



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO CUEPI
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

TESIS

**“Evaluación de la respuesta inmune inflamatoria *in vivo* por medio de
la expresión de TNF- α e IL-6 inducida por cementos MTA y tipo
Portland en preparaciones óseas de ratas Wistar”**

PRESENTA:

C.D. Rubén Abraham Domínguez Pérez

PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

ASESOR DE TESIS: C.D.E.E. Adriana Lucia Arenas Pérez

ASESOR METODOLOGICO: M.C. Héctor Ruíz Reyes

ASESORES EXTERNOS:

M.C. Álvaro Rodríguez Barrón

Biol. Carlos Béjar Lozano

D.C. Alain Rodríguez Orozco

MORELIA, MICHOACÁN

MÉXICO

2011

Dice el maestro:

Si recorres el camino de tus sueños, comprométete con él.

no dejes la puerta de salida abierta,

con la disculpa de: "Esto no es lo que quería".

Esta frase guarda en sí misma la semilla de la derrota.

Asume tu camino. Aunque tengas que dar pasos inciertos,

aunque sepas que puedes hacer mejor lo que estás haciendo.

Si aceptas tus posibilidades en el presente, con toda certeza,

Mejorarás en el futuro. Pero si niegas tus limitaciones,

Jamás te librarás de ellas.

Afronta tu camino con coraje, no tengas miedo de las críticas.

Dios estará contigo en las noches de insomnio,

Y enjugará las lágrimas ocultas con su amor.

Dios es el Dios de los valientes.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores:

C.D.E.E. Adriana Lucia Arenas Pérez

C.D.E.E. Paola Pérez Negrón

C.D.E.E. Fernando Fernández Treviño

C.D.E.E. Martín Alberto Loeza Ramírez

Por compartir sus conocimientos, sus experiencias, permitiéndome enfrentar de forma adecuada cualquier problema endodontico. Por ser parte de mi desarrollo profesional y personal, pues cada uno aportó siempre lo mejor de sí, ayudándome a superarme no solo profesionalmente sino también humanamente. GRACIAS.

A mis Maestros:

M.E.M. Edgar Hugo Trujillo Torres

Por la confianza que siempre ha tenido en mí, el apoyo, el respaldo, por enseñarme a luchar por conseguir lo que quiero, por estar hombro con hombro al pie del cañón enfrentando lo que se nos ponga enfrente, siempre viendo como ser mejores.

M.C. Héctor Ruiz Reyes

Por abrirme los ojos al mundo de la investigación de calidad, seria y desinteresada, por apoyarme particularmente en el desarrollo de éste proyecto de investigación

M.C. Álvaro Rodríguez Barrón

Por su gran sencillez, por demostrar que aún existen personas desinteresadas que ayudan por el gusto de hacerlo, por compartir sus conocimientos sin esperar nada a cambio sólo por disfrutar su trabajo.

Biol. Carlos Bejar Lozano

Por su apoyo en la realización de los inmunoensayos, por demostrar que sí podemos hacer lo que nos gusta y vivir de ello. Por brindarnos todo ese tiempo requerido en el laboratorio.

D.C. Alain Rodríguez Orozco

Por sus palabras de aliento, por compartir un poquito de sus grandes conocimientos, por aportar ideas. Por su apoyo en mis nuevos y próximos proyectos.

AGRADEZCO TAMBIÉN A:

Asociación Mexicana de Endodoncia A.C.

Por el apoyo económico brindado a través de su fondo para la investigación en endodoncia a través del Premio al Protocolo de Investigación 2010.

Al bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH

En especial a la MVZ. Madeleine, por todas sus atenciones, conocimientos y amistad, a Don Efra por estar al pendiente de mis “gordas”

Al Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”

Por facilitarme un espacio para trabajar y disponer de su equipo para desarrollar los ensayos.

Al Departamento de inmunología de los laboratorios Servimed

Por poner a mi disposición equipo y conocimientos de primer mundo.

Gracias también a mis “gordas”

Pues por ellas, ésta investigación fue posible, y con ellas el comienzo de algo importante.



DEDICATORIA

A mi familia:

A mi Padre: El Ing. Rubén Domínguez Chávez; Gracias papá, por exigirme excelencia, por enseñarme disciplina y constancia en el trabajo, cualquiera que este sea, por mostrarme que siempre podemos conseguir lo que nos proponemos y más importante enseñarme a soñar, a soñar cosas grandes y que esos sueños se pueden cumplir. “Todo es posible si trabajamos en ello”

A mi madre: La Sra. Marisela Pérez Cortes, por brindarme la vida, por ser el complemento a mi padre en mi formación, por estar siempre ahí, incondicional, atenta a mis problemas y preocupaciones, por ser mi madre, gracias, eres única.

A mis hermanos: La Lic. Maricel Domínguez Pérez y el Próximo C.D. Ricardo Domínguez Pérez. Por ser mis hermanos, quererme y apoyarme como soy, por darme ratos de alegría.

A mi Preciosa, Nancy Rosas García, para ti una dedicación especial, pues desde que estamos juntos me has apoyado siempre con los ojos cerrados en todas mis locuras, por tus palabras de aliento, por sacrificar junto conmigo muchas cosas, por aguantar mis ratos de estrés mis enojos, ahh y también por aguantar a mis “gordas” pues por mucho tiempo les puse más atención a ellas que a ti. Por amarme a pesar de mis defectos. Por todo, gracias, te amo.

A mis compañeros de generación: No podían faltar “canijos”, gracias por hacerme parte de su grupo, por brindarme su amistad y apoyo, son parte importante de mi vida, gracias a mi compadre el Richard, al Rober, la Mary, Dora, la Chonchis(Jorge), el Zipy, el Beto, el Michel, el Toño, Oliver y también el Juanito.

Justo cuando encontré las respuestas.

Habian cambiado mis preguntas

ÍNDICE GENERAL

| | PÁGINA |
|--|--------|
| RESUMEN. | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN. | 10 |
| 2. ANTECEDENTES. | |
| 2.1 ANTECEDENTES GENERALES | 20 |
| 2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS. | 23 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 24 |
| 4. JUSTIFICACIÓN. | 24 |
| 5. HIPÓTESIS. | 25 |
| 6. OBJETIVOS. | |
| 6.1 OBJETIVO GENERAL. | 26 |
| 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. | 26 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS. | |
| 7.1 CARACTERÍSTICAS DEL UNIVERSO DE ESTUDIO. | 27 |
| 7.2 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD | 27 |

| | |
|---|----|
| 7.3 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO. | 27 |
| 7.4 METODOLOGIA. | 28 |
| 8. RESULTADOS. | 40 |
| 8.1 ANALISIS ESTADISTICO | 49 |
| 9. DISCUSIÓN. | 50 |
| 10. CONCLUSIONES. | 51 |
| 10.1 RECOMENDACIONES | 52 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA. | 53 |
| 12. ANEXOS. | |
| 12.1 IMÁGENES RADIOGRÁFICAS | 56 |
| 12.2 FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS ELISA | 58 |
| 12.3 PROTEINA “C” REACTIVA | 60 |
| 12.4 ETICA EN MANEJO DE ANIMALES PARA EXPERIMENTACION | 61 |
| 12.5 IMÁGENES DEL CONTEO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS | 63 |
| 12.6 PREMIO NACIONAL AL PROTOCOLO DE INVESTIGACION 2010 | 64 |
| 12.7 PREMIO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN 2011 | 65 |

RESUMEN.

El propósito fue comparar las respuestas inmune inflamatorias sistémicas que desencadenan las implantaciones óseas de diferentes cementos (MTA Angelus, CPM, Portland “Tolteca” e IRM) *in vivo*, mediante el análisis molecular de dos citocinas, la interleucina-seis (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), además de un análisis de proliferación de leucocitos total y diferencial. Todo esto en muestras sanguíneas de 29 ratas Wistar obtenidas a las 24 horas, 48 horas y 28 días después del estímulo. Por medio de ensayos inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISA). Los principales resultados indican que respecto a la expresión de IL-6 los cementos MTA (Angelus y CPM) presentan comportamientos similares manteniéndose dentro de un rango de estimulación mucho menor respecto a los cementos Tolteca e IRM ($P < 0.05$). Se puede concluir que el Cemento Portland “Tolteca” no es un material aceptable debido a su respuesta biológica desfavorable con respecto al MTA Angelus, y que IL-6 podría utilizarse como un biomarcador para valorar la respuesta inmune inflamatoria sistémica ante diferentes materiales empleados en endodoncia.

1.- INTRODUCCIÓN.

Los materiales dentales han sido parte importante en la evolución de la odontología y gracias a los grandes adelantos tecnológicos y bioquímicos, se ha logrado una generación de nuevos elementos con mejores propiedades físicas, químicas y biológicas.

Las apicectomías y la colocación de retro obturaciones se han realizado desde mediados del siglo XVIII¹ y aunque se han estudiado muchos materiales en un esfuerzo para encontrar un material de obturación ideal, aún no existe aquel que logre reunir todos los requisitos necesarios para poder llevar a cabo la odontología moderna.

Idealmente, el material de reparación, debe ser no- tóxico, bacteriostático y no reabsorbible; debe promover la cicatrización tisular y proveer un sellado hermético óptimo. Dentro de los diferentes materiales que se han empleado para este propósito se encuentran: Amalgama, Cemento de Oxido de Zinc y Eugenol, Cemento de Oxifosfato de Zinc, Gutta- percha, Cementos zinquenólicos, Ionómeros de vidrio, Hidróxido de Calcio, Hidroxiapatita y finalmente el Agregado de Trióxido Mineral o Mineral Trioxide Aggregate de donde provienen sus siglas (MTA), que fue desarrollado y reportado por primera vez en 1993 por Torabinejad y cols.²

Los materiales que se mencionan anteriormente, han sido utilizados para la reparación de procesos radiculares, especialmente en perforaciones laterales y más tarde éstos han sido probados y comparados con el MTA tanto *in vitro* como *in vivo*.

El MTA ha sido estudiado ampliamente como material para sellar las comunicaciones entre el sistema de conductos radiculares y los tejidos perirradiculares. Sus propiedades han sido evaluadas *in vitro* e *in vivo* en la bibliografía, pero todavía no existen estudios ni resultados a largo plazo. Los estudios disponibles parecen demostrar que éste material es prometedor para utilizarse tanto en perforaciones radiculares como en obturaciones retrógradas y en el tratamiento de exposiciones pulpares, gracias a que tiene la cualidad de formar puentes dentinarios, ser biocompatible, de pH alcalino y no favorecer la inflamación.^{3,4}

El MTA recibió su aprobación por U.S. Food and Drug Administration (Administración o Federación de Drogas y Alimentos de Estados Unidos) en 1998. Desde su primera descripción en la literatura dental por Torabinejad y Cols. en 1993, el MTA ha sido utilizado en aplicaciones quirúrgicas como no quirúrgicas.⁵

En 1999 Wucherpfennig⁶ comienza una controversia, pues publica que el cemento Portland (CP) utilizado en la industria de la construcción tiene características muy similares al MTA, su composición química fue analizada a través de diversas investigaciones, donde se utilizaron técnicas de difracción de Rayos X con espectrómetro de energía dispersa conjuntamente con el microscopio electrónico.^{1,2,7} Wucherpfennig y su equipo, analizaron ambos cementos resultando idénticos macroscópica y microscópicamente, los dos indujeron a la formación de una matriz mineralizada en dientes de ratas adultas que fueron sometidas a recubrimientos pulpares directos, los cementos resultaron con grados de biocompatibilidad con el tejido muy similares y ambos materiales están constituidos principalmente por calcio, fosfatos y silicatos. Estos reportes preliminares sugieren el uso del CP como alternativa al MTA. Estos datos concuerdan con los reportados por Estrela y cols.⁸ en el año 2000, donde se concluye que los elementos químicos de

ambos cementos son los mismos con excepción del Bismuto que actúa como agente radiopacador en el MTA.

El cemento Portland fue creado por Joseph Aspdin, constructor y químico Británico, que el 21 de Octubre de 1824 presentó el primer proceso de fabricación del cemento al que llamo de Portland, por las semejanzas de color y dureza que tenia su invento con las piedras que se encuentran en la isla de Portland (Inglaterra)⁹, el cemento Portland puede definirse como el aglomerante que se obtiene por pulverización resultante de la calcinación hasta la fusión incipiente de una mezcla íntima y convenientemente equilibrada de materiales calcáreos y arcillosos, sin ningún agregado de otras sustancias después de la calcinación, excepto agua y yeso^{10,11} El cemento Portland blanco difiere del cemento Portland gris únicamente en el color, se fabrica conforme a las especificaciones de la norma ASTM C 150; normalmente el proceso de manufactura es el mismo, sin embargo, es controlado de tal manera que el producto final sea blanco. El cemento Portland blanco es fabricado con materias primas que contienen cantidades insignificantes de óxido de hierro y de manganeso, que son las sustancias que dan el color al cemento gris, se utiliza para fines estructurales y arquitectónicos, como muros precolados, aplanados, pintura de cemento, paneles para fachadas, pegamento para azulejos y como concreto decorativo. Para la elaboración del CP se requiere de un clinker (pequeñas esferas), que se obtiene por la calcinación de materias primas como caliza y arcillas blancas tipo caolín a una temperatura de 1450 a 1500 C°, durante determinado tiempo; posteriormente al enfriarse dichos productos forman silicatos de calcio y aluminatos de calcio que una vez mezclados con el resto de los componentes originan el CP.¹²

Las semejanzas que presenta el CP con el MTA, sugieren su uso como alternativa al MTA en función a su bajo costo, sin embargo, el CP puede contener impurezas que afecten sus propiedades dependiendo del sitio, proceso de extracción y manejo de sus componentes así como de su fabricación. Los componentes y características de los cementos pueden variar mucho de un país a otro de acuerdo a las normas de calidad de cada uno de ellos, los cementos se clasifican según su resistencia mecánica, su resistencia química o características de durabilidad, según sus componentes y usos.

Los estudios para evaluar el efecto de nuevos materiales, medicamentos o terapias en seres humanos son restringidos, por lo que, se requiere de modelos alternativos de estudio para estos fines, esto da lugar al uso de animales como modelos experimentales.

En 1933 Dixon y Rickert¹³ proponen un método para evaluar la respuesta del tejido subcutáneo a la implantación de diversos materiales de uso odontológico, sin embargo, Torneck¹⁴ en 1966 lo modifica utilizando tubos de polietileno que implanta en el tejido subcutáneo de ratas, un año después, Phillips¹⁵ implanta en tejido subcutáneo de ratas Wistar, 4 tubos vacíos con la finalidad de observar la respuesta del tejido al polietileno evaluando la zona en contacto con el tubo; con el pasar de los años esta metodología siguió modificándose, y es hasta 1969 cuando Langeland y cols.¹⁶ describen varios métodos de estudio de la respuestas biológicas provocadas por materiales endodonticos, para ello, implantaron tubos de polietileno en el tejido subcutáneo de ratas, actualmente se recomienda por la Asociación Dental Americana (ADA)¹⁷⁻¹⁹. y la Organización Internacional de Estandarización (ISO)²⁰⁻²² como prueba preliminar para evaluar *in vivo* la toxicidad de materiales cuando se dejan en contacto prolongado con tejidos subcutáneos.

Esta metodología ofrece diversas ventajas en cuanto al control de los animales antes y después de ser sometidos a la implantación del material, la cual es fácil y permite la posibilidad de trabajar en varios animales en un corto periodo de tiempo, compara la respuesta del tejido en un mismo animal para diferentes materiales experimentales implantados y el costo para su desarrollo es relativamente bajo.

Estas implantaciones de material dentro del organismo vivo pueden ser consideradas como entidades irritantes de carácter químico o mecánico que estimulan la actividad celular y humoral a su alrededor. Muchas de las características de la respuesta tisular a los implantes son comunes al proceso de reparación de tejidos tras un traumatismo o incluso tras una infección.

