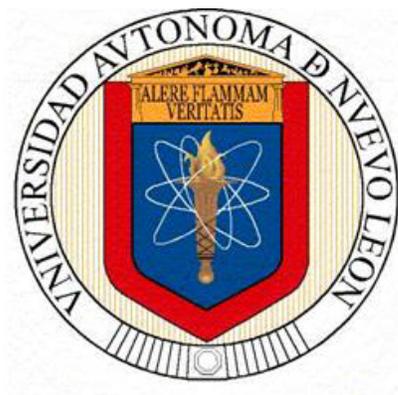


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CEMENTOS SELLADORES
ENDODÓNTICOS A BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Y RESINA EPOXICA

POR

IVONNE MORALES SANTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
ENDODONCIA

DICIEMBRE, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CEMENTOS SELLADORES
ENDODÓNTICOS A BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Y RESINA EPOXICA**

POR

IVONNE MORALES SANTOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
ENDODONCIA**

DICIEMBRE, 2014

Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Endodoncia

ANÁLISIS DE BIOCAMPATIBILIDAD DE CEMENTOS

SELLADORES ENDODÓNTICOS A BASE DE

HIDRÓXIDO DE CALCIO Y RESINA

Comité de Tesis

Dr. Juan Manuel Solís Soto
Director de Tesis

Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
Co- Director de Tesis

ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CEMENTOS
SELLADORES ENDODÓNTICOS A BASE DE
HIDRÓXIDO DE CALCIO Y RESINA

C. D. M. S JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
COORDINADOR DEL POSGRADO DE ENDODONCIA

C. D. M. E. O. SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA PHD
SUBDIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE
ODONTOLOGÍA DE LA FACULTAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON

**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CEMENTOS
SELLADORES ENDODÓNTICOS A BASE DE
HIDRÓXIDO DE CALCIO Y RESINA**

APROBACIÓN DE TESIS

**LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN ENDODONCIA**

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

Dr. (C.D.M.S) Jorge Jaime Flores Treviño

SECRETARIO

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Solís por su apoyo, comprensión y sobre todo paciencia a lo largo de este proyecto. Por hacerme ver que no hay imposibles...solo acciones.

Al Dr. Jorge Jaime Flores porque mejor coordinador de posgrado no pude tener. Gracias infinitas por sus valiosos consejos.

Al Dr. Dagoberto Vera por todo el apoyo incondicional que siempre me dio; gracias por compartirme los conocimientos a través de su gran experiencia.

A la Dra. Idalia Rodríguez por que a pesar de su apretada agenda se tomaba el tiempo para asesorarme en mi tesis; siempre tiempo de calidad. Gracias por hacerla de psicóloga en muchas ocasiones también.

Al Dr. Raúl M. Benavides Scott por guiarme, hacerme crecer profesionalmente y creer en mí en todo momento y jamás dudar de mis habilidades.

A la QBP. Karla Jiménez, porque fue un importante pilar en este proyecto; por todo el tiempo que me dedicaba en el laboratorio y su ayuda incondicional.

A la Dra. Elizabeth Madla y la Dra. Mayra Martínez; por ser un gran apoyo en el posgrado para mí, excelentes personas siempre con disposición.

A TODOS mis maestros y hermanos del posgrado por ser parte de mi familia estos 2 años, los llevaré siempre en mi corazón.

DEDICATORIAS

A mis **papás** por siempre apoyarme incondicionalmente en mis estudios, por siempre darme su amor desinteresado, aunque me haya equivocado muchas veces ustedes siempre confiaron en mí. Gracias **Papá** por todos los sacrificios que hiciste por mí, siempre he sabido que has luchado para darme lo mejor que has podido, por eso de esta manera hoy te lo agradezco desde el fondo de mi corazón. Eres un hombre maravilloso.

A mi **esposo**, por comprender lo difícil, mas no imposible de estudiar un posgrado al mismo tiempo que el inicio de nuestro matrimonio.

A **mi hermano** por que espero que se sienta muy orgulloso de mí así como yo siempre me sentiré de él.

A **Dios** por guiarme en el camino correcto hacia todas mis metas

Ivonne Morales Santos

TABLA DE CONTENIDOS

| SECCIÓN | PÁGINA |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS..... | V |
| DEDICATORIA..... | VI |
| TABLA DE CONTENIDOS..... | VII |
| RESUMEN..... | VIII |
| ABSTRACT..... | IX |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1 Biocompatibilidad..... | 7 |
| 2.1.1 Biocompatibilidad de selladores endodonticos..... | 8 |
| 2.1.2 Inflamación: Mecanismo de defensa..... | 12 |
| 2.1.3 Respuesta Inflamatoria..... | 15 |
| 2.1.4 AH Plus..... | 15 |
| 2.1.5 Sealapex..... | 16 |
| 3. MARCO DE REFERENCIA..... | 17 |
| 4. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 20 |
| 6. OBJETIVO..... | 20 |
| 6.1 Objetivo General..... | 20 |
| 6.2 Objetivos Específicos..... | 20 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 7.1 Descripción de procedimiento..... | 21 |
| 7.2 Análisis morfométrico..... | 25 |
| 7.3 Técnica de Inmunocitoquímica..... | 25 |
| 8. RESULTADOS..... | 28 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 34 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 36 |
| 11. RECOMENDACIONES..... | 36 |
| 12. BIBLIOGRAFIA..... | 37 |

RESUMEN

Introducción: La biocompatibilidad es la relación del material extraño con el tejido periodontal, ésta debe ser óptima. Los cementos selladores al estar en contacto con tejidos periapicales deben ser materiales biocompatibles, deben ayudar y estimular la reparación de lesiones y brindar un sellado hermético del ápice radicular.

Objetivos: Evaluar la biocompatibilidad de cementos endodónticos a base de hidróxido de calcio (Sealapex) y de resina (AH Plus), mediante análisis histopatológico y producción de citocinas proinflamatorias.

Material y Métodos: Se inocularon ratones con los cementos en región de la dermis del dorso. A las 24 horas y a los 7 días se sacrificaron y las muestras del corte del dorso fueron teñidas con hematoxilina & eosina y Tricrómico de Masson para evaluación de la respuesta inflamatoria, adicionalmente se realizó la técnica de inmunocitoquímica para evaluar las células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

Resultados: Al análisis histopatológico se encontró que los cementos selladores: AH Plus y Sealapex mostraron una moderada respuesta inflamatoria disminuyendo a leve a los 7 días después de realizada la inoculación subcutánea. Al análisis morfométrico no se encontró diferencia en la cantidad de células inmunoreactivas a IL-1 beta y TNF-alfa entre ambos cementos.

Conclusión: El análisis estadístico demostró que todos los cementos presentaron una aceptable biocompatibilidad, sin diferencia significativa entre ellos.

ABSTRACT

Introduction: The biocompatibility is the relationship of periodontal tissue material, this must be optimal. Sealants cements to get in touch with periapical tissues must be biocompatible materials, should assist and stimulate repair of injuries and provide a tight seal of the root apex.

However, this material does not seal the canal itself; thus a sealer is required to cover the dentin and fill irregularities and discrepancies between the filling material and the root canal. Sealants cements to get in touch with periapical tissues must be biocompatible materials, should assist and stimulate repair of injuries and provide a tight seal of the root apex. **Objectives:** evaluate the biocompatibility of endodontic cements calcium hydroxide (Sealapex) and resin (AH Plus) by histopathological analysis and production of proinflammatory cytokines. **Material and Methods:** : Mice were inoculated with cement in the dermis region of the back. At 24 hours and 7 days were sacrificed and samples cut back were stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome for evaluation of the inflammatory response, further immunocytochemistry was performed to assess immunoreactive cells proinflammatory cytokines IL-1 beta and TNF-alpha.

Results: At histopathologic analysis found that sealants cements: AH Plus and Sealapex showed a moderate decline to mild inflammatory response after 7 days on a later date after subcutaneous inoculation. By morphometric analysis found no difference in the amount of immunoreactive cells to IL-1 beta and TNF-alpha between the two cements.

Conclusion: The statistical analysis showed that all cements presented an acceptable biocompatibility, with no significant difference between them.

1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos principales de un tratamiento endodóntico exitoso son la limpieza y conformación adecuadas del conducto radicular y la obturación total del espacio preparado con un material inerte, dimensionalmente estable y biológicamente compatible.

El cemento sellador debe poseer ciertas características que son determinantes para asegurar el éxito del tratamiento endodóntico. Debido a que el sellador estará en contacto directo con los tejidos periapicales por un tiempo prolongado, su biocompatibilidad es de gran importancia. La toxicidad de un cemento sellador puede retardar la cicatrización de los tejidos periapicales o causar una reacción tisular inflamatoria.

La utilización de un cemento sellador en la fase de obturación de los conductos radiculares es básica. Sirven de lubricante durante la inserción de la gutapercha, ya sea en la condensación lateral o termoplástica, rellenan los espacios entre la gutapercha y las paredes del conducto, permitiendo un sellado hermético, obturan conductos laterales o anastomosis a los que la gutapercha no accede.

Al estar en contacto con los tejidos periapicales deben ser materiales biocompatibles, deben ayudar y estimular la reparación de lesiones y permitir un sellado hermético del ápice radicular.

Se considera que un material es biocompatible cuando éste se encuentra en el interior del organismo vivo ejerciendo una función concreta, sin ver alteradas sus propiedades ni producir daño. La determinación de la biocompatibilidad de un material, que nos permita utilizarlo con seguridad, se basa en tres tipos de estudios: de citotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad.

Los estudios de citotoxicidad in vitro evalúan la capacidad de un compuesto o material de producir la muerte o inhibir el crecimiento de una línea celular específica en un medio de cultivo en el que está disuelto dicho material.

El propósito del presente estudio fue evaluar la biocompatibilidad cementos endodónticos analizando la producción de Citocinas y Quimiocinas proinflamatorias en el ratón.

