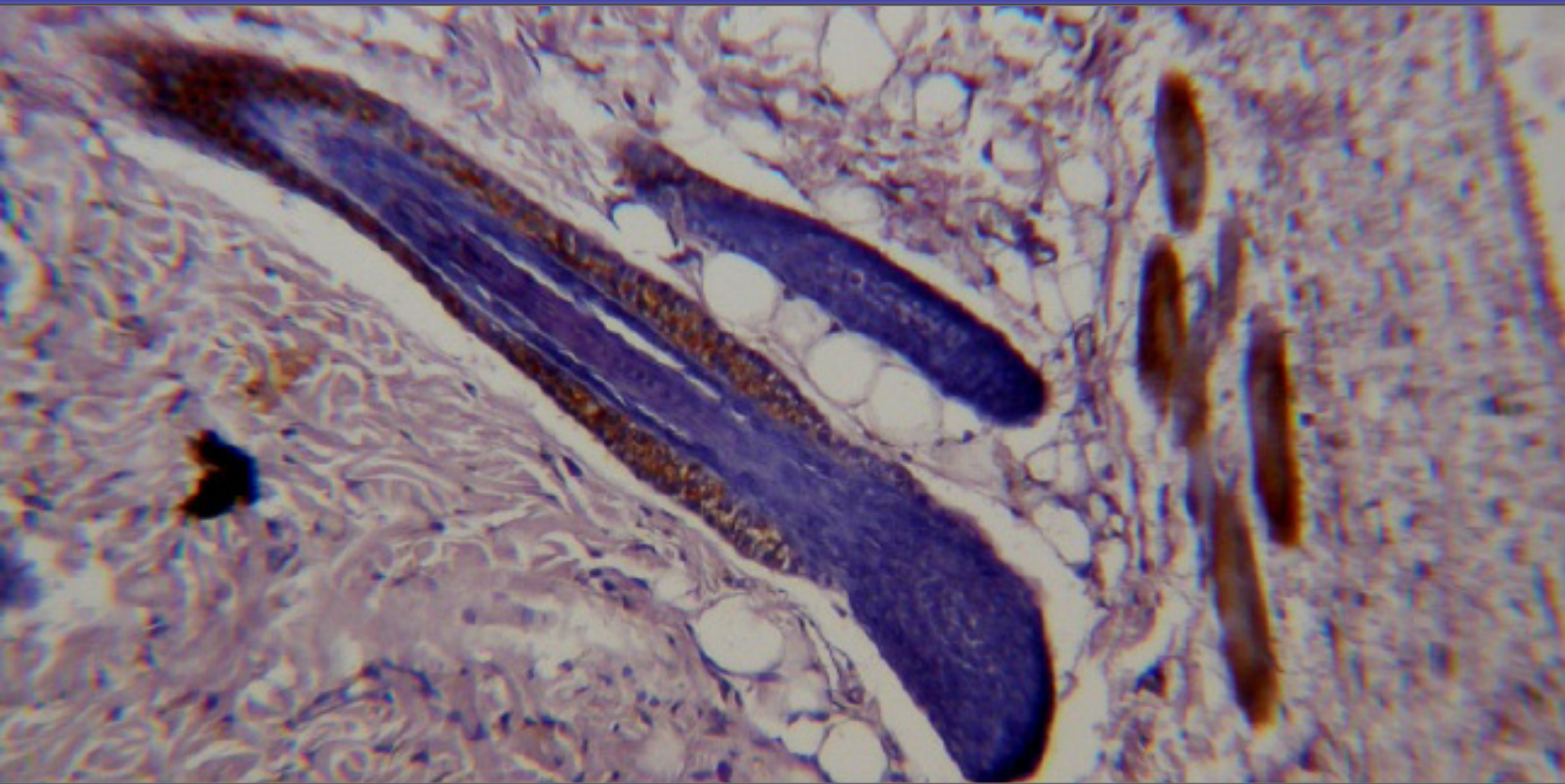
# Tesis Doctoral

Evaluación de la biocompatibilidad de Acrílico, LUCITONE®, VALPLAST® y Polipropileno, mediante la detección in situ de Quimiocinas, Citocinas Proinflamatorias y células del Sistema Inmune. Por Rosa Isela Sánchez Nájera.









TESIS DOCTORAL

ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA  
Granada, 2011