Según Hedrich²³ la rata Wistar (*Rattus Norvegicus*) es ideal para realizar investigaciones en el área biomédica, pues representa un excelente modelo gracias a su tamaño en comparación con otros animales utilizados para experimentación, ello facilita su manejo y control para experimentos fisiológicos y toxicológicos, además, su metabolismo acelerado, permite la obtención de resultados en un corto período de tiempo.

La respuesta local de un huésped frente a un material implantado es un fenómeno dinámico, una secuencia de eventos que está influenciada por las condiciones circundantes inducidas por el propio material. Dichos eventos están determinados por la actividad de diferentes tipos celulares que a su vez está modulada por una serie de sustancias bioquímicas presentes o que son liberadas en el tejido afecto.

La degradación de muchos materiales depende del ambiente biológico circundante. Cuando la inflamación inicial es importante, el número de células y su actividad es alta, de tal forma que el tejido se hace muy hostil frente al material y la alta concentración de enzimas, peróxidos y radicales libres hacen que su degradación sea mayor. De esta forma se establece un círculo vicioso, puesto que cuanto mayor es la degradación del material, mayor se hace el estímulo inflamatorio²⁴.

La primera respuesta a una agresión tisular es la inflamación aguda, esta tiende a eliminar o a contener al agente agresor y a eliminar el tejido dañado o necrosado. Los leucocitos, los neutrófilos y monocitos desempeñan un rol importante en esta etapa. Si la agresión tisular persiste se pasa a una fase de inflamación crónica, que se caracteriza básicamente por la proliferación celular. Son típicos de esta fase los fibroblastos, las células plasmáticas y los linfocitos. Como fase final en la reparación de tejidos aparece el tejido de granulación. Cuando el estímulo inflamatorio es persistente, como en el caso de implantación de la mayoría de los biomateriales, se puede llegar a una etapa de fibrosis y encapsulación²⁵.

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular y se consideran como factores solubles, no antígeno específicos que son producidos principalmente por leucocitos e intervienen en la regulación de las respuestas celulares del sistema inmune y procesos inflamatorios. Estas moléculas están implicadas en las respuestas frente a agentes infecciosos, pero en ocasiones pueden ser responsables de procesos patológicos. Los grupos de citocinas se clasifican en interleucinas (IL), interferones (IFN), factores estimuladores de colonias (CSF), factores de necrosis tumoral (TNF), factores transportadores de la diferenciación celular y quimiocinas.

Las citocinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos.

Las citocinas presentan una serie de características funcionales comunes:

- 1) La secreción de citocinas es un suceso breve y autolimitado. En general no se almacenan en la célula, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción génica de corta duración. La síntesis de citocinas es por tanto un proceso transitorio.
- 2) Las citocinas ejercen un efecto autocrino, yuxtacrino o paracrino.
- 3) Las citocinas producen sus efectos uniéndose a receptores específicos de alta afinidad alterando en las células diana los patrones de expresión génica.
- 4) Muchos tipos individuales de citocinas, pueden producirse por diversos tipos celulares. Por ello, se tiende cada vez más a denominar a estas moléculas como citocinas, en vez de linfocinas o monocinas.
- 5) Sus acciones se solapan ya que son realizadas por varios tipos de citocinas diferentes.
- 6) Es usual que un tipo de citocina influya sobre la síntesis de otro, produciéndose cascadas en las que una segunda o una tercera citocina, puede mediar las mismas acciones biológicas de la primera, o suprimirlas. Esta propiedad de aumentar o suprimir la producción de otras citocinas, proporciona un mecanismo regulador muy importante para las respuestas inmunes.
- 7) A menudo, dos citocinas pueden tener un efecto sinérgico, aunque también en ocasiones distintas citocinas tienen efectos antagónicos.

8) Las citocinas son moléculas pleiotrópicas, es decir actúan sobre diferentes tipos de células induciendo sobre ellas efectos variados. En muchos casos, una citocina puede interactuar con diferentes tipos celulares que expresan receptores para ella.

9) Una única célula presenta receptores para múltiples citocinas.

10) La unión de una citocina a su receptor altera la expresión de receptores tanto para la propia citocina como para otras.

Las citocinas ejercen sus efectos biológicos en presencia de otras citocinas, presentando en varias ocasiones interacciones sinérgicas o antagónicas, en la misma célula diana. Debido a estos hechos, las distintas estirpes celulares pueden activarse de forma diferencial en un ambiente que presenta una misma combinación de citocinas.

Las citocinas mediadoras de inmunidad natural son las que protegen frente a la infección viral (interferones de tipo I, MIP 1- α , RANTES) y las que inician las reacciones inflamatorias que defienden frente a las infecciones bacterianas (IL-15, TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18).

El **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)**, es una proteína que existe en una forma libre y también como molécula de membrana. El TNF- α es producido por células T activadas, mastocitos y macrófagos tras estimulación por endotoxinas bacterianas, factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF), IFN δ IL-2 ó IL-15. El TNF- α fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y causante de necrosis hemorrágica de tumores *in vivo*. El TNF- α es el principal mediador de la respuesta inmune frente a bacterias Gram negativas y que el estímulo más potente para su producción son los lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Después de la actuación por LPS, el IFN δ regularía positivamente su síntesis.

El TNF- α ejerce numerosos efectos *in vivo* que son muy dependientes de su concentración. A concentraciones bajas el TNF- α actúa localmente como un mediador paracrino que provoca aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en los fagocitos mononucleares. También coestimula la activación de linfocitos T y B. En células del endotelio vascular y fibroblastos, estimula la producción de CSFs y aumenta la expresión de moléculas del MHC de clase I. Cuando las cantidades de TNF- α son mayores, éste actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas: estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado (proteína “c” reactiva) y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio vascular; activa el sistema de coagulación e induce fiebre; suprime la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y contribuye a la inducción del estado caquético.

Sobre los monocitos el TNF- α induce un aumento de la expresión de moléculas de clase I del MHC y liberación de IL-1, cuyas propiedades biológicas se solapan a las del TNF α . Los linfocitos T en reposo carecen de receptores para TNF- α , que aparecen tras su estimulación antigénica. Sobre las células T activadas el TNF- α incrementa el número de receptores para la IL-2, aumenta la proliferación y la producción de IFN δ inducidas por la IL-2. Los linfocitos T activados secretan simultáneamente TNF- α e IFN δ . También los linfocitos B producen TNF- α cuando son activados por el antígeno.²⁶ En presencia de IL-2, el TNF- α incrementa la expresión de receptores para IL-2 en células NK y LAK, así como su actividad citotóxica. Parece probable la existencia de algún lazo de regulación autocrino, ya que las células NK son capaces de producir TNF- α .

La **interleucina 6 (IL-6)**, es una glicoproteína producida por diversos tipos celulares tras su activación por virus, IL-1 o TNF- α . El receptor de IL-6, CD126, está presente en las células T en fase quiescente, y su expresión no aumenta tras la estimulación antigénica²⁹. Por el contrario, las células B en reposo carecen de receptores para la IL-6, adquiriéndolos después de su activación. La IL-6 favorece la diferenciación de células B humanas, sobre las células B *in vitro* aumenta la síntesis y secreción de inmunoglobulinas sin estimular cambios en el isotipo de las Igs producidas³⁰. La IL-6 precisa de la IL-2, aunque sea en cantidades mínimas, para ejercer su acción favorecedora de la diferenciación. La IL-6 actúa como coestimulador de la activación de las células T y de los timocitos.

El **Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF β)** es una glicoproteína que presenta un 30% de homología en su secuencia de aminoácidos con el TNF- α . El TNF- β es producido por los linfocitos T activados y por algunas líneas linfoblastoideas de linfocitos B³¹. El TNF- α y el TNF- β comparten los mismos receptores y en consecuencia sus actividades biológicas.

Por todo esto, las principales citocinas que participan en los acontecimientos celulares y moleculares asociados con los fenómenos de inflamación son IL-1, IL-6, TNF α , IFN δ y algunas quimiocinas.

2.- ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES GENERALES.

Holland y cols.³² observaron la reacción del tejido conectivo subcutáneo de rata a la implantación de tubos de dentina que fueron llenados con MTA, Sealapex, Calciobiotic, AH 26 y AH plus en períodos de 7 y 30 días; donde encontraron, un tejido conectivo fibroso con moderada inflamación crónica y algunas células gigantes en el período de 30 días. En 1998 reportaron que el MTA ofrece un sustrato biológicamente activo para la estimulación de hueso y células a que produzcan reparación. Pérez y cols.³³ reportaron en el 2003 que el MTA podría ser el material ideal ya que induce la regeneración del tejido del ligamento periodontal. Torabinejad y cols.³⁴ utilizaron dos técnicas de cultivo celular y ambas mostraron que el MTA tiene menos toxicidad que la amalgama, IRM, y super EBA. Otro estudio de Torabinejad y cols.³⁵ demostró que no existió inflamación perirradicular cuando se utilizó como obturación final en monos, y una capa completa de cemento se observó sobre el material. Cuando se implanto en tibias y mandíbulas de puercos de guinea mostro una mejor reacción tisular que la mostrada al implantar amalgama, IRM o super EBA. Yalirik y cols.³⁶ examinaron histopatológicamente la biocompatibilidad del MTA y de amalgama implantando estos materiales en tejido conectivo dorsal de ratas por 7,15,30,60 y 90 días. Ellos encontraron respuesta inflamatoria favorable del MTA y de la amalgama al día 90. Además encontraron calcificación distrofica en tejido conectivo adyacente al MTA. Examinaron tejido duro de cicatrización adyacente al MTA cuando se utilizó como material de obturación en perros.

En un estudio realizado por Marília Gerhardt de Olivera y cols.³⁷ Hizo una comparación entre las propiedades químicas del cemento Portland y el MTA, el cemento utilizado fue el Votoran y el MTA Angelus y Pro Root, se realizaron 12 especímenes de cada uno y se analizaron por medio de microscopia electrónica de barrido y con espectroscopia de energía dispersiva para analizar sus porcentajes de elementos químicos y los resultados fueron los siguientes.

| Cemento | C | O | Mg | Si | Ca | Fe | Al | Bi |
|----------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Portland | 10.89% | 30.42% | 1.41% | 10.70% | 37.93% | 1.51% | 4.66% | ----- |
| Pro Root | 10.97 | 30.39 | 0.92 | 6.06 | 36.04 | 2.39 | ----- | 9.20 |
| Angelus | 9.44 | 29.61 | 0.94 | 3.40 | 44.37 | ----- | 0.89 | 9.09 |

Eso indica una muy pequeña diferencia entre los componentes, estos cementos tienen propiedades similares, no tóxicos y permiten la adhesión celular, lo que significa que estimulan la formación de hueso, este estudio demostró que el bismuto solo estaba presente en las dos presentaciones de MTA el cual es utilizado únicamente como radiopacador y no es responsable por la biocompatibilidad del MTA. En conclusión, los cementos probados tienen componentes similares, lo cual soporta que, en lo concerniente a la composición química, el cemento portland es una opción al MTA.

En un estudio realizado por García-Aranda y cols³⁸ se sometieron muestras de 1.-Cemento Portland, 2-MTA Pro Root blanco(Dentsply Tulsa OK, USA) 3.-Pro Root gris(Dentsply Tulsa OK, USA) 4.-MTA Angelus blanco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), 5.-MTA CPM (Medix México D.F. México) a una (EDS) Espectrometría de energía dispersa para observar la composición química elemental, además se observó la microestructura con un (MEB)

Microscopio Electrónico de Barrido, esos estudios arrojaron que el CP y MTA tienen gran similitud, solo que en el MTA encontramos ausencia de Fe, Mg, Na y K y en los cementos tipo MTA se encontró regularmente O, C, Si, Ca, Al, Cl, Bi, y solo en el CPM se detectó presencia de Ba. En el análisis (MEB) en el CP hidratado se observó una microestructura porosa e irregular, el Pro Root blanco y gris al igual que el Angelus se ve una imagen irregular más homogénea que el CP, con la diferencia de que los cementos tipo MTA mostraron algunos gránulos sueltos identificados como bismuto, y en el CPM bismuto y Bario. Bernabe y cols.³⁹ publican que el MTA ProRoot se compone de: 75% de CP, 20% de óxido de bismuto y 5% de sulfato de calcio dihidratado. Camilleri J.⁴⁰ evaluó la composición química del cemento Portland gris y blanco así como también el MTA gris y blanco además de cemento Portland con acelerador que se produce excluyendo el gypso del proceso de manufactura. Este estudio se realizó con análisis dispersivo con rayos x y análisis de difracción con rayos x. Estos estudios arrojaron que todos los materiales que se examinaron tienen similares componentes como el calcio, sílice y aluminio. Los materiales blancos difirieron de los grises por la ausencia de hierro, y el MTA de los cementos Portland por la presencia de bismuto y el prototipo A y B tuvieron composición química similar a los otros cementos eliminaron hierro y sulfuro el prototipo B contenía bismuto. Todos los materiales examinados estaban compuestos principalmente por silicato tricalcico y una menor cantidad de silicato dicalcico, las dos variantes de MTA y el Prototipo B mostraron la presencia de bismuto.

2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

Fu-Mei y cols.⁴¹ investigaron los efectos de dos cementos selladores para endodoncia, el N2 (a base de oxido de zinc y eugenol) y el AH-Plus (a base de resina) sobre células osteoblasticas humanas, las cuales al ser estimuladas con estos materiales expresan diversas sustancias entre las que destacan las citocinas, este estudio evaluó los niveles de expresión genica de IL-6 e IL-8 por medio de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR). Encontrando que la intensidad de la expresión de mRNA IL-8 fue significativamente más alta que la expresión de mRNA IL-6. Especificamente la reacción al estímulo fue:

N2 se detecto a 3 hrs:1.1 IL-6 /4.7 IL-8--6hrs:2.3 IL-6/ 5.5 IL-8--8hrs: 1.9 IL-6/7.3 IL-8

AH Plus a 3 hrs:1.6 IL-6 /3.2 IL-8--6hrs:2.2 IL-6/ 5.7 IL-8--8hrs: 1.5 IL-6/5.8 IL-8

Takashi y cols⁴², realizaron un estudio para cuantificar las concentraciones de IL-1 α , IL-1 β en exudados periapicales de 69 dientes monorradiculares *in vivo*, a todos se les tomó radiografías, se les aisló con dique, se les realizó apertura cameral, y se obtuvo un exudado con ayuda de agujas para irrigación, estas muestras se analizaron mediante la prueba de ELISA, los resultados mostraron significativamente más alto la expresión de IL- 1 α en exudados que contenían pus, comparado con los que no tenían. También se correlacionó que los exudados de dientes con pequeñas radiolucencias contenían cantidades significativamente altas de IL-1 α comparados con los dientes con lesiones radiolucidas extensas. Se analizaron también los niveles de estas interleucinas durante el tratamiento, (transoperatorio) y se encontró incremento en la IL-1 α y decremento de la IL-1 β .

Los niveles fueron: 3.23+- 0.66 ng/ml de IL-1 α y de 6.57 +- 0.73 ng/ml de IL-1 β .

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se han realizado diversos estudios en el mundo que afirman que el MTA y el Cemento Portland son cementos con características muy similares, actualmente el MTA es ampliamente utilizado en diversos procedimientos endodónticos; sin embargo, su elevado costo, hace necesaria la búsqueda de un cemento que compense esta desventaja, escudados en todo esto, algunos colegas están utilizando cemento portland en su practica clínica sin saber realmente si es posible que la implantación de este material desencadene la misma respuesta inmune inflamatoria sistémica que desencadena la implantación de MTA O CPM?

4.- JUSTIFICACIÓN.