Se analizó la producción de Citocinas y Quimiocinas proinflamatorias (IL-1beta, IFN-gama, TNF-alfa) en respuesta a cementos endodónticos.

2. ANTECEDENTES

La endodoncia fue reconocida como especialidad odontológica en 1963 por la asamblea anual de la Asociación Dental Americana. Su historia se inicia con las primitivas intervenciones realizadas en la antigüedad para aliviar el dolor de origen dental a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, la endodoncia se denominaba terapia de los conductos radiculares o patodoncia; el doctor Harry B.- Jonhston, de Atlanta, Georgia fue el primer profesor que limitó su ejercicio a la endodoncia y acuñó el término de “endodoncia” del griego Endo, Dentro y Odontos Diente(Bellizi, et. al.1980)

Sobre el tratamiento dental más antiguo se recuerda a Hipócrates de Cos 370-460 AC quien recomendaba la cauterización en dientes que provocaban síntomas dolorosos; sin embargo la primera cavidad pulpar pertenece al siglo I con Arquígenes 98-117 DC quien realizaba exposición de la cámara pulpar para aliviar el dolor, este fue el inicio de la endodoncia empírica(Ingle, et al, 2004).

No fue hasta el siglo XVI que Falopio y Eustaquio descubrieron la anatomía pulpar. La endodoncia que se realiza como un método conservador para los dientes enfermos y dolorosos por caries, se remonta al siglo XVIII registrado en la obra *Le Chirurgien-Dentiste , ou Traites des Dents*, de Pierre Fauchard, a este autor se le conoce como “el padre de la odontología moderna”. Fauchard proporcionó detalles técnicos precisos para el tratamiento del conducto radicular (Lynch, et al, 2006).

Hunter en 1911 acusaba a la profesión odontológica de trabajar con un nivel muy bajo, causando focos de infección capaces de producir enfermedades generales del organismo. Billings en 1912 lanzó su teoría de la infección focal basada en radiografías que presentaban lesiones periapicales en dientes con tratamientos incorrectos de conductos radiculares, según esta los gérmenes y sus productos tóxicos fácilmente se diseminaban por el organismo.

Rosenow en 1919 enunció la teoría de la localización electiva, la cual suponía que las bacterias contenidas en un foco infeccioso viajaban por la corriente sanguínea, hasta instalarse en el órgano de su elección, desencadenando alteraciones patológicas diversas. Esta situación duro más o menos hasta 1930, hecho que sirvió para que surgiera con un gran impulso lo que se conoce como la era biológica del tratamiento endodontico; en ella aparecieron una series de trabajos con alto valor científico que proporcionaron un considerable adelanto en la práctica endodontica hasta los últimos 4 decenios.

Este adelanto estuvo condicionado a una serie de factores como: sustitución de sustancias altamente causticas como el ácido sulfúrico o ácido hidrociorhídrico, por otras de mejor eficacia para tejidos periapicales, innovaciones realizadas en aparatos de rayos X permitiendo obtener radiografías de mejor calidad en un corto tiempo de exposición; aparición de instrumentos endodonticos más apropiados, específicos y de mejor calidad. La estandarización del material endodontico se realizó a partir de la propuesta de Ingle y Levine en 1956(Bellizi, et al 1980).

Con la “ teoría del tubo hueco” desarrollada por Dickson y Rickert en 1931 nació el concepto de sellado apical, esta teoría demostraba que un tubo hueco estéril implantado en el tejido conectivo de animales de experimentación provocaba mayor reacción inflamatoria en sus extremos que un tubo repleto de material estéril. A partir de entonces se fueron buscando materiales selladores de los conductos que fueran estables, no irritantes y que se adapten lo más íntimamente posible a las paredes del conducto a nivel del orificio apical, para conseguir de este modo un perfecto sellado apical.

En el año 1982, Spangberg contabilizo la existencia de no menos de 250 materiales endodonticos utilizados en 35 técnicas de obturación diferentes y han sido clasificados o agrupados de diferentes formas: con base a sus características fisicoquímicas de acuerdo con su velocidad de resorción en la zona periapical, en relación con su efecto toxico y otras (Grossman, et al, 1974)

Materiales de obturación endodónticos

La etapa final de la pulpectomía total y del tratamiento de los dientes con pulpa necrótica es la obturación del complejo sistema de conductos radiculares. Esta consiste en el relleno compacto, hermético y permanente del conducto radicular una vez que se eliminó el contenido normal o patológico del mismo, y luego que el profesional prepare el conducto para recibir un material inerte o antiséptico, y aisle el conducto de la zona periapical con objeto de formar una barrera al paso de exudado, toxinas y microorganismos de una zona a otra. Gran variedad de materiales para la obturación de conductos han sido recomendados en el transcurso de los años. Esta gama va desde el yeso parís, amianto y bambú hasta metales preciosos como el oro y el platinoiridio. Muchos de los materiales usados fueron rechazados por la profesión por ser imprácticos, irracionales o biológicamente inaceptables. (Cruse, et al, 1980)

Grossman agrupó los materiales de obturación aceptable en: plásticos, sólidos, cementos y pastas. Una clasificación diferente de acuerdo a las características fisicoquímicas de los materiales de obturación es: metálicos, a base de gutapercha, a base de óxido de zinc-eugenol o similares, resinas, que contienen hidróxido de calcio, pastas: alcalinas y las que se absorben lentamente. (Mondragon, 1995)

CEMENTOS SELLADORES DEL CONDUCTO RADICULAR

Los cementos utilizados en endodoncia son denominados en general “cementos selladores de conductos radiculares”. Este grupo de materiales complementan la obturación de conductos, fijando y adhiriendo los conos, rellenando todo el vacío restante y sellando la unión cemento-dentinaria. Se denominan también selladores de conducto radiculares (Mondragon, 1995).

Por lo tanto un sellador de conductos radiculares actúa:

- a) Como interface para cementar en el conducto el cono primario, bien adaptado.
- b) Como relleno para salvar irregularidades.
- c) Como lubricante para facilitar el asentamiento del cono primario en el conducto.

Se puede hacer antes de que el cemento endurezca, fluya y llene los conductos accesorios y los forámenes aciales múltiples mediante el método de condensación lateral y vertical. (Cohen, et al, 1993)

Algunos investigadores comentaron que a pesar de la mayoría de los cementos selladores eran altamente irritante para los tejidos periapicales, la destrucción osteoalveolar más severa era causada por mal desbridamiento y mala obturación del sistema de conductos radiculares. Cuando el conducto no estaba sobre obturado, la reacción tisular era mínima. (Muruzabal, et al, 1966).

Estos hallazgos fueron confirmados por otros investigadores, quienes encontraron que la sobre-instrumentación y la sobre obturación producían inflamación inmediata, lo que tendía a persistir, y a causar proliferación epitelial y formación de quistes. En el grupo de dientes obturados sin llegar hasta el foramen, la lesión era temporal y en ocasiones se producía la reparación completa. (Seltzer et al, 1973).

REQUISITOS DE UN SELLADOR ENDODONTICO IDEAL

- 1- Debe ser pegajoso cuando se mezcla y adherirse bien a la pared del conducto.
- 2- Debe de tener tiempo de curado/ fraguado amplio para permitir al clínico los ajustes necesarios con respecto al material de obturación.
- 3- Debe ser capaz de producir un sellado hermético.
- 4- Debe tener partículas de polvo muy finas, que se mezclen con facilidad con el líquido del cemento.
- 5- Debe ser radiopaco con lo cual a menudo se revela la existencia de conductos accesorios, forámenes múltiples, áreas de resorción, líneas de fractura y otras características morfológicas.
- 6- Debe expandirse al fraguar.
- 7- Debe ser bacteriostático.
- 8- Debe ser biológicamente aceptable, no tiene que ser irritante para los tejidos periapicales.
- 9- Debe ser insoluble en líquidos tisulares.

- 10- No debe manchar estructuras dentales.
- 11- Debe ser soluble en solventes comunes, por si fuere necesario su remoción.
- 12- No debe generar respuesta inmunitaria en los tejidos periapicales.
- 13- No debe ser mutagénico ni carcinogénico.

Ordinariamente para evaluar científicamente los efectos tóxicos de los materiales endodónticos actualmente se usan cuatro abordajes diferentes: evaluación citotóxica, implantes subcutáneos, implantes interóseos y reacciones periapicales.(Cohen, et al, 1993).

2.1 Biocompatibilidad

La Biocompatibilidad es un factor importante, así como características físicas y químicas para la selección de materiales para la terapia endodóntica debido al contacto directo con tejido periapical. (Mutoh et. al 2013)

En el año de 1987, la Sociedad Europea de Biomateriales definió a la Biocompatibilidad como aquella habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica (Buenahora et. al., 2007). Este tipo de material se conoce como biomaterial el cual se refiere a cualquier material no vital destinado a interactuar con los sistemas biológicos, dentro o sobre el cuerpo humano (Schamalz et. al., 2009).

En los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) tenía la responsabilidad de determinar y evaluar los efectos biológicos de todos los medicamentos, materiales y dispositivos utilizados en seres humanos, incluidos los productos dentales y dispositivos. La FDA también preveía el reconocimiento de las normas establecidas por las organizaciones privadas, como la ANSI / ADA (Alaina et. al., 2012).

Durante los últimos años la biocompatibilidad de los materiales dentales se ha convertido en algo fundamental para la creación de nuevos materiales de uso dental (Schamalz et. al., 2009).

Se han encontrado artículos donde demuestran que la citotoxicidad de todos los materiales disminuye de manera similar al paso del tiempo (Zaccaro et. al. 2012).

2.1.1 Biocompatibilidad de los Cementos Selladores Endodónticos.

Un buen sellador debe ser biocompatible y bien tolerado por los tejidos periapicales. Todos los selladores son sumamente tóxicos cuando están recién preparados; pero su toxicidad se reduce muchísimo una vez que endurecen. Pocos días después del cementado, prácticamente todos los selladores de conductos radiculares producen distintos grados de inflamación periapical; por lo general esto no parece impedir la curación y reparación tisular. (Muruzábal M, *et al.*, 1966)

La combinación adecuada de eficacia selladora y biocompatibilidad de un cemento sellador es determinante para un pronóstico favorable de la terapia endodóntica.