El desarrollo de nuevos biomateriales en el mundo ha permitido el éxito de tratamientos endodónticos que tenían pronósticos reservados e incluso desfavorables.

Desafortunadamente muchos de nuestros pacientes en México no tienen acceso a estos materiales debido a su elevado costo, por lo que es importante que en nuestro país se desarrollen materiales que sean accesibles a la población general, con los mismos beneficios, para lograr este objetivo es necesario comenzar por estudiar, comparar y comprender los materiales que existen en el mercado mundial, con esto en el futuro, podremos desarrollar nuestros propios materiales, adecuados a nuestras necesidades.

5.- HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

$$\mathbf{H1: A \neq B = C}$$

El cemento Portland de producción nacional (A) presentará diferentes niveles de expresión de IL-6 y TNF- α , con respecto al cemento Angelus (B) y CPM (C), durante la valoración de la respuesta inmune inflamatoria *in vivo*.

HIPÓTESIS NULA.

$$\mathbf{H0: A = B = C}$$

El cemento Portland de producción nacional (A) presentará la misma expresión de IL-6 y TNF- α , con respecto al cemento Ángelus (B) y CPM (C), durante la valoración de la respuesta inmune inflamatoria *in vivo*.

6.- OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Comparar los niveles de expresión de IL-6 y TNF- α , como biomarcadores de respuesta inmune inflamatoria sistémica, en plasma de ratas Wistar, al ser estimuladas con cementos de MTA Angelus, CPM, cemento Portland (Tolteca) e IRM.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Implantar una muestra de cada uno de los cementos a analizar en cavidades óseas preparadas en ratas Wistar para inducir una respuesta inmune-inflamatoria sistémica.
2. Realizar ensayos de proliferación celular de leucocitos total y diferencial a las 24hrs, 48hrs y 28 días después de la implantación de cada uno de los cementos en las ratas Wistar.
3. Valorar la respuesta inflamatoria inducida por cada uno de los cementos a través de la semicuantificación de la proteína C reactiva.
4. Cuantificar los niveles de expresión de IL-6 y TNF- α inducidas en la respuesta inflamatoria *in vivo* de ratas Wistar, expuestas a los diferentes cementos investigados (MTA Angelus, CPM, Portland “tolteca”, IRM), valorándose a las 24hrs, 48hrs y 28 días de la implantación.
5. Comparar la respuesta inmune inflamatoria sistémica *in vivo* al MTA (Ángelus), MTA (CPM), cemento Portland (tolteca) e IRM.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 CARACTERISTICAS DEL UNIVERSO DE ESTUDIO

Para la realización de este estudio se utilizaron 29 ratas Wistar que cumplieron con los criterios de inclusión. (Bioterio del instituto de investigaciones químico-biologicas de la UMSNH)

7.2 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

a) Criterios de inclusión

Ratas Wistar machos de 500 a 600 gramos de peso, sanos y de 6 meses de edad.

b) Criterios de exclusión

Ratas Wistar enfermos, hembras y que no alcancen o excedan los parámetros de edad y peso establecidos.

7.3 CLASIFICACION DEL ESTUDIO

El presente estudio es **experimental**, pues el investigador modificará las características originales de las unidades estudio.

Prospectivo: Pues los animales serán incluidos antes de presentar el evento de interés.

Longitudinal: Pues implica una evolución de los animales a través del tiempo.

Comparativo: Pues se van a tener varios grupos de animales entre los que se compararán resultados.

7.4 METODOLOGÍA.

1.- Se solicitaron 35 ratas Wistar (*Rattus Novergicus*) las cuales se obtuvieron de 4 camadas, 4 madres diferentes con fechas de nacimiento del 28 y 30 de marzo, éstas se mantuvieron bajo los cuidados del bioterio de la UMSNH durante su crecimiento.



2.-Una vez que cumplieron 5 meses de edad y el peso aproximado, fueron instaladas en sus mismas jaulas y bajo los mismos cuidados del bioterio en un cuarto especial en donde se mantuvieron durante un mes antes de cualquier manipulación para lograr su aclimatamiento.



3.-Se dividieron en grupos de estudio adaptándonos a las 96 pruebas que se podían realizar en cada kit de ELISA. Por lo que los grupos quedaron de la siguiente manera; se utilizaron 29 ratas, a 6 de ellas se les implantó MTA (ANGELUS), A otras 6, se les implantó CPM (MEDIX), a 6 más, se les implantó Cemento Portland (Tolteca), a otras 6, se les realizó todo el procedimiento quirúrgico, pero no se les implantó nada, a 3 más se les colocó cemento de oxido de zinc con

eugenol (IRM) pensando en un control positivo, 2 más se estudiaron sin recibir ningún tipo de estímulo, ni cemento, ni cirugía, para tener referencias normales de nuestras muestras, todas las pruebas se realizaron por triplicado, valorándose a las 24hrs, 48hrs y 28 días.

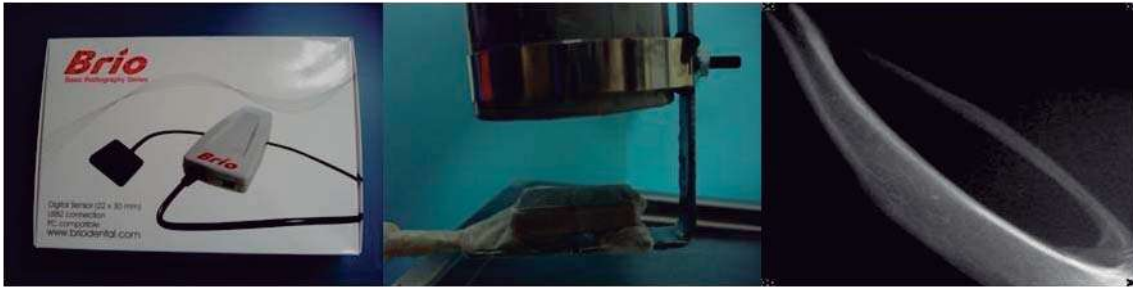


4.- Una vez divididos los grupos se procedió a trabajar las primeras 9 ratas que fueron las que se mantendrían 28 días con la medicación, estas fueron: R1 IRM(C+), R2 CPM, R3 CPM, R4 MTA, R5 MTA, R6 C-, R7 C-, R8 Portland, R9 Portland.

5.- Para esto los animales se anestesiaron con Éter. Se les lavo con jabón y algodón una zona previamente identificada manualmente en la pierna izquierda, y se rasuró el área con un rastrillo desechable hasta dejar la epidermis libre de pelaje. Se realizó antisepsia con isodine en el área rasurada, y se secó con gasas.



6.-Se tomó una radiografía del área que sería intervenida quirúrgicamente con ayuda de un radiovisiografo (Brio) y de un adaptador que nos permitió estandarizar la distancia y un tiempo de exposición de .33 seg.



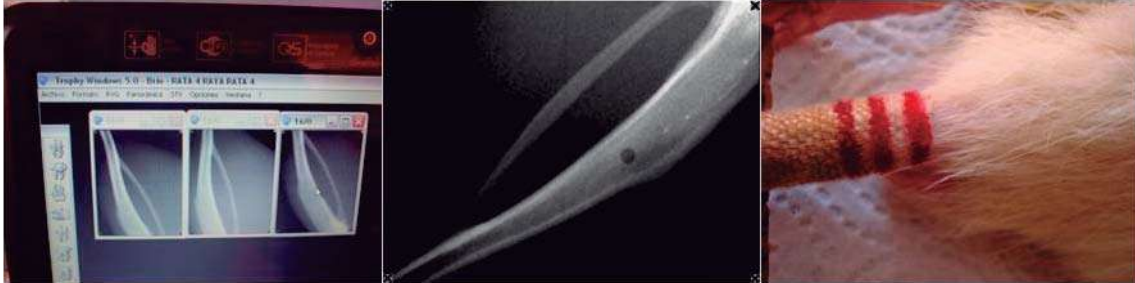
7.- Una vez seca la zona receptora se realizó una incisión de 10mm con ayuda de un bisturí con hoja del número 15 y con una pinza se separó el tejido hasta encontrar el hueso.



8.- Con ayuda de unas pinzas se mantuvo separado el tejido blando mientras con una fresa de bola # 2 montada en una pieza de mano de baja velocidad y abundante irrigación se realizó una cavidad ósea haciendo sólo un movimiento de entrada por salida, de esta forma estandarizamos el diámetro de todas las preparaciones realizadas en este estudio.



9.- Se tomó nuevamente una radiografía antes de colocar la medicación para evaluar la correcta preparación ósea. Además se les marcó la base de la cola para su posterior identificación.



10.-Se preparó el cemento a experimentar, que en este caso fue el MTA (ángelus), siguiendo las instrucciones del fabricante, en una loseta limpia y con una espátula de metal. Para los casos donde se iba a utilizar cemento portland se tomo directamente del saco de 50kgs y se colocó en un frasco esterilclave para esterilizarlo en una autoclave (Gnatus) durante un ciclo de 40 min.



11.- Con ayuda de un instrumento aplicador de resinas se colocó el cemento rellenando la cavidad ósea. Se lavó con solución fisiológica cuidadosamente y se tomó nuevamente una radiografía para observar la correcta colocación del cemento.



12.- Se realizaron dos puntos de sutura simples, con nylon 000 (Surgical), se limpió la herida y se colocó al animal en un recipiente con aserrín limpio y calor hasta su total restablecimiento.



13.-Pasados 5 días de la implantación quirúrgica, se retiraron las suturas de los 9 animales y se limpiaron y desinfectaron nuevamente las heridas. (Únicamente a los animales que estuvieron en un tiempo experimental de 28 días, a los animales con tiempos de 24 y 48 horas, no se les retiraron las suturas)



14.- Cuando cumplieron los 28 días programados, se procedió a tomar las muestras de sangre para ser analizadas de la siguiente manera.

15.-Cada animal fue nuevamente anestesiado con éter, se les realizó un corte a nivel de las costillas para realizar punción cardiaca directa. Mientras este proceso se realizaba, se mantuvo al animal inhalando éter buscando una sobredosis anestésica, para una vez obtenida la muestra, sacrificarlo haciendo cortes en las principales arterias del corazón, logrando así un paro cardiaco y la muerte inmediata sin sufrimiento.



16.-La punción se realizó con jeringas de 5ml (plastipack) y agujas verdes de 21Gx32mm, la sangre fue depositada en 2 tubos BD Vacutainer lilas de 4 mL previamente rotulados “A y B” y 2 mL se depositaron en microtubos eppendorf también rotulados sin anticoagulante, de donde obtendríamos suero. Obteniendo al final un volumen total de 10mL asegurando muestra suficiente para todos los exámenes



17.- Del tubo lila “A” con sangre anti coagulada se tomaron 3 gotas con las que se realizaron 3 extendidos en portaobjetos de vidrio dejando caer una gota en cada uno y con ayuda de otro portaobjetos arrastrando la gota de sangre para lograr el extendido, hecho esto con los tres (triplicado) se dejaron secar.



18.- Del mismo tubo "A" se realizó el conteo de leucocitos con la cámara de Neubauer (Propper) de la siguiente manera: Se llenó la pipeta de thoma con sangre bien mezclada hasta la marca de .5, se mezcló con diluyente Turk y se limpió cuidadosamente la pipeta por fuera, colocándola durante 3 min en un agitador automatizado.



19.- Se desecharon las primeras 3 o 4 gotas de la pipeta y se cargó la cámara de Neubauer, se dejó reposar la cámara durante 3 min. y se llevó al microscopio (zeys) con el objetivo de 10x, se contaron los leucocitos presentes en los cuatro cuadros grandes de los extremos. Para obtener conteo de leucocitos.



20.-Mientras se realizaba todo este procedimiento, el tubo lila “B” se colocó en una centrifuga, junto con el microtubo eppendorf durante 15 minutos a 2500 rpm para obtener del tubo lila: plasma que se utilizaría en los inmunoensayos, y del microtubo: suero que se utilizaría para determinar la expresi3n de PCR (Proteína “C” Reactiva)



21.-Una vez que se obtuvo el plasma fue depositado en un microtubo eppendorf previamente etiquetado, congelando la muestra para su posterior análisis.



22.- El suero fue estudiado en el mismo momento en el que se obtuvo, con ayuda de un kit para la determinaci3n de PCR y siguiendo las instrucciones del fabricante:

- a).- Se agitó el reactivo; y se aplicó una gota sobre el portaobjeto, utilizando una pipeta se agregó una gota del suero a estudiar sin diluir y se mezclaron con la misma pipeta utilizada.
- b).-Se continuó mezclando durante dos minutos más, manualmente y se observaron los cambios macrosc3picos con una fuente de luz indirecta.



c).- Se examinaron por separado los sueros controles, siguiendo los pasos a y b.

d).- La reacción del suero de la rata se comparó con los resultados de los sueros controles, para determinar positivo o negativo a la prueba.

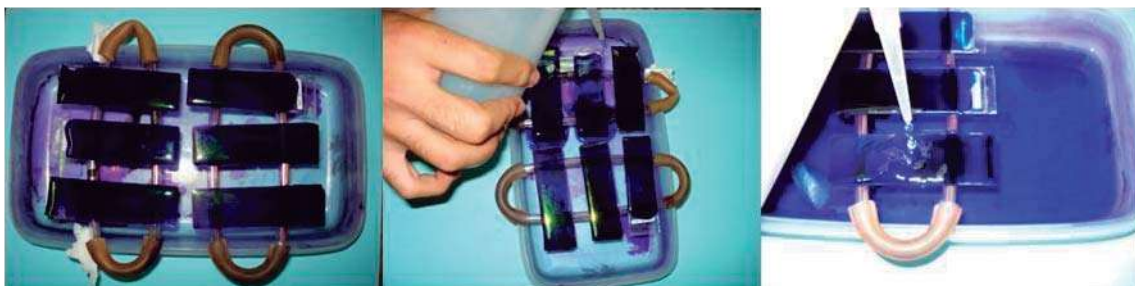


23.- Una vez concluidos los procesos más prioritarios, se procedió a realizar las tinciones de los extendidos sanguíneos por medio de la tinción de Wright, siguiendo las siguientes instrucciones:

a).- Cada portaobjetos con el extendido sanguíneo se cubrió con hemocolorante de Wright durante 15 minutos.

b).- Posteriormente se le agregó buffer pH 7.2 de fosfatos y se dejó 15 minutos más, hasta observar un tono brillante sobre los extendidos.

d) Se lavaron los extendidos con agua corriente y se dejaron secar nuevamente.



24.- Una vez realizadas las tinciones fueron observadas al microscopio con objetivo de 100X y aceite de inmersión para determinar el conteo diferencial de leucocitos, haciéndolo en las 3 laminillas para cumplir con la norma de triplicado. Hasta este punto se obtuvieron resultados de conteo de leucocitos (por cámara de Neubauer), cuenta diferencial de leucocitos (por tinción de Wright), y valoración de expresión de proteína “C” reactiva.

25.- A partir de las muestras (sueros) congelados se procedió a realizar los inmunoanálisis utilizando 2 Kits de ELISA de la marca Invitrogen: 1 kit Interleukin 6 (IL-6) Rat, ELISA system y un kit TNF- α RAT.



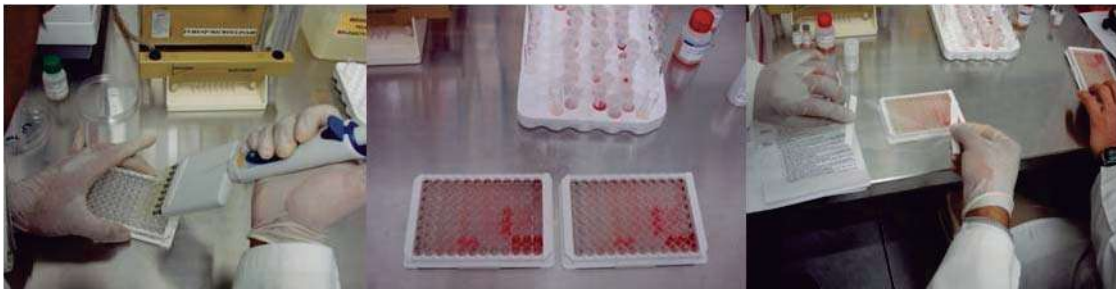
26.-Se identificaron individualmente todos los reactivos, se marcaron las placas y se dejaron atemperar los reactivos y las muestras durante una hora.



27.- Primeramente se agregaron 50 μ L de buffer de incubación a cada pocillo



28.- Posteriormente se agregaron 100 μ L de plasma a cada pocillo ya identificado y marcado, se colocó el sticker para tapar la placa y se incubó la placa durante 2 hrs a 37°C



29.- Una vez concluidas las 2 horas, se aspiró y lavo 4 veces con el buffer de lavado, se agregaron 100 μ L de conjugado de biotina a cada pocillo, se tapó nuevamente la placa, y fue incubada por 1.5hrs a temperatura ambiente.



30.- Se aspiró y lavó nuevamente cuatro veces, para colocar ahora 100 μ L de solución de trabajo de estreptavidina e incubar por 30 min a temperatura ambiente.



31.- Concluido el tiempo, se aspiró y lavó nuevamente cuatro veces y se estabilizó con 100 μ L de cromógeno durante 30 minutos a temperatura ambiente.



32.- Al concluir los últimos 30 min, se detuvo la reacción agregando solución stop a cada pocillo, la lectura de la placa fue a través de un microprocesador de ELISA a 450nm.



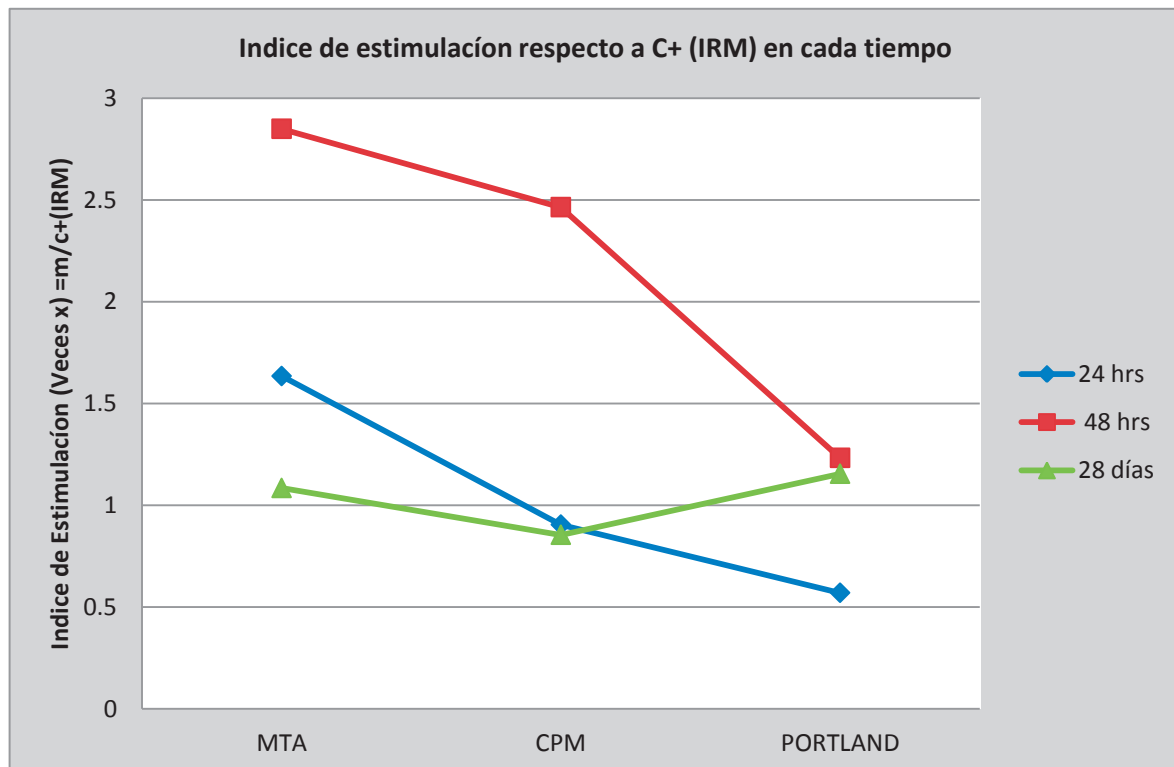
8.- RESULTADOS.

Resultado de los conteos de leucocitos por triplicado directo de la cámara de Neubauer, “datos base para el cálculo de índices de estimulación

| Tiempos | CEMENTOS | MTA | CPM | PORTLAN | IRM | |
|----------|----------|-------|-------|---------|-------|--------|
| 24 HORAS | RATA 1 | 334 | 192.6 | 140.6 | 200.3 | BLANCO |
| | RATA 2 | 322.6 | 170.6 | 88.3 | | RATA 1 |
| 48 HORAS | RATA 1 | 237.5 | 141.3 | 75.6 | 83.3 | 138.6 |
| | RATA 2 | | 270.3 | 130.3 | | RATA 2 |
| 28 DIAS | RATA 1 | 315.3 | 237.6 | 154.6 | 226 | 236.6 |
| | RATA 2 | 176.6 | 150 | 370 | | |

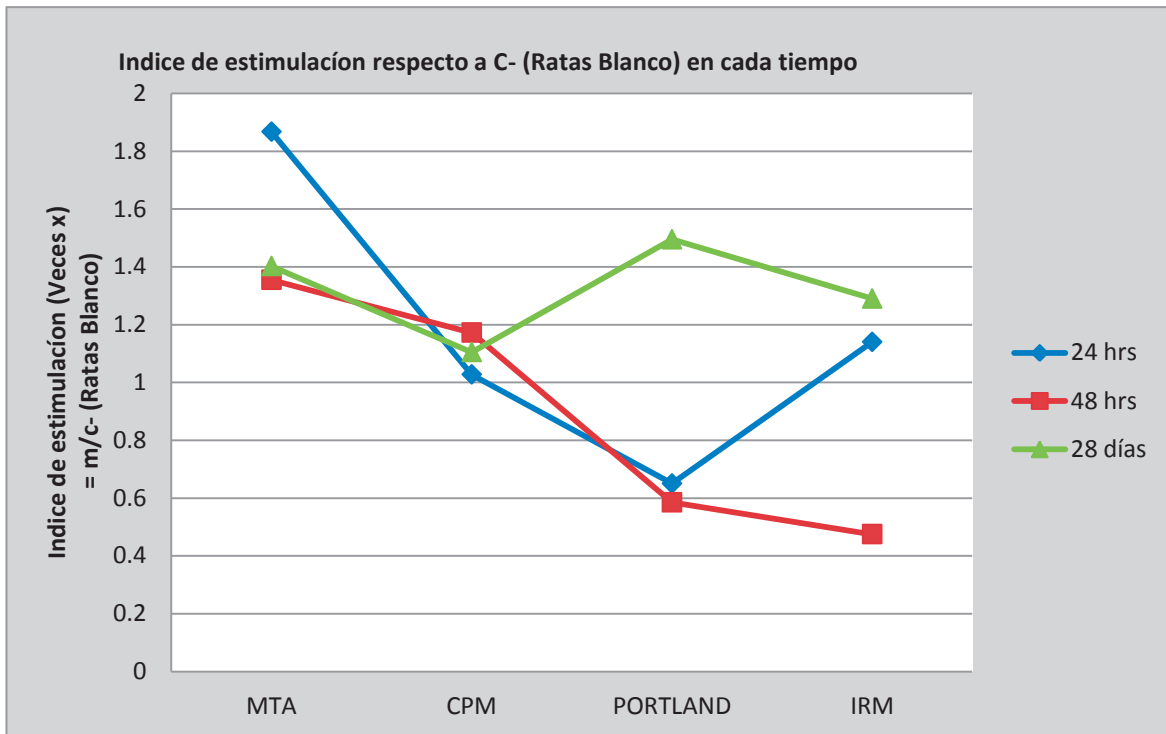
Índice de estimulación respecto a C+ (IRM) en cada Tiempo

| CEMENTOS | MTA | CPM | PORTLAND |
|----------|-------|-------|----------|
| 24 hrs | 1.635 | 0.905 | 0.57 |
| 48 hrs | 2.85 | 2.465 | 1.233 |
| 28 días | 1.085 | 0.855 | 1.155 |



Índice de estimulación respecto a C+ (IRM) en cada Tiempo

| CEMENTOS | MTA | CPM | PORTLAND | IRM |
|----------|--------|--------|----------|-------|
| 24 hrs | 1.8675 | 1.0275 | 0.65 | 1.14 |
| 48 hrs | 1.355 | 1.1725 | 0.585 | 0.475 |
| 28 días | 1.4025 | 1.105 | 1.495 | 1.29 |



Resultados de la cuenta diferencial de leucocitos a las 24hrs, 48hrs y 28 días.

| 24 hrs | MTA | MTA | CPM | PORTLAND | PORTLAND | IRM | C/CX S/ESTML | C/CX S/EST | BLANCO S/CX | BLANCO S/CX |
|----------------|-----|-----|-----|----------|----------|-----|--------------|------------|-------------|-------------|
| CELULAS | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % |
| LINFOCITOS: | 80 | 86 | 77 | 76 | 82 | 79 | 81 | 86 | 88 | 81 |
| MONOCITOS: | 3 | 4 | 3 | 6 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 4 |
| EOSINOFILOS: | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| BASOFILOS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGMENTADOS: | 16 | 9 | 20 | 16 | 15 | 18 | 14 | 13 | 9 | 13 |
| BANDAS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| 48 hrs | MTA | CPM | CPM | PORTLAND | PORTLAND | IRM | C/CX S/EST | C/CX S/EST | BLANCO S/CX | BLANCO S/CX |
|----------------|-----|-----|-----|----------|----------|-----|------------|------------|-------------|-------------|
| CELULAS | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % |
| LINFOCITOS: | 78 | 85 | 72 | 83 | 76 | 85 | 78 | 77 | 88 | 81 |
| MONOCITOS: | 1 | 3 | 5 | 3 | 3 | 1 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| EOSINOFILOS: | 1 | 2 | 4 | 1 | 3 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| BASOFILOS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGMENTADOS: | 20 | 10 | 19 | 13 | 18 | 16 | 16 | 18 | 9 | 13 |
| BANDAS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| 28 DIAS | MTA | MTA | CPM | CPM | PORTLAND | PORTLAND | IRM | C/CX S/EST | C/CX S/EST | BLANCO S/CX | BLANCO S/CX |
|----------------|-----|-----|-----|-----|----------|----------|-----|------------|------------|-------------|-------------|
| CELULAS | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % |
| LINFOCITOS: | 81 | 79 | 87 | 82 | 77 | 71 | 86 | 75 | 77 | 88 | 81 |
| MONOCITOS: | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 6 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| EOSINOFILOS: | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| BASOFILOS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGMENTADOS: | 18 | 16 | 12 | 17 | 19 | 20 | 18 | 21 | 18 | 9 | 13 |
| BANDAS: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Al realizar la prueba estadística de X^2 para la comparación de la expresión celular entre cada uno de los cementos se observó que no existe una significancia estadística a una $P > 0.05$, esto indica que la respuesta celular a estos materiales es muy similar, aún en cinéticas distintas.

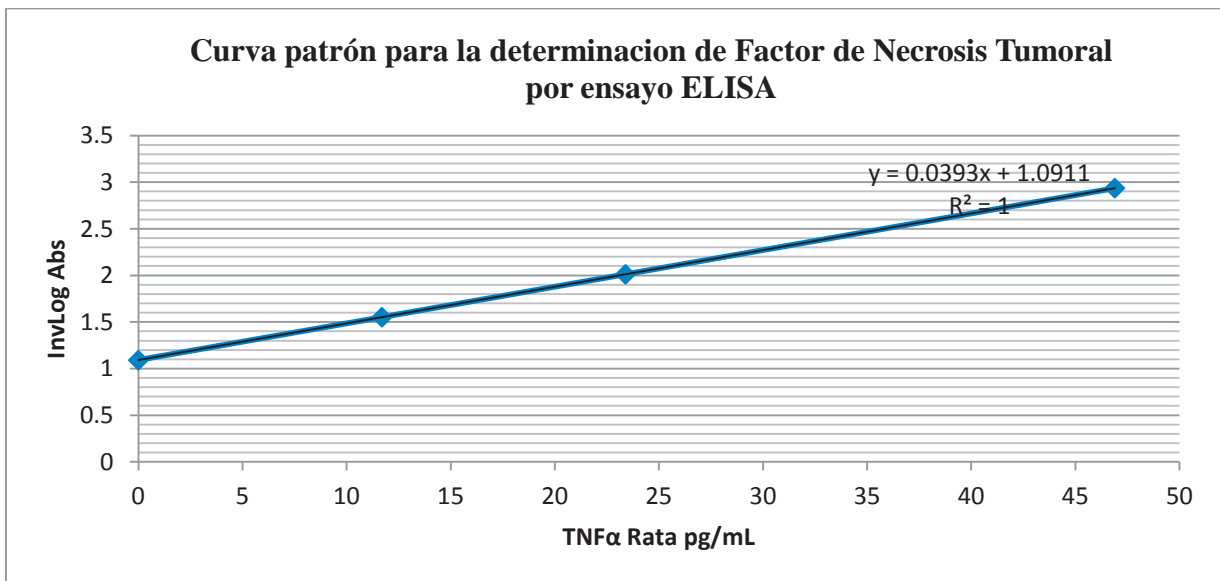
Ajuste de la curva Standard de TNF- α de Rata

| Datos lector ELISA | X | Y | ----- | n=4 |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Absorbancia 450 (nm) | TNF- α rata (pg/mL) | Inv. Log Absorbancia 450(nm) | XY | X ² |
| 0.034 | 0 | 1.08143 | 0 | 0 |
| 0.185 | 11.7 | 1.53108 | 17.913636 | 136.89 |
| 0.264 | 23.4 | 1.8365 | 42.9741 | 547.56 |
| 0.4685 | 46.9 | 2.94103 | 137.934307 | 2199.61 |
| ----- | $\Sigma X = 82$ | $\Sigma Y = 7.39004$ | $\Sigma XY = 198.822043$ | $\Sigma X^2 = 2884.06$ |

$$m = \frac{\Sigma Y \Sigma X - n \Sigma XY}{(\Sigma X)^2 - n \Sigma X^2} \quad m = \frac{(82)(7.39004) - 4(198.822043)}{(6724) - 4(2884.06)} \quad m = 0.039338206$$

$$b = \frac{\Sigma X \Sigma XY - \Sigma Y \Sigma X^2}{(\Sigma X)^2 - n \Sigma X^2} \quad b = \frac{(82)(198.822043) - 7.39004(2884.06)}{-4812.24} \quad b = 1.091076761$$