Por lo tanto, es importante evaluar, al seleccionar el sellador endodóntico, el potencial de producir irritación química tisular. Sin embargo, es importante recordar que si un conducto radicular no ha sido limpiado y conformado adecuadamente, las propiedades selladoras de un cemento endodóntico no pueden mejorar los resultados del tratamiento. Además otra causa del fracaso del tratamiento puede provenir de selladores que contienen componentes tóxicos incluidos en su composición con el objeto de neutralizar los efectos de una preparación biomecánica pobre (Muruzábal M, *et al.*, 1966; Geurtsen W, 2001).

Dada la definición de biomaterial: material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos, con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido,

órgano o función del cuerpo; el estudio de la biocompatibilidad se entiende como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico relativo a los materiales estudiados (Helmus MN, *et al.*, 2008).

Existen distintas vías inflamatorias, cada una de las cuales se lleva a cabo a través de una secuencia de eventos biológicos. Muchos de los eventos individuales son controlados por citocinas, quimiocinas u otras moléculas reguladoras pequeñas estas son esenciales para la migración leucocitaria desde la circulación hasta sitios de inflamación, que en este contexto se llaman mediadores inflamatorios (Snyderman R, *et al.*, 1981).

Un mediador determinado puede producir efectos de manera directa y también estimular la producción de otros mediadores, originando así una respuesta integrada. El resultado final puede ser benéfico, perjudicial o ambos. Aun cuando la mayoría de las reacciones inflamatorias surgen para inactivar o eliminar sustancias dañinas, o para limitar su diseminación a través del organismo, estas mismas reacciones pueden resultar deletéreas cuando dañan los tejidos del huésped o interfieren con las funciones normales.

Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria. Por tanto, el término es aplicable a múltiples tipos diferentes de células. Algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales como las células cebadas y macrófagos; otras células circundantes que penetran a los tejidos solo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria como son los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y plaquetas (Snyderman R, *et al.*, 1981).

De acuerdo con su naturaleza, estos pueden ser biológicos: microorganismos patógenos que actúan, ya sea por medio de toxinas, su metabolismo o aun directamente, tejidos necróticos y todos los tipos de reacción inmunológica; y los no biológicos o inanimados: agentes físicos y químicos (Snyderman R, *et al.*, 1981).

Por ello es importante el uso de materiales obturadores poco tóxicos y por el contrario, estimuladores de la reparación ya combatida la infección, evitando así irritaciones

químicas persistentes. Debido a lo anterior, el Instituto Nacional Americano de Normalización (ANSI) y la Asociación Dental Americana (ADA) señalan especificaciones para los materiales, instrumentos y equipo dental, formuladas por el Comité de Estandarización en Productos Dentales de la ADA; ANSI/ADA aprobaron el documento No.41 indicando las practicas estándar recomendadas para la valoración biológica de los materiales dentales, los cuales cumplen con los estándares de la Organización Internacional para la Normalización (ISO 10993), reconociendo la necesidad de disponer de métodos normalizados de prueba, para reducir el número de productos que habría que probar en la práctica clínica.

Estas pruebas deben aplicarse a todos los materiales para ser aprobado su uso en boca:

Pruebas iniciales:

- Ensayos In Vitro e In Vivo de:
- Citotoxicidad
- Hemólisis
- Prueba de Ames (potencial de mutación)
- Prueba de Styles (transformación celular)
- Toxicidad sistémica vía oral
- Toxicidad sistémica vía peritoneal
- Inhalación aguda

Pruebas secundarias:

Basándose en el resultado de las pruebas iniciales, los materiales que resultan prometedores con sometidos a una o más pruebas en pequeños animales para estudiar su potencial inflamatorio e inmunógeno; no es necesario que el material cumpla su función prevista o específica.

Irritación Mucosa

Toxicidad dérmica

Implantes subcutáneos

Implantes en hueso

Implante intramuscular

Pruebas de uso:

Los materiales que siguen siendo prometedores son sometidos a pruebas In Vivo de uso, esto es: la aplicación de los materiales en su contexto previsto, primero en animales de mayor tamaño, primates y finalmente humanos. Estas pruebas permiten identificar todos los efectos de los materiales dentales sobre los tejidos en los que se vayan a utilizar; se diferencian de las pruebas anteriores en que el material debe cumplir en el animal la misma función que tendrá en las personas.

Irritación pulpar

Recubrimiento pulpar

Uso endodóntico

Implante dental

De lo anterior resumimos que las pruebas se inician a nivel de laboratorio con cultivo de fibroblastos, observando su lisis y disminución en la división celular. A continuación se realizan pruebas en animales donde se evalúa el potencial alergénico y carcinogénico; luego de ser probados exhaustivamente deberán examinarse de la misma forma en que van a ser usados en el hombre. Finalmente se hacen las pruebas en pacientes humanos con controles periódicos; no hay duda de que el método ideal para poner a prueba un material es el ensayo In Vivo en un sujeto humano; no obstante la experimentación humana a menudo es peligrosa, costosa y carece de ética, por lo que en su mayor parte se sustituye con pruebas en animales (Polyzois GL, *et al.*, 1995).

Los resultados de implantación muestran en general que los materiales de obturación causan inicialmente inflamación y se vuelven más biocompatibles con el tiempo, como resultado del trauma y la liberación de sustancias nocivas de estos materiales (Geurtsen W, 2001).

2.1.2 Inflamación: Mecanismo de Defensa

La inflamación no se considera una reacción inmune porque se puede desencadenar no solo en presencia de infección bacteriana sino también de trauma contuso, quemaduras, obstrucción vascular y toda una miríada de causas diversas. No obstante las reacciones inmunes inflamatorias se relacionan íntimamente y muy a menudo se promueven y favorecen entre sí. Los cambios que tienen lugar en los vasos sanguíneos inflamados son factores esenciales para la atracción de las células del sistema inmune hacia el tejido infectado o lesionado (Baggiolini M, *et al.*, 1998).

El espectro de eventos que se suscita durante la inflamación varía de acuerdo con el tejido y tipo de trauma involucrados. Los aspectos individuales de la respuesta están controlados por moléculas de señalización con capacidad de difusión, conocidas como mediadores inflamatorios, una clase de moléculas que comprende muchas proteínas, péptidos y compuestos orgánicos pequeños. En general estos mediadores provienen de tres fuentes principales: secretados por células huésped que sufren daño, productos intermediarios del daño tisular y las reacciones del huésped, y macromoléculas microbianas únicas. Algunos, llamados mediadores vaso activos, actúan principalmente sobre la vasculatura, otros median el dolor, la fiebre, coagulación, o la quimiotaxia leucocitaria; entre los mejores estudiados se encuentra la histamina, almacenada en los mastocitos o células cebadas. La vasodilatación y permeabilidad vascular contribuyen a la llegada rápida de factores defensivos inespecíficos innatos, al sitio donde se requieren; la unión de los leucocitos sanguíneos al endotelio es esencial para la atracción de células de defensa al sitio de trauma o infección.

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

Los fagocitos pueden actuar en cooperación con los linfocitos, aunque también son capaces de reconocer y matar muchos patógenos directamente, y es así que constituyen las células efectoras más importantes del sistema inmune innato. Los leucocitos establecen contacto con gran variedad de mediadores inflamatorios, entre estos se encuentra un grupo diverso de intermediarios, conocido como factores quimiotácticos leucocitarios

Los factores quimiotácticos de leucocitos más relevantes son las quimiocinas un grupo estructuralmente diverso de proteínas que pueden ser secretadas por células endoteliales activadas y por muchos otros tipos celulares como respuesta de la lesión tisular, cada una de estas quimiocinas puede atraer selectivamente tipos celulares de leucocitos que portan los receptores de superficie correspondientes. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.

Aunque son proteínas solubles las quimiocinas tienden a adherirse a la superficie de las células endoteliales, así como a la matriz extracelular, formando un gradiente de concentración estático de quimiocinas que comienzan en el endotelio vascular, se incrementa al cruzar los tejidos y alcanza su pico máximo en el sitio de daño (Baggiolini M, *et al.*, 1998).

La inflamación relacionada con infiltración de neutrófilos se conoce como inflamación aguda. Esta se puede detectar a los 30 minutos después del trauma agudo; las células generalmente se acumulan hasta valores muy significativos a los 8 a 12 horas y continúan llegando al sitio del daño más y más células hasta que desaparece la producción de señales quimiotácticas. Cuando la demanda comienza a declinar la concentración periférica de neutrófilos gradualmente regresa a la normalidad durante el transcurso de un período que va de días a semanas. El sistema fagocitario de los neutrófilos posee muchas propiedades ventajosas en el sistema de la inmunidad innata, y representa un primer paso fundamental en el proceso de curación (Weiss SJ, *et al.*, 1989).

El sistema de fagocitos mononucleares derivan de un leucocito circulante llamado monocito, ellos una vez establecidos en un sitio determinado adquieren el nombre de macrófagos o histiocitos. Las quimiocinas específicas reconocidas por monocitos y por neutrófilos se difieren, ya que estas células expresan receptores de quimiocinas diferentes, por lo tanto la combinación particular de quimiocinas producidas en un tejido en estrés determina si las células de defensa atraídas serán monocitos, neutrófilos u otros leucocitos. Parece probable que las quimiocinas o factores similares también gobiernen la entrada y la distribución de los monocitos en tejidos normales, sin daño. Los macrófagos activados funcionan como fagocitos, también secretan de manera específica una variedad enorme de sustancias biológicamente activas dentro de los ejidos circundantes. Se han identificado hasta el momento más de 100 productos de secreción de macrófagos entre ellos están numerosas citocinas que influyen sobre el crecimiento y las actividades de otros tipos celulares y quimiocinas que atraen linfocitos y otros leucocitos vecinos (DeVries Me, 1999).