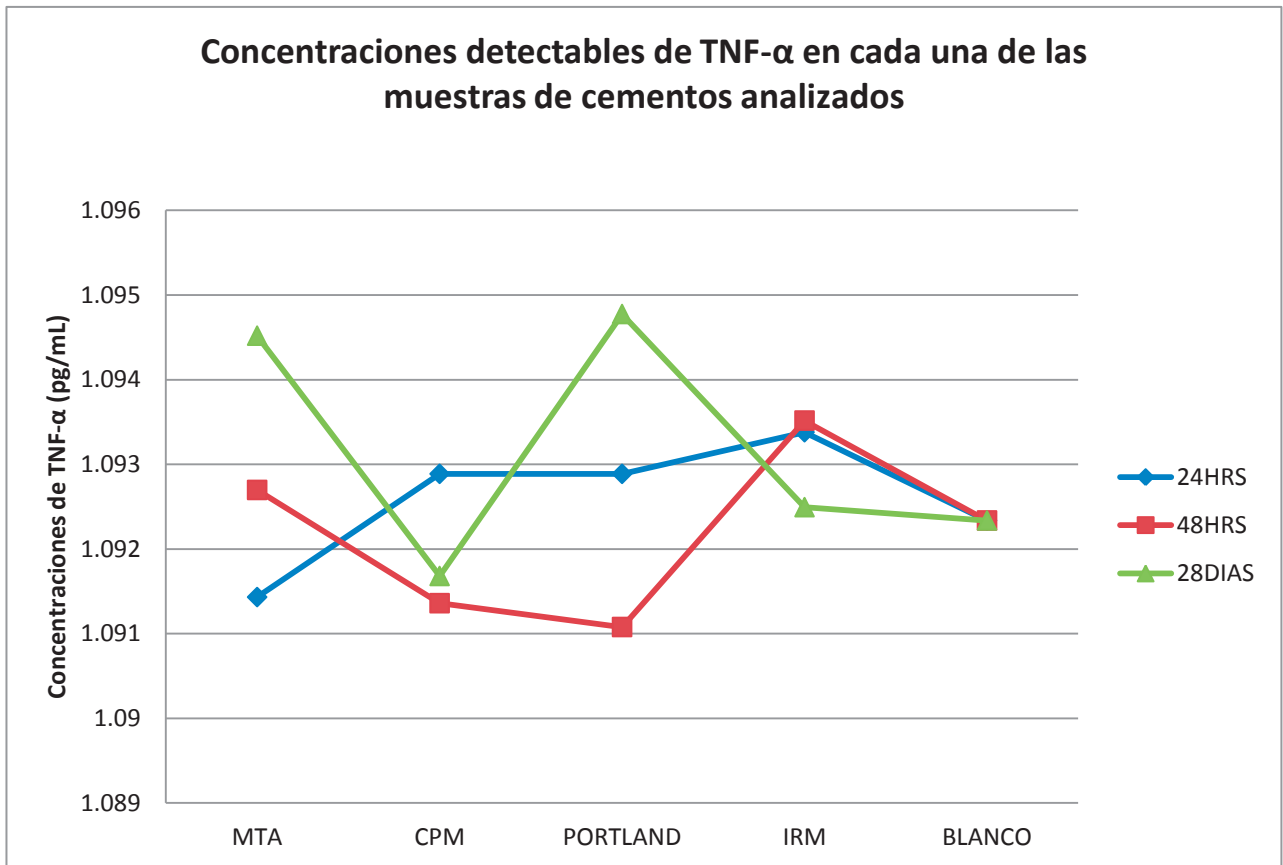
| | |
|---|---|
| $Y_1 = (0.039338206)(0) + 1.091076761 = 1.091076761$ | $Y_3 = (0.039338206)(23.4) + 1.091076761 = 2.011590781$ |
| $Y_2 = (0.039338206)(11.7) + 1.091076761 = 1.551333771$ | $Y_4 = (0.039338206)(46.9) + 1.091076761 = 2.936038622$ |



Los puntos representan las concentraciones detectables de TNF- α , expresadas en pg/mL según el inverso del logaritmo de la absorbancia.

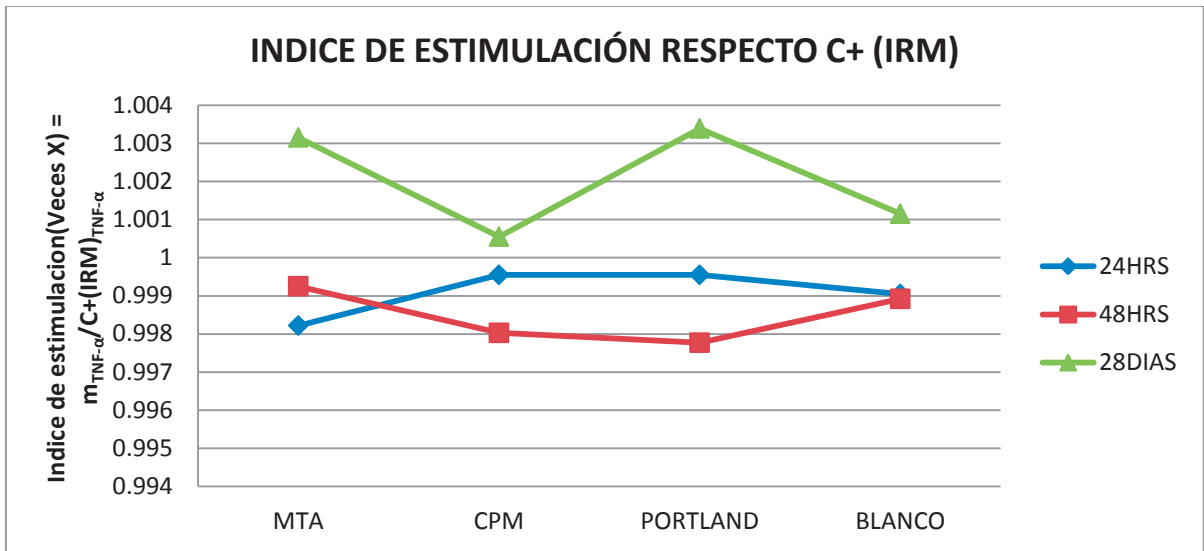
Concentraciones detectables de TNF- α en cada una de las muestras de cementos analizados

| TNF | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|---------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| CEMENT | X \pm S | X \pm S | X \pm S |
| MTA | 1.0914308 \pm 0.000354044 | 1.092696184 \pm .00161942 | 1.09495157 \pm .00055729 |
| CPM | 1.09288632 \pm 0.000904779 | 1.091358685 \pm .00028192 | 1.09167995 \pm .00060319 |
| TOLTECA | 1.09288632 \pm 0.001809557 | 1.091076761 \pm 0.00000000 | 1.09427627 \pm .00030159 |
| IRM | 1.09337805 \pm 0.000000000 | 1.093515730 \pm 0.00000000 | 1.09107676 \pm 0.00000000 |
| BLANCO | 1.09233558 \pm 0.000275367 | 1.092335584 \pm .00027537 | 1.09233558 \pm .00027537 |



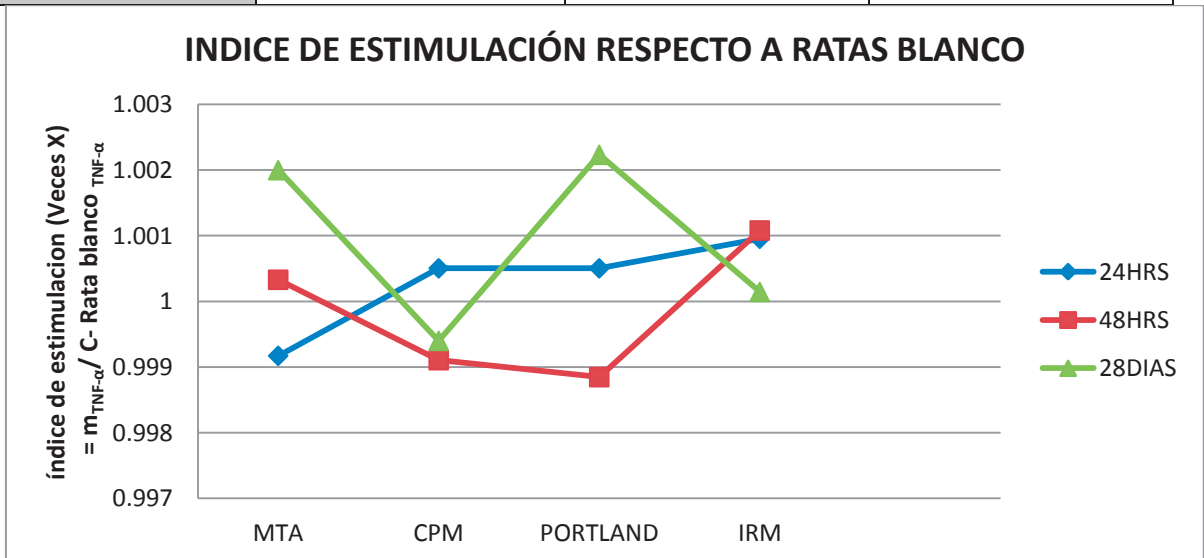
Índice de estimulación de TNF- α con respecto a C+ (IRM)

| CEMENTO | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| MTA | 0.998219056 | 0.99925054 | 1.003154769 |
| CPM | 0.999550263 | 0.998027422 | 1.000552836 |
| PORTLAND | 0.999550263 | 0.997769607 | 1.003389125 |
| BLANCO | 0.999046564 | 0.998920778 | 1.001153745 |



Índice de estimulación de TNF- α con respecto a Blancos

| CEMENTO | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| MTA | 0.999171687 | 1.000330104 | 1.001998722 |
| CPM | 1.000504166 | 0.999105664 | 0.999399787 |
| PORTLAND | 1.000504166 | 0.99884757 | 1.002232807 |
| IRM | 1.000954328 | 1.001080373 | 1.000144058 |



Ajuste de la curva Standard de IL-6 de rata. $Y=mx + b$

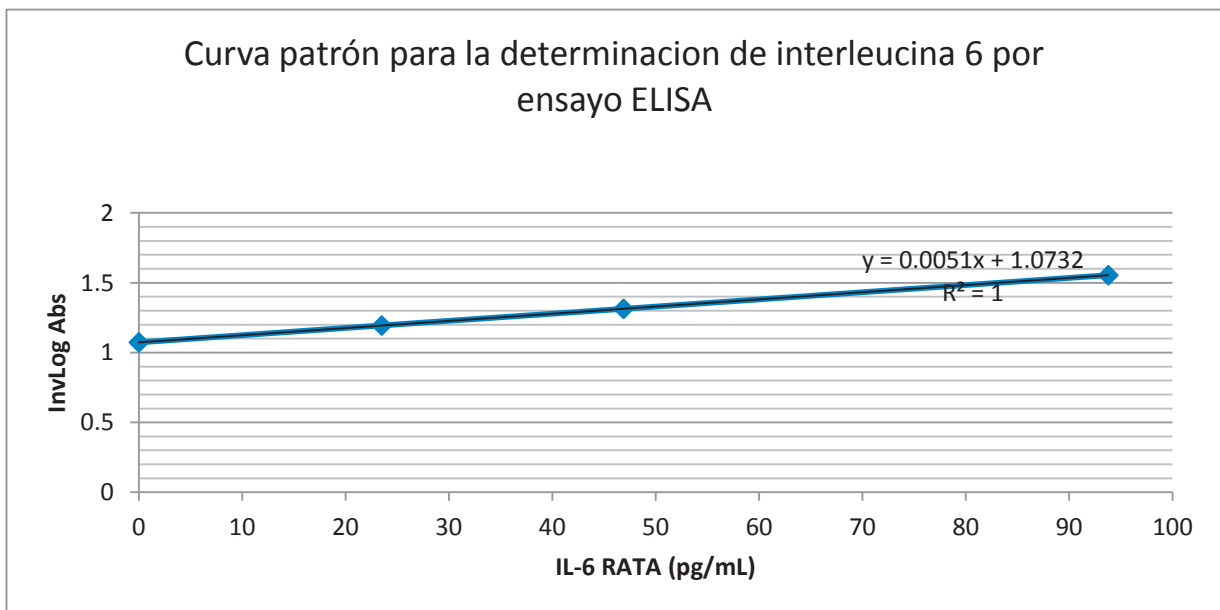
| Datos lecto ELISA | X | Y | ----- | n=4 |
|----------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------|
| Absorbancia 450 (nm) | IL-6 rata (pg/mL) | Inv.Log Absorbancia 450(nm) | XY | X ² |
| 0.0515 | 0 | 1.1259 | 0 | 0 |
| 0.065 | 23.5 | 1.1614 | 27.2929 | 552.25 |
| 0.099 | 46.9 | 1.256 | 58.9064 | 2199.61 |
| 0.2015 | 93.8 | 1.5903 | 149.17014 | 8798.44 |
| ----- | $\Sigma X= 164.2$ | $\Sigma Y= 5.133753$ | $\Sigma XY=235.379057$ | $\Sigma X^2 11550.3$ |

$$m = \frac{\Sigma Y \Sigma X - n \Sigma XY}{(\Sigma X)^2 - n \Sigma X^2} \quad m = \frac{(5.133753)(164.2) - 4(235.379057)}{(26961.64) - 4(11550.3)} \quad m = .005122465 \quad b = \frac{\Sigma X \Sigma Y - \Sigma XY \Sigma X^2}{(\Sigma X)^2 - n \Sigma X^2}$$

$$b = \frac{(164.2)(235.379057) - (5.133753)(11550.3)}{26961.64 - 46201.2} \quad b = 1.073161035$$

$$Y_1 = (.005122456)(0) + 1.073161035 = 1.073161035 \quad Y_3 = (.005122456)(46.9) + 1.073161035 = 1.313404221$$

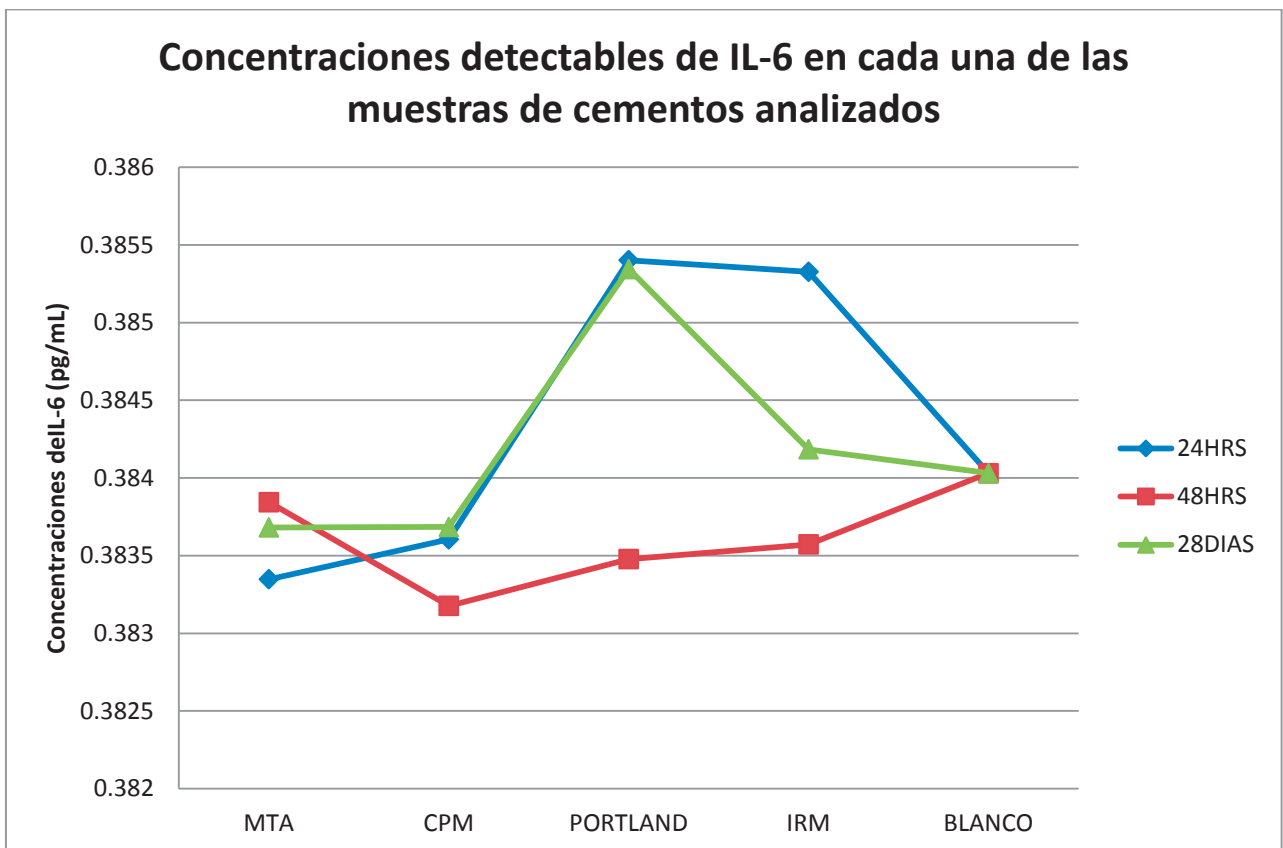
$$Y_2 = (.005122456)(23.5) + 1.073161035 = 1.193538751 \quad Y_4 = (.005122456)(93.8) + 1.073161035 = 1.553647408$$



Los puntos representan las concentraciones detectables de interleucina 6, expresadas en pg/mL según el inverso del logaritmo de la absorbancia.