Los macrófagos son las células efectoras de la inmunidad innata de mayor relevancia, debido a que son capaces de controlar acciones de los linfocitos por medio de la liberación de citocinas que controlan la proliferación, diferenciación y función efectora de los linfocitos; al formar parte de las células presentadoras de antígenos más importantes células que procesan y exhiben en su superficie sustancias extrañas de manera que estas puedan ser reconocidas por los linfocitos y estos respondan a su presencia. Por lo tanto, a través de estos dos tipos de interacciones reguladoras con los linfocitos, los macrófagos tienen la capacidad para iniciar y coordinar las respuestas inmunes adquiridas (Snyderman R, *et al.*, 1981).

2.1.3 Respuesta inflamatoria

La inflamación es el mecanismo de reacción del tejido vascularizado frente a una agresión local. Existen distintas vías inflamatorias, cada una de las cuales se lleva a cabo a través de una secuencia de eventos biológicos. Muchos de los eventos individuales son controlados por citocinas, quimiocinas u otras moléculas reguladoras pequeñas, éstas son esenciales para la migración leucocitaria desde la circulación hasta sitios de inflamación, que en este contexto se llaman mediadores inflamatorios (Snyderman et. al., 1981).

Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria. Por tanto, el término es aplicable a múltiples tipos diferentes de células. Algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales como las células cebadas y macrófagos; otras células circundantes que penetran a los tejidos sólo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria como son los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y plaquetas. Tres clases de células inflamatorias, neutrófilos, macrófagos y linfocitos son las principales células efectoras de la mayor parte de las reacciones inflamatorias o inmunitarias agudas. Por ello, es importante el uso de materiales obturadores poco tóxicos y por el contrario, estimuladores de la reparación ya combatida la infección, para evitar así irritaciones químicas persistentes (Snyderman et. al., 1981).

2.1.4 AH PLUS

AH-Plus es un sustituto de AH26, fue introducido por Dentsply/DeTrey. Es un cemento sellador de conductos basado en un polímero de epoxi-amina con formaldehído en su composición. Es una versión mejorada, del tradicional cemento AH 26. Según la casa comercial, ofrece incluso mejor biocompatibilidad, mejor radio-opacidad y estabilidad de color y es más fácil de eliminar. Su manipulación también es más fácil y rápida (Briseño, et. al 1991).

Es químicamente inerte tras su fraguado. Es un sistema pata/pasta. La consistencia proporciona a la mezcla una óptima viscosidad. Posee una fluidez adecuada con baja contracción y solubilidad lo que asegura un buen sellado. Un factor importante es la radio -opacidad, que supera incluso a su predecesor AH 26. Puede usarse con todas las técnicas conocidas de obturación incluso con gutapercha condensada con calor. (AH Plus™, 2002)

2.1.5 SEALAPEX

Es un cemento pasta/pasta (base y catalizador) usados en partes iguales, hasta obtener una mezcla de color homogéneo. (Holland et. al, 1985).

Su tiempo de fraguado en el conducto radicular es de 30 a 40 minutos, acelerándose en presencia de humedad (Da Silva, et. al,2000)

Entre algunas de las propiedades y características que posee el cemento Sealapex se pueden mencionar:

- Plasticidad y viscosidad satisfactoria.
- Excelente tolerancia tisular.
- Reabsorbible y no irritante al ser extravasado.
- Acción antimicrobiana en conductos radiculares.
- Su radiopacidad es escasa.

Los cementos endodónticos a base de Hidróxido de Calcio, son estimuladores de osteoblastos; ayudando a formar el tejido duro y calcificado. Por su pH alcalino favorece a la disminución de microorganismos bacterianos (Holland, et. al, 1985).

3. MARCO DE REFERENCIA

En un estudio se demostró que la biocompatibilidad es un factor importante, así como las características físicas y químicas para la selección de materiales para la terapia endodóntica debido al contacto directo de materiales con tejido periapical (Noriko, et. al 2013).

Existen estudios donde se comprueba que existe una disminución inflamatoria de los cementos endodónticos con el paso del tiempo, tal es el caso en la investigación de Silveira, et. al 2011; así como en el caso de Ashraf, et. al 2012.

En la investigación realizada por Sousa, et. al 2006 el grupo del AH Plus la reacción inflamatoria cambió de severo a moderado demostrándose que éste no resultó ser el sellador endodóntico con más capacidad biocompatible.

Algunas investigaciones han demostrado que la adición de ciertas sustancias pueden aumentar el grado de toxicidad de un cemento sellador endodóntico como son: agentes bacteriostáticos como el yodoformo y el paramonoclorofenol, el eugenol libre actuará como irritante, la fuerte alcalinidad de ciertos materiales, amonio y formaldehído entre otros. Un estudio In Vitro demuestra que efectos genotóxicos han sido observados con selladores que liberan para formaldehído, o algunos que contienen sustancias mutagénicas como el bisfenol-A-diglicidil-éter o sus derivados (Geurtsen, *et al.*, 2001).

Se evaluó la capacidad selladora, el pH y la fluidez de tres cementos selladores a base de hidróxido de calcio: Sealapex, Sealer 26 y Apexit y un cemento de óxido de zinc-eugenol. Los resultados revelaron que no existen diferencias estadísticamente significativas en el sellado apical de los cuatro cementos selladores. Todos los cementos selladores a base de hidróxido de calcio alcalinizaban el medio circundante. El Sealer 26 presentó una fluidez superior cuando fue comparado con los otros cementos selladores. Esto indicó que los cementos selladores que contienen hidróxido de calcio presentan propiedades fisicoquímicas satisfactorias cuando son comparados con los que contienen óxido de zinc-eugenol (Siqueira, et al., 1995).

Otras investigaciones demuestran que entre cementos de la misma composición hay diferencias en cuanto citotoxicidad, indican que las variaciones son resultado de los componentes agregados (Silva LA, et al., 1997).

A pesar de la gran variación de biomateriales que han sido reportados como ideales para la reparación dental, el hidróxido de calcio ha demostrado tener una excelente biocompatibilidad a largo plazo en la pulpa y áreas periapicales (Soares JA, et al., 2007).

Se evaluó la biocompatibilidad In Vivo de dos cementos selladores, uno a base de hidróxido de calcio y otro a base de óxido de zinc-eugenol. Después de la implantación en el tejido conectivo de ratas se obtuvieron las muestras y se prepararon histológicamente para su evaluación microscópica. Se observaron 41 reacciones inflamatorias en los dos especímenes pero siempre fue mayor en el cemento a base de óxido de zinc-eugenol (Kolokouris et al., 1998).

Un estudio experimental evaluó la biocompatibilidad de cuatro selladores endodónticos: AH Plus, Roth 811, CRCS y Sealapex; el estudio se realizó en el tejido conectivo de ratas Wistar-Furth, se colocaron los cementos en el tejido subcutáneo y fueron removidos después de 7,14 y 21 días. Al analizar microscópicamente a los especímenes se encontró que: el sellador más irritante fue AH Plus, pero este efecto inflamatorio disminuyó con el tiempo, Roth 811 y Sealapex causaron una reacción inflamatoria de severa a moderada, mientras que CRCS causó una reacción moderada a leve (Economides, et. al, 1995).

Se estudió la respuesta de los tejidos ante dos cementos a base de resina: Diaket y AH Plus por un periodo de 3 meses; los resultados indicaron que se producía una reacción inflamatoria leve en los tejidos periapicales de los dientes obturados con estos cementos. Se observó una menor reacción periapical en aquellos dientes subobturados comparado con los sobreobturados. Además la sobreobturación causó daño al cemento y al hueso alveolar donde se observó fibrosis, aunque esta fue rápidamente reemplazada por nuevo

trabeculado óseo. En algunos casos el material sobre obturado resultó ser encapsulado. Ambos materiales mostraron una resorción muy lenta. El AH Plus tendió a desintegrarse en pequeños gránulos para luego ser fagocitados. A pesar de la buena tolerancia de estos materiales, no se observó la obliteración completa del ápice radicular con cemento o tejido osteoide. Generalmente el ápice radicular se encontraba recubierto por tejido conjuntivo fibroso; los autores afirman que una respuesta de defensa presentada por el organismo ante partículas extrañas es: la reabsorción o la encapsulación del mismo (Muruzàbal, *et al.*, 1966).

4. JUSTIFICACIÓN

Es importante que un material endodóntico, en este caso los selladores cuenten con la biocompatibilidad como requisito principal; ya que están en contacto directo con los tejidos perirradiculares, evitando así irritación y/o inflamación en los tejidos circundantes.

Por lo tanto el presente estudio se llevará a cabo para evaluar la biocompatibilidad del AH Plus *versus* Sealapex.

5. HIPÓTESIS

Los selladores endodonticos a base de resina presentan una mayor biocompatibilidad que los selladores a base de hidróxido de calcio.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivos Generales

- Evaluar la biocompatibilidad de los selladores endodonticos a base de resina y de hidróxido de calcio, mediante análisis histopatológico y midiendo la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

6.2 Objetivos Específicos

- Analizar la respuesta histopatológica en piel de ratón en respuesta a la inoculación de cementos endodónticos.
- Determinar la producción de citosinas y quimiocinas proinflamatorias en el ratón utilizando cemento a base de resina AH Plus.
- Analizar la producción de citosinas y quimiocinas proinflamatorias en el ratón utilizando cemento a base de hidróxido de calcio Sealapex.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Descripción del procedimiento

Para el siguiente estudio se utilizaron 12 ratones de la cepa CD-1 especie *Mus Musculus* de 6 a 12 semanas de edad, de un peso entre 30 y 40 gramos de peso.

Los ratones fueron mantenidos bajo las siguientes condiciones de bioterio controlando: a) Temperatura b) Humedad relativa c) ciclos de horas luz-oscuridad d) alimento e) agua *ad libitum*, siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 (la cual señala técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Se evaluaron los cementos AH Plus y Sealapex de uso endodóntico.

Se formaron 3 grupos con 4 ratones cada uno, un grupo por cada cemento y el control. Los ratones fueron anestesiados utilizando una mezcla de xilacina y ketamina, los ratones fueron rasurados en la parte dorsal, previamente a este paso cada cemento fue diluido con agua destilada en proporción de 100 micro litros de agua con 0.1 gramos de cada cemento, los ratones se inocularon con los diferentes cementos por vía subcutánea en la región dorsal, utilizando una jeringa de un solo uso de 500 micro litros para ser inoculado en el dorso de cada ratón. Uno de los 3 grupos fue utilizado como control por lo que se inoculó sólo con solución fisiológica.

24 horas después 3 ratones se sacrificaron y 7 días después otros 3 ratones se sacrificaron.

Se tomó una muestra del dorso de cada ratón y se colocó en para formaldehído al 4%, para su fijación.

Posteriormente cada corte se deshidrató en alcoholes de menor a mayor concentración.

Se utilizó xilol para la aclaración de dichos cortes.

Se colocaron en parafina para su inclusión y se hicieron cortes de 7 micras al micrótopo.

Posteriormente se tiñeron con hematoxilina, eosina y tricómico de Masson.

Por medio de métodos inmunocitoquímicos se detectó la presencia de las citocinas pro inflamatorias IL- 1B e Interferon gamma.

Finalmente se realizó un análisis morfométrico, donde se midió el grado de inflamación y cantidad de citosinas proinflamatorias.

TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina).

La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateina, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación

| REACTIVOS | TIEMPO |
|------------------------------|---------------|
| 1.- DESPARAFINAR | |
| XIOL | 5 MINUTOS |
| XIOL | 5 MINUTOS |
| 2.- HIDRATAR | |
| OH-100% | 5 MINUTOS |
| OH-80% | 5 MINUTOS |
| OH-60% | 5 MINUTOS |
| OH-50% | 5 MINUTOS |
| 3.- AGUA CORRIENTE | 5 MINUTOS |
| 4.- HEMATOXILINA DE HARRIS | 10 MINUTOS |
| 5.- AGUA CORRIENTE | 5 MINUTOS |
| ***DECOLORAR CON OH-ACIDO 1% | DOS CAMBIOS |

| | |
|----------------------------------|---------------|
| ***AGUA CORRIENTE | 5 MINUTOS |
| ***VIRAR NH ₄ OH 0.5% | CINCO CAMBIOS |
| ***AGUA CORRIENTE | 5 MINUTOS |
| 6.- EOSINA | 30 SEGUNDOS |
| 7.- DESHIDRATAR | |
| OH-96% | 3 MINUTOS |
| OH-96% | 3 MINUTOS |
| OH-100% | 3 MINUTOS |
| OH-100% | 3 MINUTOS |
| OH-XIOL | 3 MINUTOS |
| XIOL | 3 MINUTOS |
| XIOL | 3 MINUTOS |
| 8.- CUBRIR CON RESINA | |

RESULTADOS:

NUCLEOS: AZULES

CITOPLASMA Y OTROS COMPONENTES DEL TEJIDO: ROSADO A ROJO

**TRICRÓMICA DE MASSON
(PARA COLÁGENA)**

La tinción tricrómica de Masson, al igual que otras tinciones tricrómicas, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

Primeramente, se tiñen las secciones con un tinte ácido tal como escarlata de Biebrich. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones entonces se tratan con ácido fosfotúngstico y/o fosfomolíb dico. Ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolíb dicos permiten que la escarlata de Biebrich difunda del colágeno pero no del citoplasma. Los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolíb dicos tienen numerosos grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de la anilina, que es el tinte del colágeno. Probablemente, el pH de la solución fosfotúngstico/fosfomolíb dico también aumente la coloración y ayude al colágeno en la difusión o el retiro de los colorantes.

| REACTIVOS | TIEMPO |
|---|--|
| 1.- DESPARAFINAR | |
| XILOL | 5 MINUTOS |
| XILOL | 5 MINUTOS |
| 2.- HIDRATAR | |
| OH-100% | 5 MINUTOS |
| OH-80% | 5 MINUTOS |
| OH-60% | 5 MINUTOS |
| OH-50% | 5 MINUTOS |
| 3.- AGUA DESTILADA | |
| 4.-BOUIN | 1 HORA A TEMPERATURA AMBIENTE |
| 5.-AGUA CORRIENTE | HASTA QUITAR EXCESO DE COLOR AMARILLO |
| 6.-AGUA DESTILADA | TRES CAMBIOS |
| 7.-HEMATOXILINA DE WEIGERT | 10 MINUTOS |
| 8.-AGUA CORRIENTE | 10 MINUTOS |
| 9.-AGUA DESTILADA | TRES CAMBIOS |
| 10.- ESCARLATA DE BIEBRICH | 5 MINUTOS |
| 11.-AGUA DESTILADA | DOS CAMBIOS |
| 12.-ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO- FOSFOMOLIBDICO | 15 MINUTOS |
| 13.-AGUA DESTILADA | TRES CAMBIOS |
| 14.-AZUL DE ANILINA | 6 MINUTOS |
| 15.-AGUA DESTILADA | TRES CAMBIOS |
| 16.-ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL 1% | 3 MINUTOS |
| 17.-AGUA DESTILADA | 5 MINUTOS |
| 18.-OH-70% | 3 MINUTOS |
| 19.- OH-96% | 3 MINUTOS |
| 20.- OH-96% | 3 MINUTOS |
| 21.- OH-100% | 3 MINUTOS |
| 22.- OH-100% | 3 MINUTOS |
| 23.-OH-XILOL | 3 MINUTOS |
| 24.- XILOL | 3 MINUTOS |
| 25.- XILOL | 3 MINUTOS |
| 26.- MONTAR CON RESINA | |

RESULTADOS:

Fibras de colágeno = Azul.

Por tanto, el tejido conjuntivo se teñirá de dicho color.

Estructuras oxidadas + Citoplasma = Rojo.

Se teñirán de rojo la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular.

Núcleo celular = Lila, marrón.

7.2 Análisis Morfométrico

Se realizó un conteo morfométrico, en donde se seleccionaron 5 laminillas de inmunocitoquímica de cada uno de los cementos utilizados y se les realizó un contraste con la tinción de Hematoxilina y así poder distinguir las células positivas a las citocinas proinflamatorias utilizadas. Se observaron al microscopio 2 cortes por cada laminilla y en cada uno de los cortes se observaron 5 campos de 400 micras cuadradas, dando como total 10 campos por laminilla y 50 campos por cada cemento, sacando el promedio de células inmunoreactivas positivas a las citocinas proinflamatorias IL1-beta y TNF-alfa. Se utilizó la prueba estadística t de Student para obtener los valores de P.

7.3 Técnica de Inmunocitoquímica

La Técnica de Inmunocitoquímica se realizó de la siguiente manera:

1. Los portaobjetos se colocaron en el horno a 70° aproximadamente durante 5 minutos, hasta que se disolviera la parafina.
2. Se desparafiniza con xilol durante 15 minutos 2 veces.
3. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml. de alcohol más 250 ml. de xilol) durante 5 minutos.
4. Hidratar con alcoholes de grado decreciente.
 - Alcohol al 100% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 90% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 70% durante 5 minutos.
 - Alcohol al 50% durante 5 minutos.
5. Para eliminar la peroxidasa endógena, los cortes se colocan en una solución de 500 ml de Metanol + 4.95 ml. de Peróxido de Hidrógeno al 30% durante 20 minutos.
6. Colocar en alcohol al 50% durante 5 minutos.
7. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
 - Para 2 litros de H₂O₂

- Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4): 43.6 gr.
 - Fosfato de Sodio Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$): 12.8 gr.
8. Lavar con solución Buffer PBS con tritón pH 7.2 - 7.4 durante 10 minutos.
- Para 2 litros de H_2O_2
 - Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4): 43.6 gr.
 - Fosfato de Sodio Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$): 12.8 gr.
 - Tritón X-100: 2 ml.
9. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
10. Colocar pap-pen sobre la laminilla alrededor del corte histológico. (figura 23)
11. Incubación de los primeros anticuerpos
- Anti-IL 1 beta antibody ab9722, .500 mg/ml. polvo rabbit polyclonal to IL 1 beta
 - Anti-TNF alpha antibody ab6671, 1.000 mg/ml. liquid rabbit polyclonal to TNF alpha.
- 11.1 Disolución 1:600, se colocaron 1600 μl . de Buffer PBS con tritón en cada de los tres tubos Eppendorf y después se colocó cada anticuerpo por separado.
- 10 μl . de IL-1beta (se llevó se preparación de los 100 μgr . Con 200 μl . de Buffer PBS sin tritón)
 - 3.5 μl . de IL-1beta 2
 - 3.5 μl . de TNF-alpha
- 11.2 Se utilizaron un total de 24 laminillas, por lo cual fueron 8 laminillas por cada anticuerpo, en cada laminilla se colocó 160 μl . del anticuerpo utilizado. (figura 24) y se dejó incubando por 24 horas a temperatura ambiente.
12. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS con tritón pH 7.2-7.4 durante 15 minutos.
13. Incubación del segundo anticuerpo.
- Goat F(ab)^2 Polyclonal secondary antibody to rabbit IgG (Fab^2) (HRP) pre-adsorbed ab6112, 1.000 mg/ml, liquido marca Abcam, se

preparó con 5 ml. de Buffer PBS sin tritón en combinación con 15 μ l. del anticuerpo.

13.1 Se colocó 160 μ l. del segundo anticuerpo en cada laminilla (total 24) y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

14. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2-7.4 durante 15 minutos.