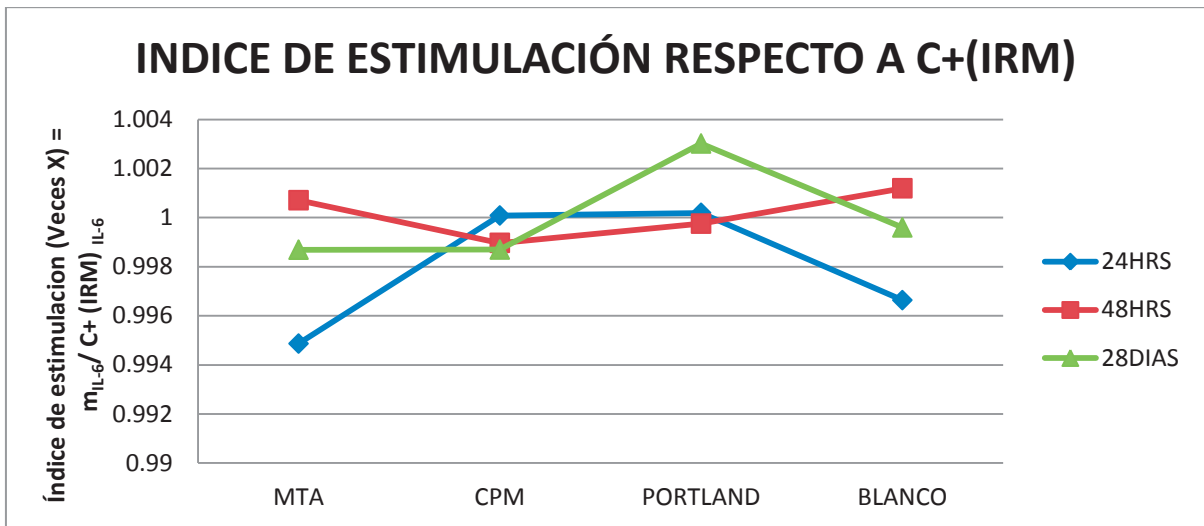
Concentraciones Detectables de IL-6 en cada una de las muestras de cementos analizados

| IL-6 | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CEMENT | X \pm S | X \pm S | X \pm S |
| MTA | 0.3833482606 0.0000671938 | 0.3838435045 0.0004977325 | 0.3836817414 0.0001318991 |
| CPM | 0.3836045929 0.0000995465 | 0.3831765429 0.0000447959 | 0.3836842301 0.0002339343 |
| TOLTECA | 0.3854014075 0.0000398186 | 0.3834776711 0.0003459241 | 0.3853441682 0.0002015816 |
| IRM | 0.3853267476 00000000000 | 0.3835722403 00000000000 | 0.3841844513785 000000000 |
| BLANCO | 0.3840301542 0.0001020351 | 0.3840301542 0.0001020351 | 0.3840301542 0.0001020351 |



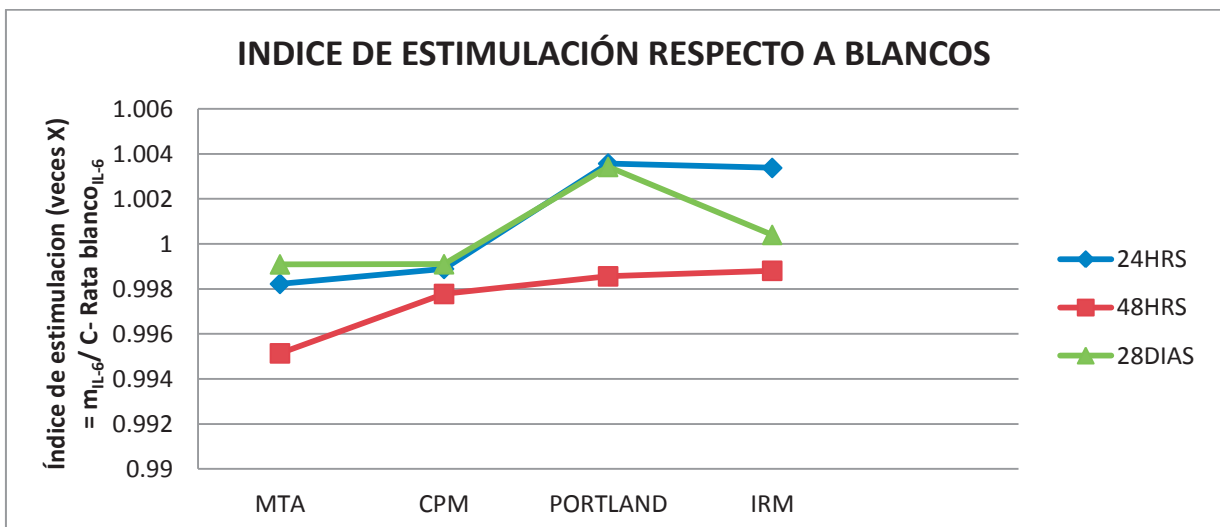
Índice de estimulación de IL-6 con respecto a C+ (IRM)

| CEMENTO | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| MTA | 0.994865422 | 1.000707194 | 0.998691487 |
| CPM | 1.000084339 | 0.998968382 | 0.998697969 |
| PORTLAND | 1.000193758 | 0.999753449 | 1.003018654 |
| NADA | 0.996893415 | 1.006189655 | 1.004106908 |
| BLANCO | 0.996635063 | 1.001193814 | 0.999598377 |



Índice de estimulación de IL-6 con respecto a Blancos

| CEMENTO | 24HRS | 48HRS | 28DIAS |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| MTA | 0.998224376 | 0.99513973 | 0.999092745 |
| CPM | 0.998891855 | 0.997777229 | 0.999099227 |
| PORTLAND | 1.003570694 | 0.998561355 | 1.003421643 |
| IRM | 1.003376282 | 0.998807609 | 1.000401784 |



8.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Se utilizó el *método de mínimos cuadrados* para realizar el ajuste de la recta (diluciones de la curva estándar) y así poder determinar las concentraciones de citocinas (IL-6 y TNF α) en cada una de las muestras.

Se calcularon medidas de tendencia central: media aritmética y medidas de dispersión: desviación estándar.

Para estimar la magnitud de la respuesta inflamatoria *in vitro* a cementos respecto al recuento de leucocitos en cámara de Neubauer, se determinó el índice de estimulación de la muestra (expresada en veces X); 1) con respecto al control positivo cemento IRM y 2) con respecto al blanco, ratas sin cirugía.

Para comparar la expresión celular que indujeron los cementos a través del conteo diferencial, se utilizó la prueba estadística de chi-cuadrada (X^2) a un nivel de significancia del 0.05.

Se utilizó el análisis de la varianza y distribución de Fisher (ANOVA) para comparar los niveles de expresión entre IL-6 y TNF- α , durante la respuesta inmune inflamatoria *in vitro* a cementos, y para interpretar la expresión de las citocinas a las 24 horas, 48 horas y 28 días, llevando a cabo una prueba bilateral con IC del 95% y un nivel de significancia del 0.05. Se utilizó la hoja de cálculo Excel y el paquete estadístico SPSS versión 19 para dichos cálculos.

9.- DISCUSIÓN.

La biocompatibilidad de un material contribuye al éxito clínico de la terapia endodóntica. Un material tóxico puede retrasar la reparación de los tejidos causando una reacción tisular inflamatoria, por lo que, la determinación de mediadores solubles como las citocinas que intervienen en la inmunomodulación de las respuestas inflamatorias, han presentado un rol importante en la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos. Debido a esto, el presente estudio de investigación valoró la expresión de dos citocinas inflamatorias (IL-6 y TNF- α) para conocer el grado de inflamación que puede inducirse al estimular ratas Wistar con diferentes cementos de uso endodóntico.

Las técnicas de implantación proporcionan información importante sobre la respuesta inflamatoria tisular a los materiales dentales. Sin embargo, los investigadores establecen que es difícil asumir que estas técnicas sean comparables a las pruebas clínicas. Los resultados de estos métodos, como aquellos obtenidos en las pruebas *in vitro*, no deben utilizarse como valores absolutos y sólo pueden ser utilizados como indicadores de biocompatibilidad de los materiales en estudio.

Los principales resultados del presente estudio indicaron que los niveles de expresión de IL-6 permanecieron más estables respecto a TNF- α , al ser detectadas en plasma de ratas Wistar, siendo IRM y Portland “Tolteca” los cementos que presentaron los niveles de expresión de IL-6 más elevados respecto los cementos MTA Angelus y CPM a un valor de $P < 0.05$. Por lo tanto, es deseable utilizar aquellos materiales que produzcan menor respuesta inflamatorias, más controlada y de corta duración, que no presenten grados de citotoxicidad, ya que esto se traduce en la disminución de síntomas postoperatorios y en una pronta cicatrización de los tejidos, contribuyendo así al éxito de la terapia endodóntica.

10.- CONCLUSIONES.

La cuantificación de citocinas inflamatorias IL-6 y TNF- α en muestras de plasma provenientes de ratas Wistar, ha sido de gran apoyo para la comprensión de los procesos inflamatorios inducidos por cementos de uso endodóntico. De manera particular IL-6 mantuvo una expresión más regular respecto a TNF- α ($P < 0.05$), por lo que PROPONEMOS el estudio y cuantificación de la expresión de IL-6 como un biomarcador útil para estimar la magnitud de la respuesta inmune inflamatoria sistémica *in vivo* ante estos materiales, y para cualquier material que se quiera estudiar biocompatible a nivel sistémico.

Aunque existen en la literatura referencias sólidas que mencionan que el cemento portland y el MTA son muy similares en cuanto a su composición química y la respuesta local que presentan, queda demostrado con este estudio que por lo menos el cemento portland de origen nacional marca Tolteca no expresa una buena aceptación sistémica por el organismo al que fue implantado, nuestra diferencia con otros estudios mayormente realizados en el extranjero, puede deberse a que todos los cementos portland son diferentes debido a la zona geográfica de donde se extraen, y por controles de calidad que tiene cada país productor. Por lo que no podemos generalizar al cemento Portland, hay que hablar de marcas, tipos, país de origen y de ser posible, establecer sus componentes químicos y porcentajes de estos.

10.1 RECOMENDACIONES

Con este estudio queremos establecer una pauta que incite a que el estudio de los “biomateriales” incluya una última etapa en donde sean evaluadas las respuestas sistémicas del organismo a dicho estímulo, y no se quede únicamente en la evaluación de una respuesta local, pues lo que podríamos calificar como una simple inflamación crónica local, tienen implicaciones comprobadas a nivel sistémico, siendo el ejemplo clásico el de la enfermedad periodontal (inflamación crónica local) que es capaz de elevar por si sola los niveles de proteína c reactiva en sangre (a nivel sistémico) y con esto predisponer a una persona a padecer enfermedades cardiovasculares, principalmente infartos.

11.- BIBLIOGRAFÍA.

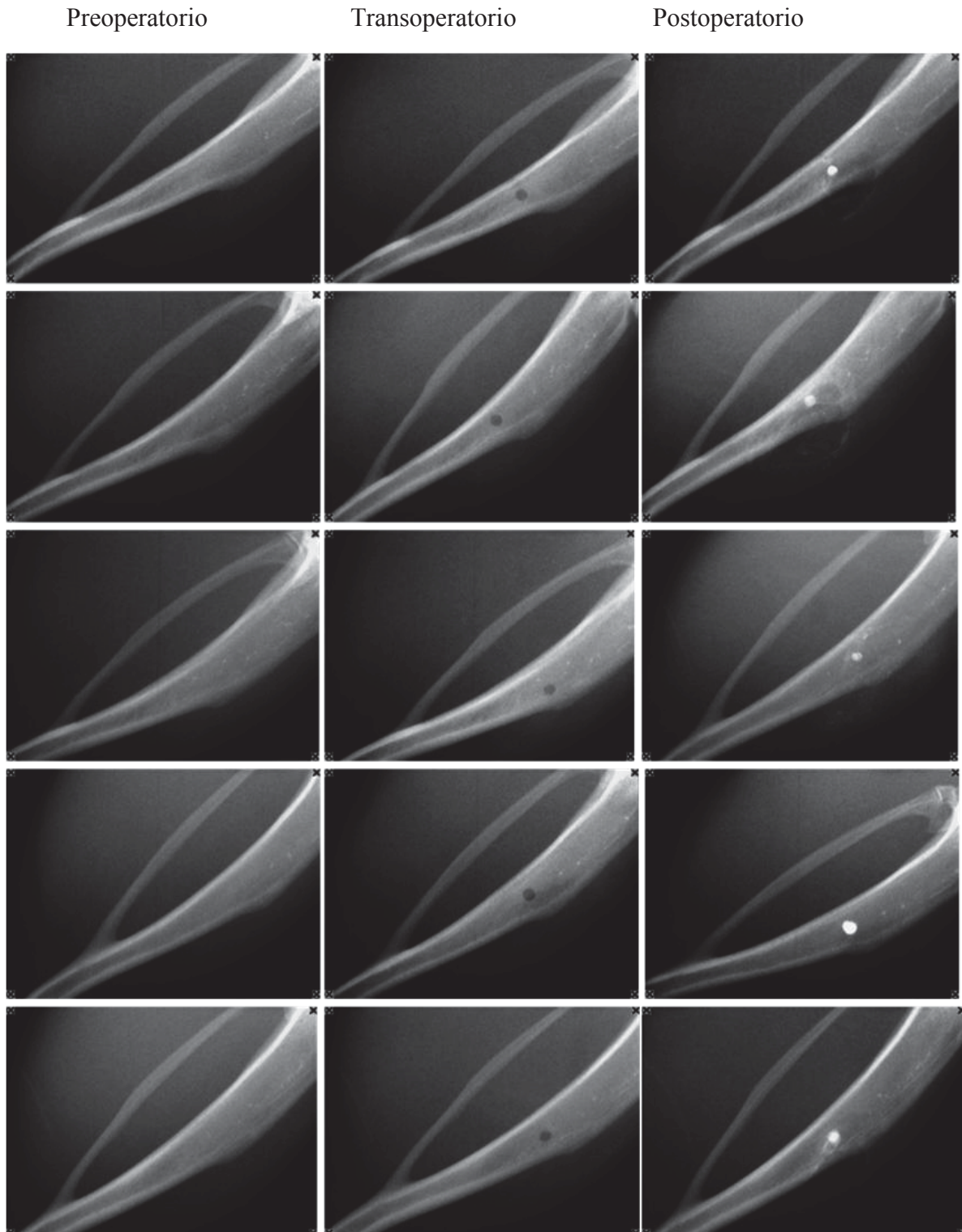
1. Campos Q I, Llamosas et al. Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Pórtland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas. *Revista ADM*, FES Iztacala.(2003); 9(2): 45-50
2. Torabinejad M.; Hong CU.; Pitt Ford TR. Physical properties of a new root end filling material. *J Endodon.*(1995); 21: 349-53.
3. Scharz S. Richard, et al. Mineral trioxide Aggregate: a new material for endodontics. *JADA*, Alaska, USA,(1999); 130 (7):967-75.
4. Seung-Jong Lee, M. Torabinejad, et al. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate for Repair of Lateral Root Perforations. *J. Endod*, Seoul, Korea,(1993); 19(11):541-4
5. C. Mangin.; Yesilsoy et al. The comparative sealing ability of hydroxyapatite cement, mineral trioxide aggregate, and super ethoxybenzoic acid as root-end filling materials. *J. Endod.* Philadelphia. (2003); 29 (4):261-4
6. Wucherpfenning AL, Green DB Mineral trioxide aggregate vs Portland cement: two biocompatible filling materials. *J Endod* 1999; 25(4):308-11.
7. Shah PMM.; Chong BS.; Sidu SK.; Pitt Ford TR. Radiopacity of potential root end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endo.* (1996); 81: 476-9
8. Estrela, C. et al. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal . *Braz. Dent. J.* v.11,n.1, p.3-9, 2000.
9. KLOCKMANN, F. And RAMDOHR P. (1955). *Tratado de Mineralogía*,Barcelona. Editorial Gustavo Gili S.A. 716 p.)
- 10.CORNELIU S. HURLBUT, Jr *Manual de mineralogía de Dana*. Seg. edición Ed. Reverte, España.
11. www.cemexmexico.com
12. www.arquicity.com.
13. Dixon, C.M.; Rikert,U.G. Tissue tolerance to foreign materials. *Arch. Oral. Biol*,v.20,n.8, p 1458-72, Aug. 1933
14. Torneck C.D. Reaction of rat conective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg.* V.21,no.3.p.379-87.Mar.1966