15. Aplicación del DAB al 0.05% + H₂O₂ al 0.04%

- 5 mg. DAB
- 13 μ l. H₂O₂
- 10 ml. Buffer sin tritón

15.1 Aplicar 166 μ l. en cada laminilla.

15.2 Dejarlo durante 40 a 50 segundos.

16. Lavar con Buffer PBS sin tritón pH 7.2-7.4 durante 5 minutos.

17. Deshidratar con alcoholes de menor a mayor concentración.

- a. OH 50% durante 5 minutos.
- b. OH 60% durante 5 minutos.
- c. OH 70% durante 5 minutos.
- d. OH 100% durante 5 minutos.

18. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml. de alcohol + 250 ml. de xilol) durante 5 minutos.

19. Aclarar con xilol durante 15 minutos 2 veces.

20. Montaje con resina sintética y cubreobjetos.

Una vez que estuvieron listas las muestras se observaron bajo el microscopio fotónico para analizar la presencia de células inmunoreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 beta y TNF-alfa.

8. RESULTADOS

Hematoxilina y Eosina; Tricrómico de Masson.

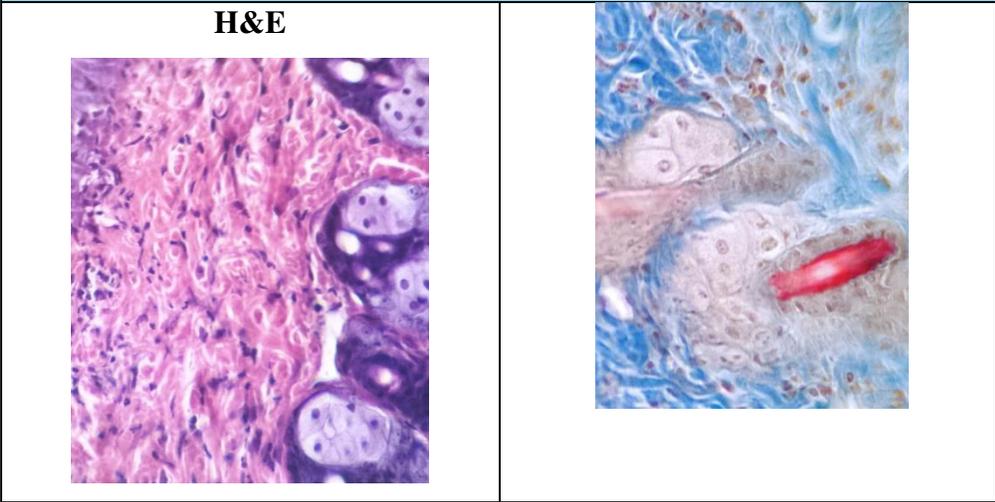
| Tabla No. 1 “Grado de reacción inflamatoria presentada por los diferentes cementos de sellado apical” | | | |
|--|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| Cemento | Tiempo | Hematoxilina y Eosina | Tricrómico de Masson |
| AH Plus | 24 horas | Grado II | Grado II |
| | 7 días | Grado I | Grado I |
| Sealapex | 24 horas | Grado II | Grado II |
| | 7 días | Grado I | Grado I |

| Cuadro 1. “Categorías de las Reacciones Inflamatorias” | |
|---|---|
| Grado I | Sin filtrado inflamatorio |
| Grado II | Leve filtración de células inflamatorias y ondulados depósitos de fibra de colágeno y fibrosis. |
| Grado III | Densa filtración de células inflamatorias, áreas limitadas de edema tisular y congestión vascular. |
| Grado IV | Filtración muy densa de células inflamatorias agudas y crónicas, áreas edematosas generalizadas y congestión vascular junto con depósitos de fibrina. |

Cuadro 1. Evaluación de las reacciones inflamatorias de acuerdo a los criterios de Robbins y Cox (Cox et. al., 1996; Robbins et. al., 1991).

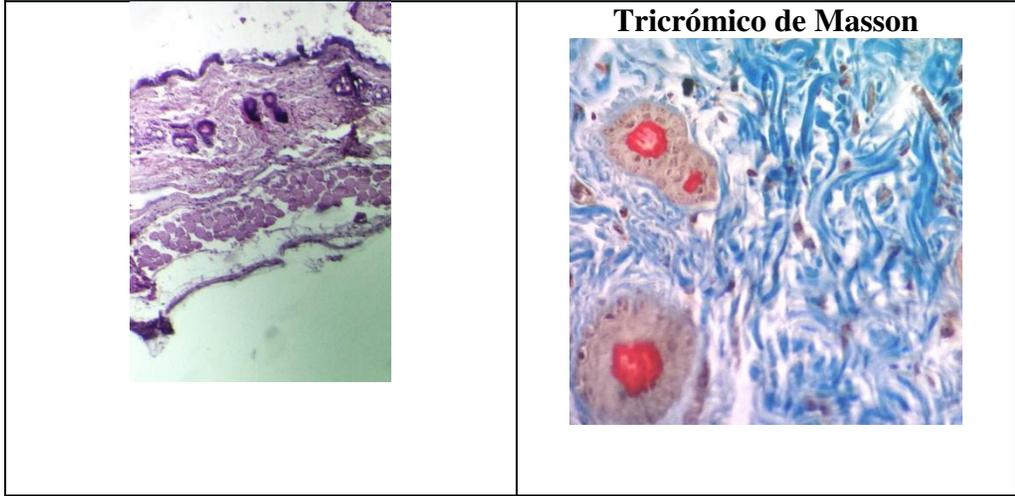
| Tabla No. 2 “Reacción inflamatoria AH Plus” | |
|--|---------------------------------------|
| Tiempo de toma de muestra | Reacción inflamatoria presente |
| 24 Horas | Grado II: Leve filtrado inflamatorio |
| 7 Días | Grado I: Sin filtrado inflamatorio |

Figura No. 1
“Presencia de reacción inflamatoria del AH Plus a las 24 horas”



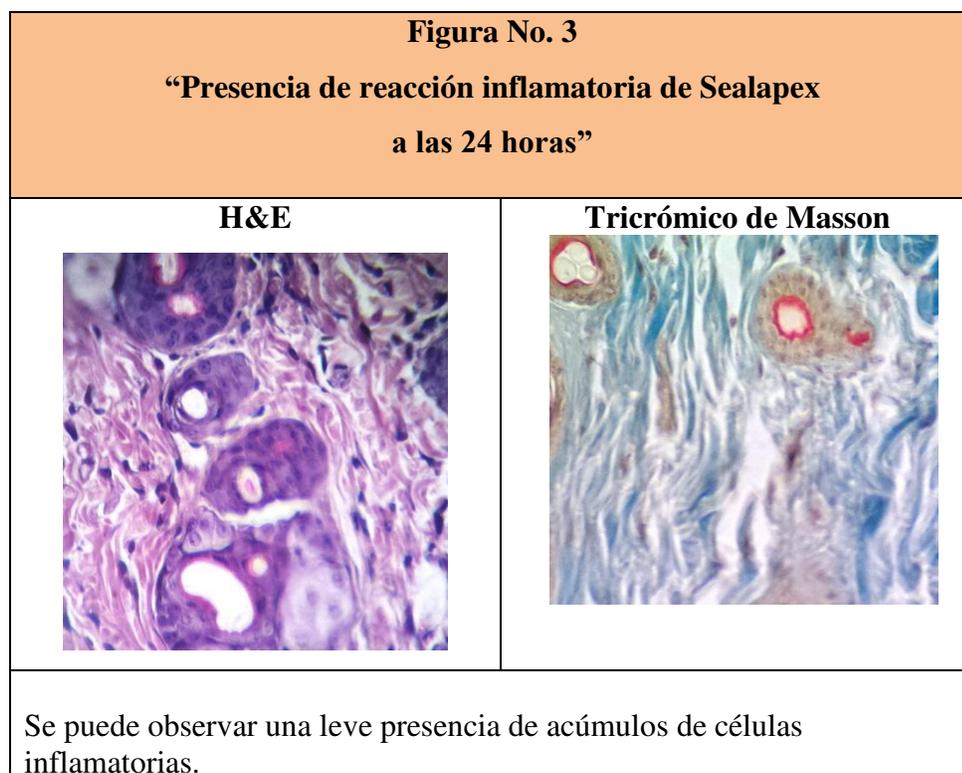
Presencia de células inflamatorias

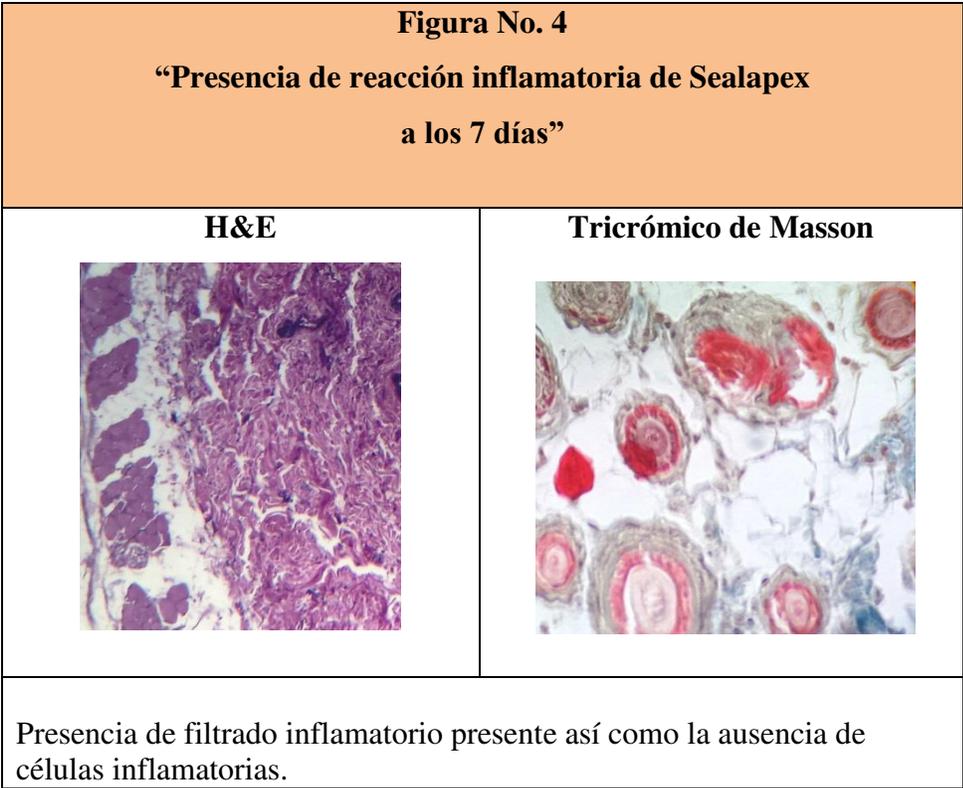
Figura No. 2
“Presencia de reacción inflamatoria de AH Plus a los 7 días”



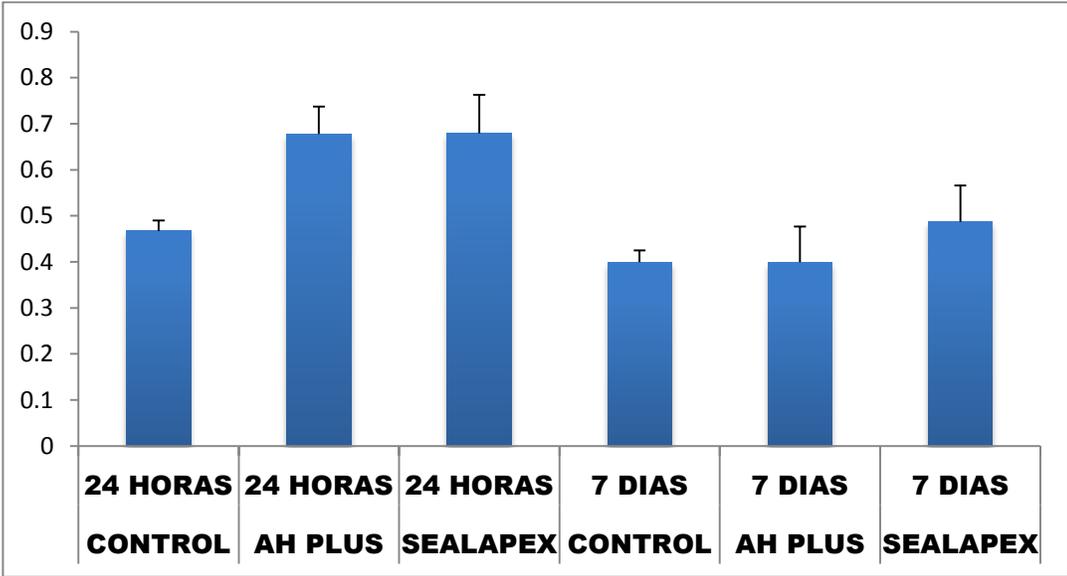
No hay presencia de filtrado inflamatorio y ausencia de células inflamatorias.

| Tabla No. 3 “Presencia de reacción inflamatoria de Sealapex” | |
|---|---------------------------------------|
| Tiempo de toma de muestra | Reacción inflamatoria presente |
| 24 Horas | Grado II: Sin filtrado inflamatorio |
| 7 Días | Grado II: Leve filtrado inflamatorio |



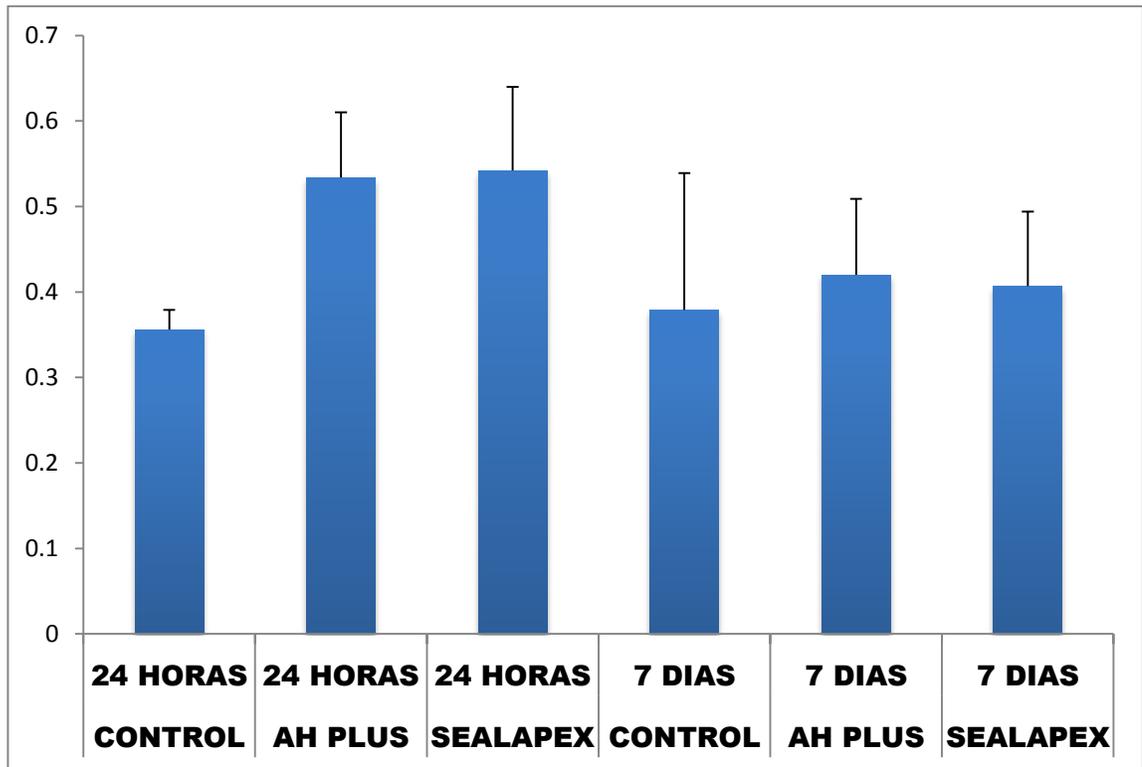


IL1-beta

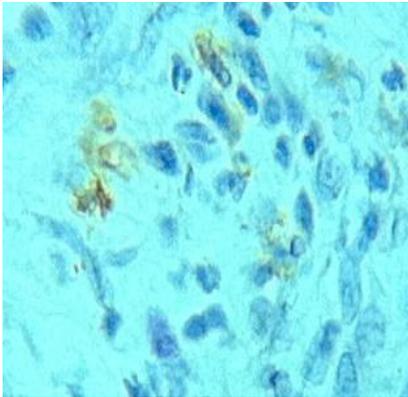


Se muestra la media de la cantidad de células inmunoreactivas a IL1-beta a los diferentes tiempos y con los cementos analizados.

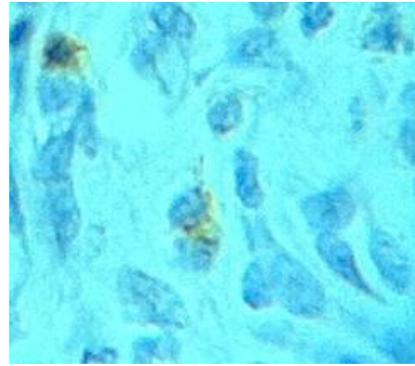
TNF-alfa



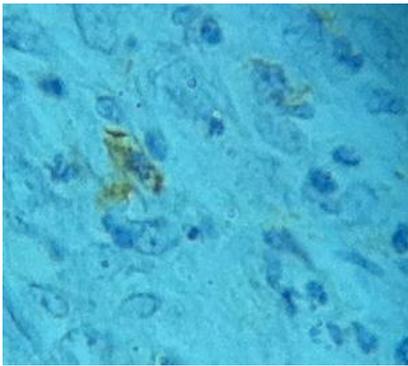
Se muestra la media de la cantidad de células inmunoreactivas a TNF-alfa a los diferentes tiempos y con los cementos analizados.



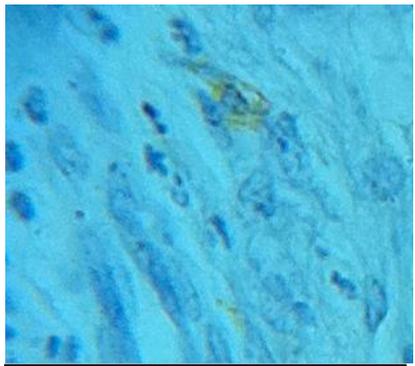
IL1-beta 24 horas AH Plus



TNF-alfa 24 horas Sealapex



IL1-beta 7 días AH Plus



TNF-alfa 7 días Sealapex

9. DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra mediante un análisis histopatológico y de producción de citocinas proinflamatorias que el sellador a base de resina AH Plus y el sellador a base de Hidróxido de calcio presentan una biocompatibilidad semejante.

Según Deas-G, Jiménez; 2005, los experimentos in vivo, tales como las pruebas que impliquen la implantación de material, tienen la ventaja de permitir interacciones que se produzcan entre el huésped y el material utilizado razón por la cual se determinó hacer nuestro estudio en pruebas In Vivo, basados sobre lo implementado en el libro de Ingle y J. West, “*Obturación del espacio radicular*” en 1996 se decidió poner a prueba los efectos citotóxicos de los cementos selladores analizados en nuestro estudio efectuando implantes subcutáneos mediante inyección con aguja bajo la piel de animales, el material recién mezclado fue implantado y dejado endurecer in situ para poder juzgar sus efectos a largo plazo.

Los procedimientos que fueron realizados para nuestra investigación de pruebas In Vivo, nos proporcionaron información que conlleva a un mayor entendimiento de la respuesta general del hospedero, como es asegurado por Vajrabhaya L. y Sithisarn, P.; en 1997 ellos concluyen que una prueba In Vivo, nos otorgara información más clara y precisa lo cual permita obtener información valiosa sobre la biocompatibilidad de los materiales sobre las células y tejidos subcutáneos, del mismo modo Craig, R. en su libro en 1998 “*Materiales de Odontología restauradora*”, menciona que la gran ventaja de ensayos In Vivo es que permiten muchas interacciones complejas entre el material y un sistema biológico funcional, por ejemplo, se puede generar una respuesta inmune o del sistema de complemento, difícilmente recreado en un ensayo In Vitro. Lo que permite la obtención de resultados más relevantes.