15. Phillips, J.M. Rat connective tissue response to hollow polyethylene tube implants. *J. Canad Dents Ass*, v.33, n.2, p.59-64, 1967.
16. Langeland, K. et al. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg*, v.27, n.4, p.522-42, Apr. 1969
17. American Dental Association. Council on dental materials and devices of the American Dental Association. *J Amer Dent Assoc*. v.84, p.375-95, Feb.1972.
18. American National Standards/ American Dental Association. Document n°41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York, ANSI/ADA, 1982.
- 19.. Stanley, H. R. Biological evaluation of dental material. *Int. Dent .J*. v.42, n.1, Feb. 1992
20. International Organization for Standarization. ISO. 7405: dentistry –preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials . Geneve. ISO. 1997
21. Stanley, H.R. Toxicity testing of dental materials. Florida, CRC Press, 1985.
22. Stanford, J.W. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int. Endod. J* , v.30, n.2, p. 140-88, June 1980
- 23 Hedrich HJ. History strains and models. In: Krinke GL, editors. *The Laboratory rat*. London: Academic Press; 2000, p.3-16.
- 24.- Kopecek J, Ulbrich K. Biodegradation of Biomedical Polymers. *Prog Polym Sci* 1983; 9: 34-35.
- 25.-Dumitriu S, Dumitriu D. Biocompatibility of Polymers. In: Dumitriu S; *Polymeric Biomaterials*; New York: Marcel Dekker, Inc; 1993; 99-158.
26. Hirano: “Interleukin 6”, En *The Cytokine handbook* 2nd ed Academic press, New York 1994 p145-66.
- 27 . Farrar MA, Schreiber RD The molecular biology of Interferón gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11:571-611.
28. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O. Requirement of MIP-1 α for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995; 269:1583-85.
- 29.-. Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10 :411-53.

- 30.- Dinarello CA Wolf SM: The role of Interleukin-1 in disease. N Eng J Med. 1993; 328: 106-13.
31. Kerl JH, Alvarez-Mon M, Delsing GA, Fauci AS: Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells. Science. 1987; 238: 1144-6.
32. Holland,R. Cirugia paraendodoncica: como prática-la com embasamento científico. In ESTRELA, C. Ciência Endodoncica .Sao Paulo, Artes médicas, 2004. Cap. 16,p.657-797.
- 33.- Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA (2003) Cell and tissue reactions to mineral trioxide agrgate and Portland cement. Oral Surgery Oral medicine Oral Pathology Radiology and Endodontics 95,483-9
34. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, KariYawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material in monkeys. J Endod 1997;23:225– 8.
35. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kariyawasam SP. Tissue reaction to implanted Super EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. J Endod 1995;21:569 –71.
36. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod 2004;30:95–9.
- 37.- Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. Braz Den J 2007;18(1):3-7.
- 38.-García-Aranda, R.L y García Garduño M.V. Análisis químico por difracción y fluorescencia de rayos x de los cementos Portland, blanco, proroot gris y blanco, ángelus blanco y cpm. Endodoncia Actual 2009.4:11;6-11
39. Bernabé PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth.Braz Dent J. 2005;16(2):149-55.
40. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. J Endod. 2009 Oct;35(10):1412-7.
- 41.- Fu-Mei Huang, Chung-Hung Tsai, Shun-Fa Yang, Induction of Interleukin-6 and Interleukin-8 Gene Expression by Root Canal Sealers in Human Osteoblastic Cells, JOE — Volume 31, Number 9, September 2005
- 42.- Takashi Matsuo, Shigeyuki Ebisu, Tadashi Nakanishi, Kouki Yonemura, Yasushi Harada, Interleukin-1 α and Interleukin-1 β in Periapical Exudates of Infected Root Canals: Correlations with the Clinical Findings of the Involved Teeth JOE vol. 20, no. 9, september 1994

12.- ANEXOS

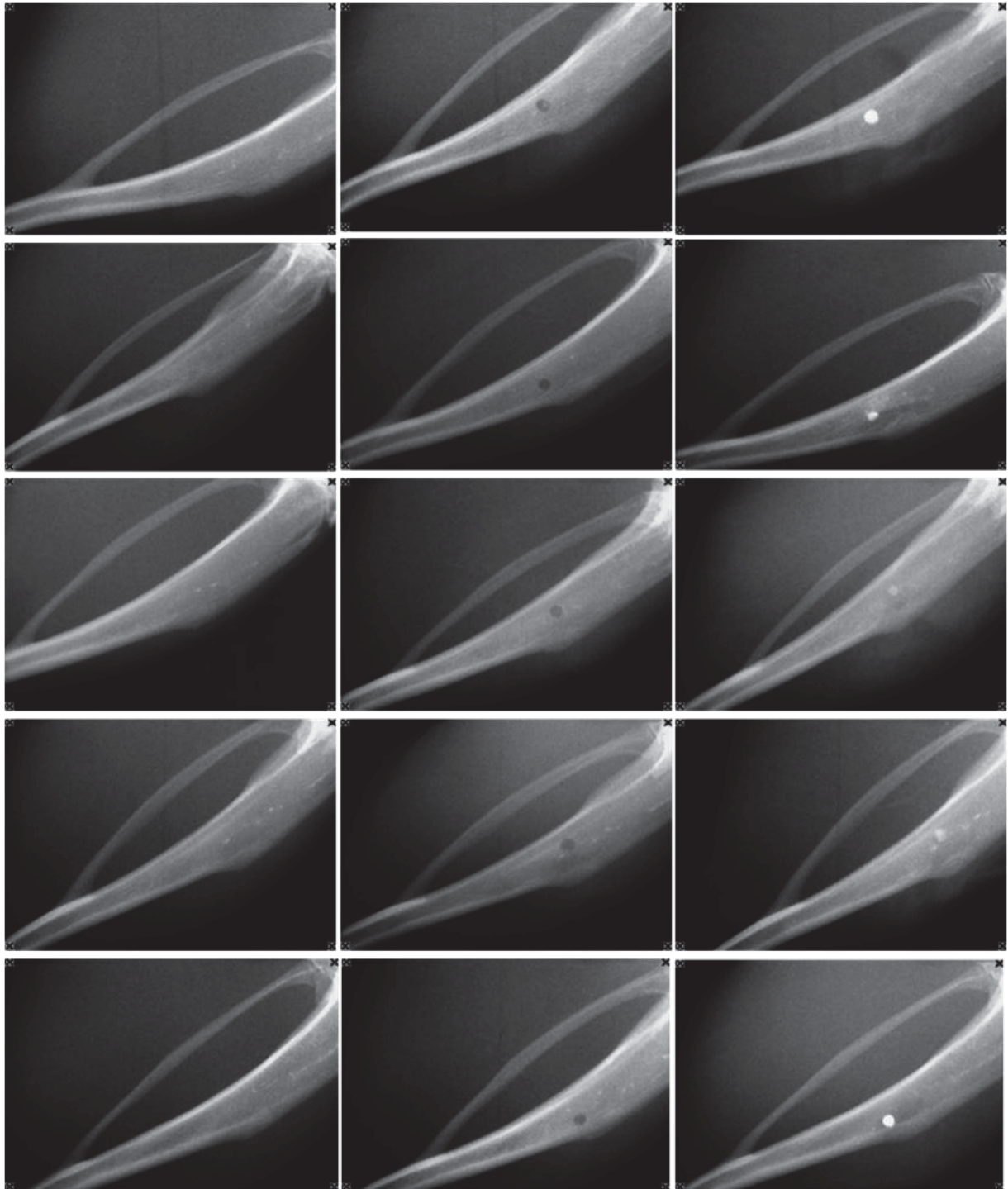
12.1 RADIOGRAFÍAS



Preoperatorio

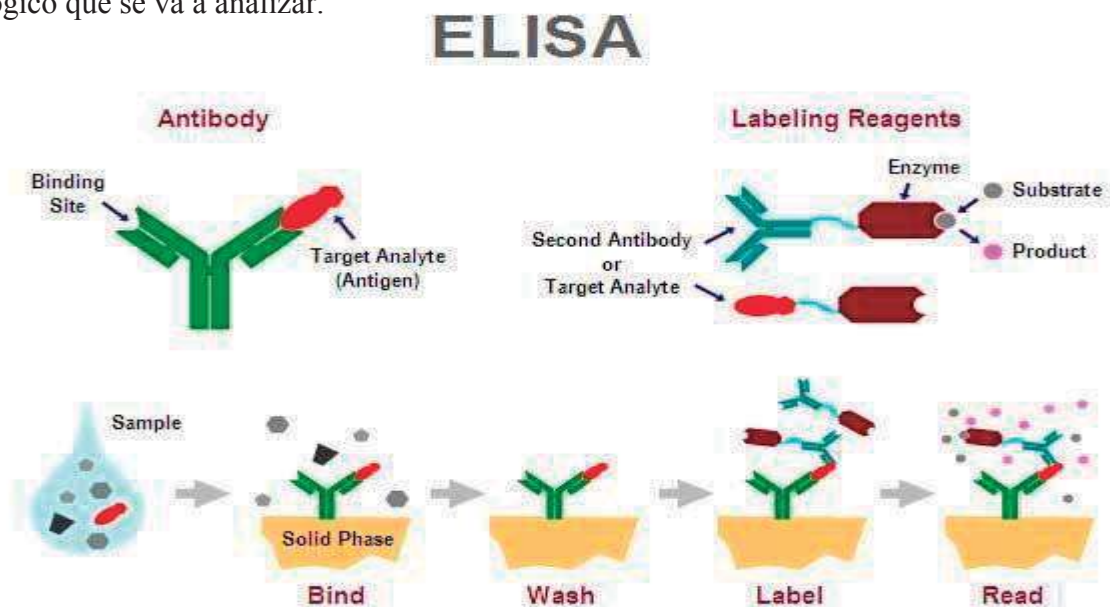
Transoperatorio

Postoperatorio

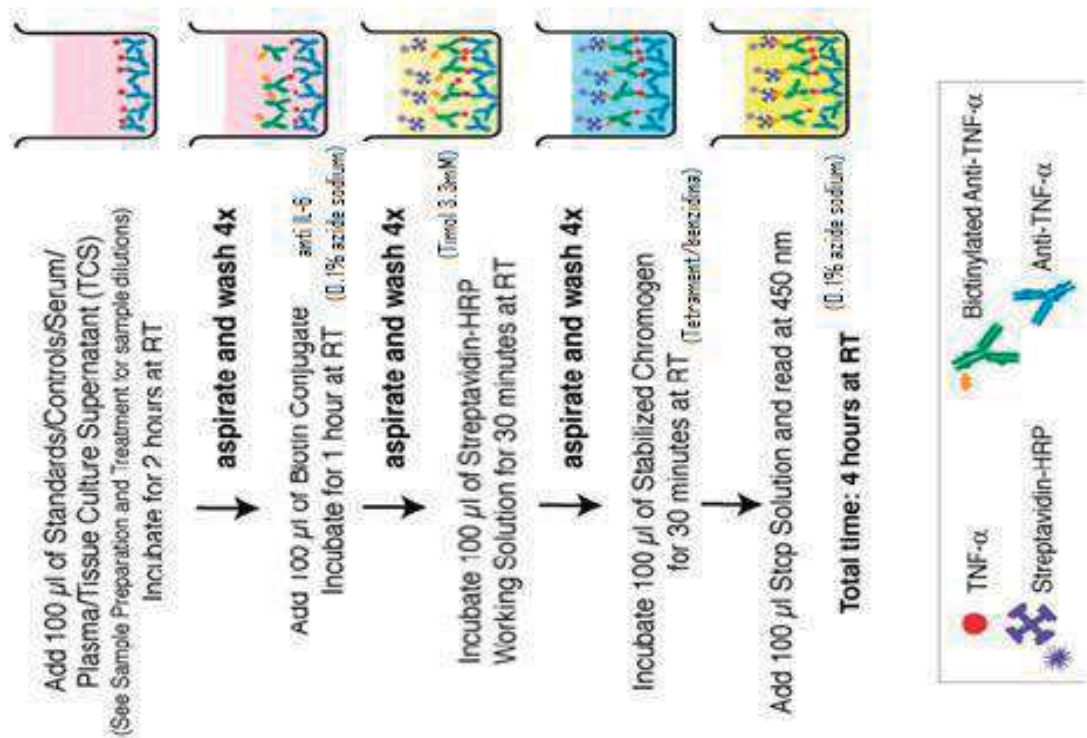


12.2 INMUNOENSAYO ELISA

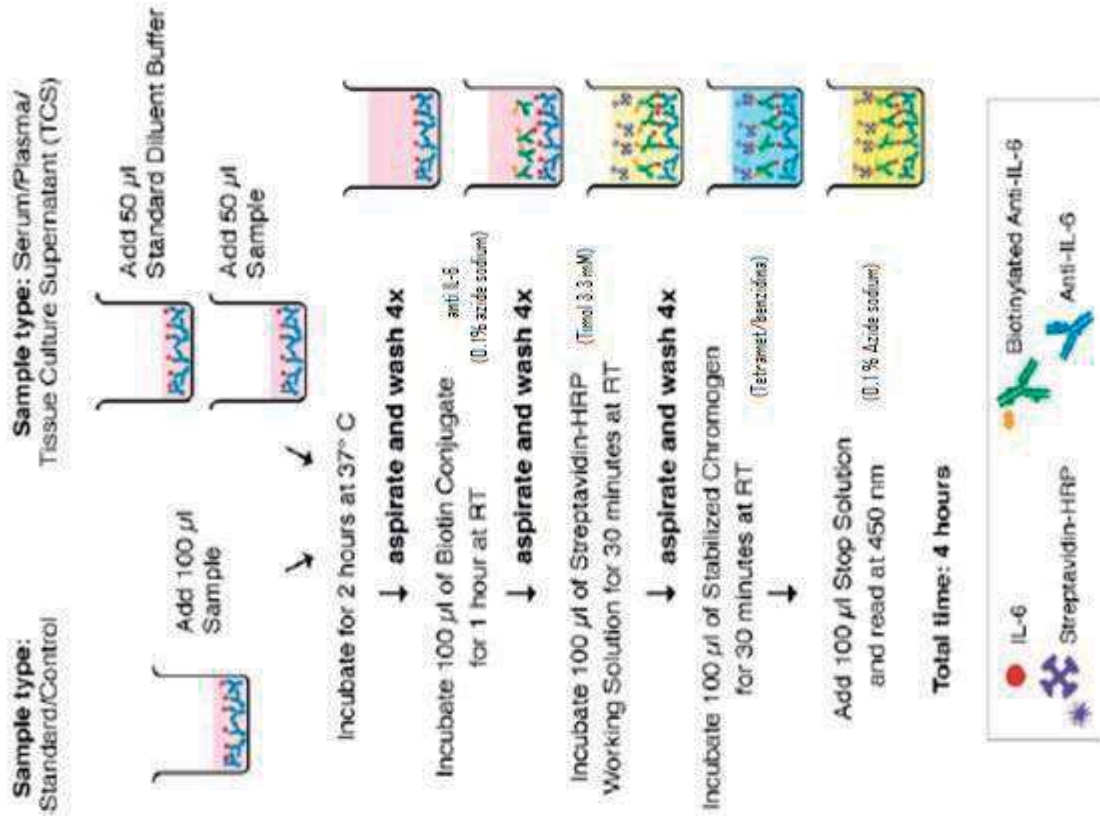
Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos”. Y tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La prueba ELISA se basa en varias teorías: 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar.