En los resultados obtenidos en este estudio, se puede observar que sellador endodóntico AH Plus presenta un leve filtrado inflamatorio a las 24 hrs disminuyendo a los 7 días ; concordando con Silveira et.al en el 2011 y con Zaccaro et.al en el 2012 quienes afirman

que la citotoxicidad de todos los materiales parece disminuir de manera similar en una manera dependiente del tiempo; situación muy similar en el estudio de Molloy et. al en 1972).

Se confirma que el AH Plus, sellador endodóntico a base de resina; al pasar el tiempo; de una reacción inflamatoria severa disminuye a moderada siendo éste un material aceptablemente biocompatible (Sousa et. al 2006, Huang et. al 2002).

El Sealapex es un sellador endodóntico a base de hidróxido de calcio con un alto grado de biocompatibilidad ya que su reacción inflamatoria es de leve a moderada (Veloso et. al 2006, Chang et. al 2010)

Por el contrario en la investigación realizada por Scelza et. al en el 2012 asegura que la citotoxicidad del Sealapex fue la mayor considerablemente ante los demás cementos estudiados, no concordando con el presente estudio.

En otro estudio realizado por Jacob et. al en el 2014 menciona que se encontraron muestras de AH Plus de leve a moderado en el primer mes de inoculación ; sin embargo al tercer mes ausencia de inflamación confirmando nuevamente las investigaciones de Zaccaro y Silveira.

Inclusive existe un estudio donde se recomienda la adición de hidróxido de calcio al AH Plus en el conducto radicular mejorando así su comportamiento histopatológico dentro de los primeros 14 días de análisis ; dando como resultado una respuesta inflamatoria menos grave así como una menor citotoxicidad al implantarlo en tejido subcutáneo de ratas (Oliveira et. al 2010).

10. CONCLUSIONES

Después de un análisis histopatológico este estudio demostró que AH Plus y Sealapex tienen semejante biocompatibilidad, el análisis estadístico demostró que los cementos presentaron una biocompatibilidad aceptada; sin ninguna diferencia significativa entre ellos.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer estudios de Biocompatibilidad con Citocinas y Quimiocinas Proinflamatorias en diferentes tiempos, 72 horas, 96 horas, para comparar estadios iniciales y tardíos de la inflamación.

Así como comprobar si el agregar hidróxido de calcio a los selladores endodónticos a base de resina disminuye la reacción inflamatoria.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. *Inmunología celular y molecular*, 5ta edición, 2004; 275-297.
2. Almeida JF, Gomes BP, Ferraz CC, Souza-Filho FJ, Zaia AA. Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers, *J Endod.* 2007; 40:692-9.
3. Araki K, Suda H, Spangberg LS. Indirect longitudinal cytotoxicity of root Canal sealers L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 1994; 20:67-70.
4. Ashraf H, Moradimajd N, Mozayeni MA, Dianat O, Mahjour F, Yadegari Z, Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line, 2012,549-53.
5. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new Epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000; 26:462-5.
6. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392: 565-568.
7. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245-52.
8. Bellizzi R, Cruse WP. A historic review of endodontics. *J Endod.* 1980; 6: 576-80.
9. Bhalla M, Thami GP. Acute urticaria due to dental eugenol. *Allergy.* 2003; 58: 158-164.
10. Craig, R. *Materiales de Odontología restauradora*. Ed. Harcourt Brace. 11 edición. 1998 Pág. 126-162.
11. Cruse WP, Bellizzi R. A historic review of endodontics part 1. *J of endodon.* 1980; 6: 495-9.
12. Cruse WP, Bellizzi R. A historic review of endodontics part 2. *J of endodon.* 1980; 6: 532-5.
13. Cohen S, Burns RC, Cap 8. *Endodoncia las vías de la pulpa* 5° ed. 1993; pp. 257-279.
14. Deas-G, Jiménez, R Gurgel Filho ED. The citotoxicity of MTA and Portland endotelial cells. *Int J Endod .* 2005; 38 : 604-609.
15. DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ. On the edge: The physiological and Pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol.* 1999; 11: 95-104.
16. Dorn SO, Gartner AH. Retrograde filling materials: a retrospective success-failure study of amalgam, EBA and IRM. *J Endod.* 1990; 16: 391-3.
17. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod.* 1995; 21: 122-7.
18. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Sciencie.* 1996; 272: 50-3
19. Gebhardt R.F. "Survey of North American Portland Cements:1994", *Cement, Concrete and Aggregates, CCAGDP, Vol.17. N°2, Dec.1995, pp. 145-189.*

20. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *J Endod.* 2001; 27:12-21.
21. Grossman LI. Endodontics: a peep into the past and the future. *Oral Surg.* 174; 37: 599-608.
22. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod Dent Traumatol.* 1991; 7: 181-5.
23. Hashieh IA, Pommel L, Camps J. Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol based sealers. *J Endod.* 1999; 25: 713-5.
24. Helmus MN, Gibbons DF, Cebon D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. *Toxicol Pathol.* 2008; 36:70-80.
25. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT, The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro, *Biomaterials.* 2002;23:77-83.
26. Ingle J, Bakland L, Beveridge E, Glick D, Hoskinson A. cap 1. *Modern Endodontic Therapy* 5° ed. 2004 pp. 1-4.
27. Ingle, J.; West, J. Obturación del espacio radicular. En *Endodoncia* (Ingle y Backland Editores) 4ta. Edición. Edit. McGraw-Hill. México. 1996 Capítulo 4, pp: 239-323
28. Islam I, Chng HK, Yap UA . Análisis de difracción de rayos-X de trióxido agregado mineral y cemento Portland. *Int J Endod.* 2006; 39 : 220-225
29. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 1998; 24: 82-5.
30. Lasala A. Cap 20. *Endodoncia* 4° ed. 1993; pp. 409-426.
31. Lynch CD, O'Sullivan VR, McGillycuddy CT. Pierre Fauchard: the „father of modern dentistry“. *J. Endod.* 2006; 202: 779-81
32. Mateo Schembri, Peplow George Camilleri Josette, “Analyses of Heavy Metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement”. *J Endod.* 2010;36:1210-1215.
33. Miriam Zaccaro Scelza; Jeffrey Coil; Gutemberg Gomes Alves ,Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts, *Braz. Oral res.* 2012
34. Mondragòn. Cap 13. *Endodoncia* 1° ed. 1995; pp. 153-162.
35. Muruzàbal M, Erausquin J. Response of periapical tissues in the rat molar to root canal fillings with Diaket and AH-26. *Oral Surg.* 1966; 21: 786-804.
36. Noriko Mutoh, Takenori Satoh, Hirotaka Watabe And Nobuyuki Tani Ishii, Evaluation Of The Biocompatibility Of Resin-Based Root Canal Sealers In Rat Periapical Tissue, *Dental Materials Journal* 2013;32: 413–419.
37. Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes Hde C, de Franco MF, Enokihara MM, Duarte MA., Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2010 ;109-15.
38. Paqué F, Sirtes G. Apical sealing ability of Resilon/Epiphany versus gutta-percha/AH Plus: immediate and 16-months leakage. *J Endod.* 2007; 40:722-9.
39. Pertot WJ, Campos J, Remusat M, Proust JP. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg.* 1992; 73: 613-20.

40. Polyzois GL, Dahl JE, Hensten-Pettersen A. Biological testing of dental materials: development of national and international standards. *J Biomater Appl.* 1995; 9: 355-62.
41. Ribeiro Daniel Araki, Marco Antonio Hungaro Duarte. Biocompatibility In Vitro Tests of Mineral Trioxide Aggregate and Regular and White Portland Cements. *J Endod.* 2005; 31: 605-607.
42. Seltzer S, Soltanoff W, Smith J. Biologic aspects of endodontics. V. Periapical tissue reactions to root canal instrumentation beyond the apex and root canal fillings short and beyond the apex. *Oral Surg.* 1973; 36: 725-37.
43. Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL, Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue, *Braz Dent J.* 2011, 21-7.
44. Shahi S, S Rahimi, M Hassan, Capacidad de sellado de trióxido agregado mineral y cemento Portland para la reparación de la perforación furcal: un estudio de pérdida de proteínas. *J Oral Sci.* . 2009; 51 : 601-606
45. Shochat S, Garfunkel A. Neurologic complications arising from overfilled root canals. Report of a case. *Oral Surg.* 1973; 53: 684-688.
46. Siqueira FJ Jr, Fraga RC, Garcia PF. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11: 225-8.
47. Silva LA, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod.* 1997; 23: 86-90.
48. Snyderman R, Goetzl EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science.* 1981; 213: 830-837.
49. Soares JA, Silveira FF, Nunes E. Apical surgery with calcium hydroxide capping of the exposed dentine: a case report. *J Oral Sci.* 2007; 49: 79-83.
50. Soares JA, Silveira FF, Nunes E. Apical surgery with calcium hydroxide capping of the exposed dentine: a case report. *J Oral Sci.* 2007; 49: 79-83.
51. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA, Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers, *J Endod.* 2006; 32: 656-62.
52. Thomson BM, GR Mundy, Cámaras TJ . Tumor necrosis factor α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol.* 1987; 138: 775-779.
53. Vajrabhaya, L.; Sithisarn, P.; (1997). Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int. Endod. J.* 30: 141-4
54. Veloso HH, do Santos RA, de Araújo TP, Leonardi DP, Baratto Filho F., Histological analysis of the biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers., *J Appl Oral Sci.* 2006, 14: 376-81.
55. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989; 320: 365-76.
56. www.dentsply.com.mx/productos/clinica/sealer.asp