Rat TNF- α Assay Summary



Rat IL-6 Assay Summary



Resumen de Procedimientos para IL-6 y TNF- α

12.3 PROTEINA “C” REACTIVA

La proteína C reactiva (PCR) reactante de fase aguda sintetizada en el hígado se encuentra presente en el suero de individuos sanos y su concentración plasmática aumenta significativamente en respuesta a diferentes tipos de estímulos, tales como infecciones, irritantes químicos, temperaturas extremas, irradiación, cirugía, trauma, neoplasias malignas y otras condiciones inflamatorias. Se ha reportado que la PCR interactúa con el sistema inmunitario modulando la respuesta inmune contra un gran número de agentes extraños al organismo.

Niveles elevados de PCR representan un sensible marcador inespecífico de la respuesta inflamatoria aguda y desempeñan un papel importante en el desarrollo y evolución del fenómeno mencionado. La sensibilidad y especificidad de los ensayos disponibles en la actualidad para la detección de la PCR es significativa y depende de la metodología empleada, en algunos casos compleja y costosa. Resulta importante disponer de procedimientos sencillos y eficientes; en nuestro trabajo se evaluó un método para la detección de PCR basado en la aglutinación con látex (Bio-PCR-Látex, CENTIS)

Bio-PCR es una prueba rápida de aglutinación en látex para la determinación cualitativa y/o semicuantitativa de la Proteína C-Reactiva, El principio de la prueba es la reacción inmunológica entre PCR como antígeno y el anticuerpo correspondiente cubierto en una superficie de partículas de látex biológicamente inerte.

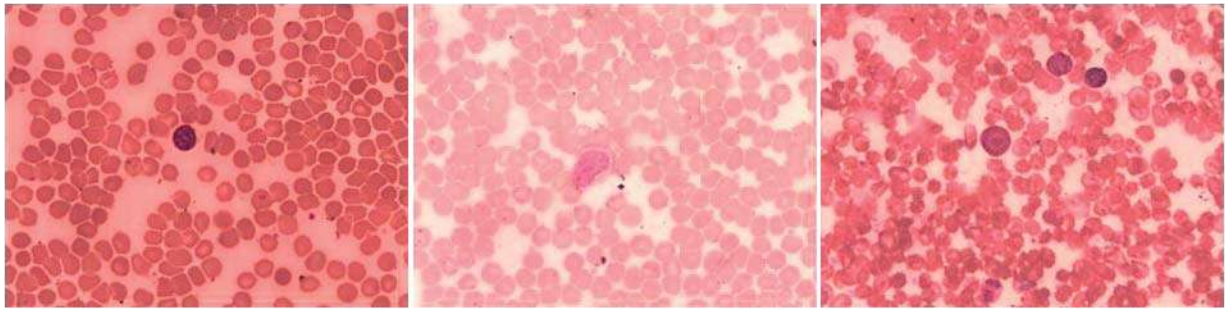
12.4 ÉTICA SOBRE EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Durante el desarrollo de esta investigación se observaron todas las normas, nacionales e internacionales para el uso y manejo adecuado de modelos animales, principalmente el del mantenimiento del mayor grado posible de bienestar animal. De igual forma, también se evitó en la medida de lo posible someter a situaciones de estrés al animal, ya que ello podía provocar alteraciones en los resultados del trabajo. Un factor importante fue la anestesia general alcanzada como consecuencia del uso de sustancias químicas y que se caracterizó por la ausencia de percepción dolorosa, memoria, respuesta motora a los estímulos y reflejos. La valoración del reflejo pedal de retirada, provocado por la compresión de la zona plantar de una extremidad entre los dedos índice y pulgar, nos permitió ver el grado de analgesia, lo que junto con la evaluación y el control de las funciones fisiológicas nos permitieron reconocer un funcionamiento correcto de la anestesia.

En cuanto a la eutanasia, que etimológicamente significa "muerte sin dolor", se aplicó de forma piadosa, evitando el sufrimiento "físico y psíquico", sin que el animal presentara lucha o síntomas de miedo durante la maniobra empleada. Se podría calificar de buen método de eutanasia porque se alcanzó con rapidez el estado de inconsciencia y éste se mantuvo hasta el momento de la muerte.

La investigación con animales ha contribuido ampliamente a la solución de problemas médicos y en la actualidad el animal de laboratorio goza de auténtica prioridad en el campo de la experimentación siendo las especies de roedores uno de los grupos más importantes de este conjunto, un ejemplo es la metodología expuesta por Dixon³⁴ para evaluar la respuesta del tejido subcutáneo a la implantación de diversos materiales de uso odontológico, o la de Torneck³⁵ que utiliza tubos de polietileno que implanta en el tejido subcutáneo de ratas, o la de Phillips³⁶ que implanta en tejido subcutáneo de ratas Wistar, tubos vacíos con la finalidad de observar la respuesta del tejido al polietileno evaluando la zona en contacto con el tubo; con el pasar de los años esta metodología se ha modificado. Actualmente existen métodos de estudio de la respuestas biológicas provocadas por materiales endodonticos recomendados por la Asociación Dental Americana (ADA) y la Organización Internacional de Estandarización (ISO), como prueba preliminar para evaluar *in vivo* la toxicidad de materiales cuando se dejan en contacto prolongado con tejidos subcutáneos.

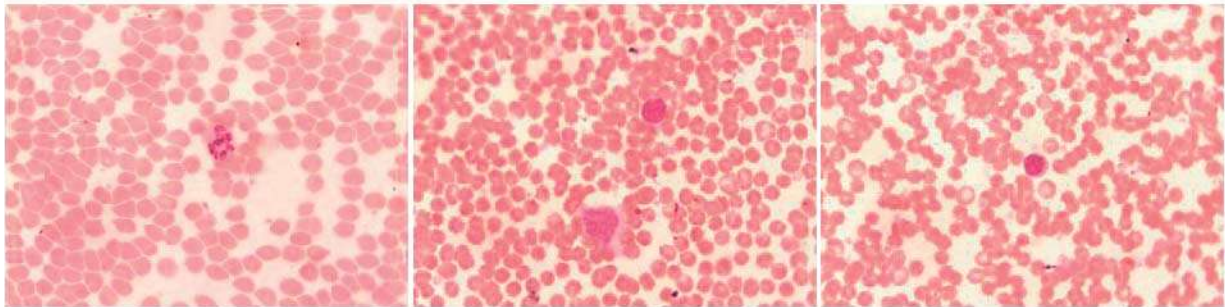
12.5 FOTOS DE LEUCOCITOS AL REALIZAR LA CUENTA DIFERENCIAL



Linfocito

Monocito

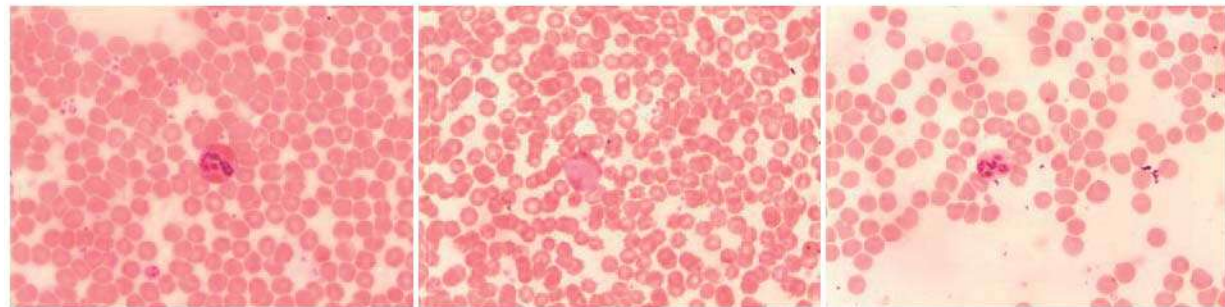
Eosinofilo



Neutrofilo

Monocito

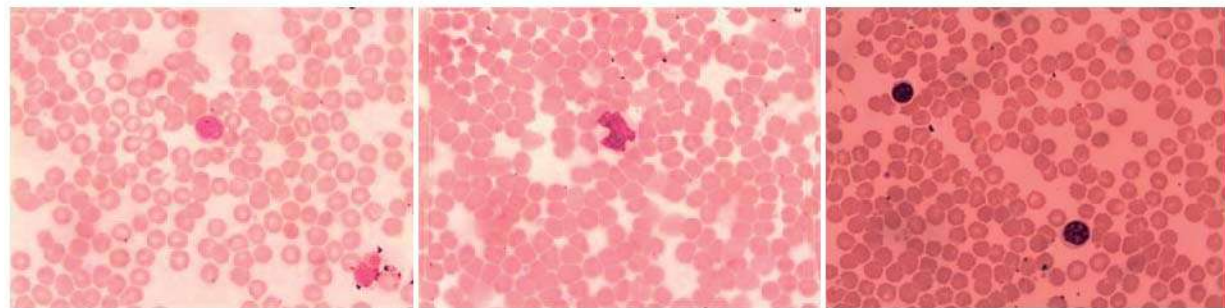
Neutrofilo



Eosinofilo

Eosinofilo

Neutrofilo



Linfocito

Monocito

Linfocito

12.6 PREMIO NACIONAL, PROTOCOLO DE INVESTIGACION EN ENDODONCIA 2010

El presente trabajo de investigación fue realizado gracias al apoyo económico que nos otorgo la Asociación Mexicana de Endodoncia A.C. por medio del concurso de protocolos de investigación que se celebra cada año durante el congreso nacional de endodoncia.

En mayo del 2010, durante el XXXIX congreso nacional celebrado en la ciudad de Cancún, Q.R. nuestro trabajo participo en el concurso logrando el primer premio y el respaldo económico para realizarlo, así mismo obtuvimos el compromiso de presentar los resultados durante el siguiente congreso y tener listo el trabajo para su publicación en la revista Endodoncia Actual.



12.7 PREMIO NACIONAL DE INVESTIGACION EN ENDODONCIA 2011

Es para mí un gusto dedicar esta ultima parte a un logro que fue muy anhelado por mí. La historia comienza en mi primer Congreso Nacional de Endodoncia, el cual se llevo a cabo en el puerto de Veracruz, en marzo del 2006; estaba por terminar mi año de servicio social y tenía intenciones de titularme por tesis de la licenciatura, lo que no fue posible porque en la facultad no estaba bien establecida la titulación por tesis “al menos eso fue lo que me dijeron”, pero yo tenía muchas ganas de realizar un trabajo de investigación, sobre todo porque ese año, mientras realizaba mi servicio social tuve la fortuna de trabajar para el Dr. Hugo Trujillo en su clínica; él había sido mi profesor de endodoncia en cuarto año, y sin dudarle me brindo la oportunidad de ser su asistente, discípulo y amigo, y una de las tantas cosas que aprendí de el, fue el gusto por la investigación; bajo su tutela desarrollamos mi primer protocolo de investigación, siendo yo aun pasante de odontología, y fue presentado en el Concurso Nacional de Protocolos de Investigación durante el Congreso Nacional en Veracruz en donde gracias a su experiencia, dedicación y gran apoyo, logramos obtener el primer lugar, recibiendo apoyo económico de parte de la Asociación Mexicana de Endodoncia para realizar lo que podría haber sido mi tesis de licenciatura, además obtuvimos el compromiso de presentar resultados en el congreso del año siguiente y su posterior publicación; un año después, ahí estábamos los dos, con la investigación terminada y lista para presentarse ahora en el Congreso Nacional numero XXXVI en Acapulco 2007 (antes de que yo entrara a la especialidad). Este congreso no fue tan grato para mi, pues durante mi presentación, por falta de concentración y mi inexperiencia presentando un tema frente a un fórum de especialistas y estudiantes de especialidad a nivel nacional, no pude

concluir a tiempo, dejando el trabajo de ambos sin presentar los resultados, esto provoco en gran parte que no obtuviéramos ningún premio en ese concurso, a pesar de lo novedoso de nuestro trabajo; en ese momento de inconformidad y frustración conmigo mismo me prometí que regresaría en unos años, mas preparado y con un mejor trabajo de investigación, con un trabajo que arrasara con todos los demás, que no dejara duda de quién sería el ganador; y así fue, este trabajo que aquí se muestra se presentó durante el Congreso Nacional XL en la ciudad de México el pasado mes de marzo, la presentación durante el congreso fue un éxito rotundo, nos merecimos una felicitación especial por parte del jurado y se nos otorgo el primer lugar dejando vacantes el segundo y tercer premio. La promesa estaba cumplida, logré mi propósito, fueron 4 años de espera en los que me prepare como endodoncista y en los que desarrolle mi pasión por la investigación científica, por lo que siguiendo esta línea, he logrado ingresar ahora al programa de Maestría en Ciencias de la salud perteneciente al padrón de posgrados de calidad del CONACyT dentro de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Medicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de mi querida Universidad Michoacana, en donde el fuerte es la investigación y en donde por primera vez dentro del programa, se va a realizar un proyecto 100% relacionado con endodoncia, gracias al apoyo desinteresado del Laboratorio de Investigación en Neurociencias. En esta nueva aventura en la que ya estoy inmerso tengo muchas metas, principalmente comenzar mi formación como investigador permitiéndome dar el brinco al doctorado y mas a corto plazo publicar mi trabajo en lo que será mi primer publicación internacional, espérenla....

Rubén A. Domínguez Pérez.

Cuando sueñes, asienta tu sueño, planea tu camino, apégate a el y triunfa...

XLI Congreso Nacional de Endodoncia 2 0 1 1

Otorga el siguiente
Reconocimiento a:

C.D.E.E. Rubén A. Domínguez Pérez

Como Ganador del primer lugar
en Premio Nacional de Investigación
En el XI Congreso Nacional de Endodoncia.

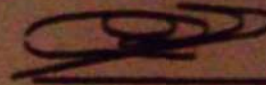
México D.F. 20 de marzo de 2011



Dr. Manuel Sánchez Vite
Secretario



Dr. Raúl Luis García Aranda
Presidente



Dr. Miguel Ángel Díaz Maya
Tesorero



Asociación Mexicana
de Endodoncia A.C.



Fotos Durante el XL Congreso Nacional de Endodoncia en la Ciudad de México

Dos de mis asesores y amigos:
Dra. Adriana Arenas
y el Dr. Hugo Trujillo

