



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTOS INFLAMATORIOS DE CUATRO SELLADORES
ENDODÓNTICOS EN UN MODELO *IN VIVO*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARISOL RAMOS TAPIA

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESOR: Mtro. ANTONIO NIETO CAMACHO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTOS INFLAMATORIOS DE CUATRO SELLADORES
ENDODÓNTICOS EN UN MODELO *IN VIVO*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARISOL RAMOS TAPIA

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESOR: Mtro. ANTONIO NIETO CAMACHO

MÉXICO, Cd. Mx.

2017

La tesis titulada “Efectos inflamatorios de cuatro selladores endodónticos en un modelo *in vivo*” que presenta la alumna Marisol Ramos Tapia, se realizó bajo la tutoría de la Dra. Eileen Uribe Querol y la asesoría del M. en C. Antonio Nieto Camacho.

Parte del financiamiento para la realización de esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto IA202013, cuya responsable es la Dra. Eileen Uribe Querol del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA).

"Nunca nada es imposible, sólo se necesita trabajo, práctica y ganas de lograrlo, a veces, uno mismo es su propio obstáculo, pero si logras persuadirte, lograrás todo lo que quieras."

Marisol Ramos Japia

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi familia con mucho amor, en especial a mi mamá, que aunque la vida le ha puesto pruebas difíciles siempre lucha y sale adelante.

Agradecimientos

A Noé Rosales Reyes, por no dejarme desistir, por creer en mí, por el apoyo incondicional y por motivarme a ser mejor cada día, te amo.

A mis padres, por permitirme realizar este sueño, por su apoyo incondicional y amor, sin ustedes no sería lo que soy ahora.

A mi hermanita por apoyarme, por ser mi confidente y mejor amiga.

A la doctora Eileen Uribe Querol, por guiarme en este trabajo, por la paciencia y el cariño que plasma en todo lo que hace.

A Dios, por poner personas maravillosas en mi camino que me llenan de alegría y amor, por darme la vida y permitirte compartirla con mis seres queridos.

Al M. en C. Antonio Nieto Camacho y a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan, técnicos académicos del laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, gracias por la enseñanza de una nueva área, por la paciencia y la asesoría en la realización de este trabajo.

A Yolanda Pérez Reyes y a Adriana Cetina Canto por ser mis maestras y presentarme a las personas correctas para realizar este trabajo y devolverme el amor a lo que hago.

Al Dr. Carlos Rosales del Instituto de Investigaciones Biomédicas por sus comentarios para mejorar el trabajo.

Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1. Materiales de obturación	12
2.1.1. Gutapercha	12
2.1.2. Selladores endodónticos	13
2.1.3. Óxido de zinc y eugenol	13
2.1.4. Hidróxido de calcio	14
2.1.5. Ionómero	14
2.1.6. Resina	14
2.1.7. Silicón	15
2.1.8. Mineral trióxido agregado (MTA)	15
2.2. Normas y propiedades de los selladores	16
2.2.1. Propiedades físicas	16
2.2.2. Propiedades biológicas	16
2.3. Inflamación	17
2.3.1. Fase vascular	17
2.3.2. Fase celular	18
2.3.3. Neutrófilo	18
3. ANTECEDENTES	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	20
6. HIPÓTESIS	21

7. OBJETIVOS	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1. Obtención de medios condicionados de selladores endodónticos	22
8.2. Ratones	24
8.3. Edema inducido con TPA para medir inflamación	25
8.3.1. Procedimiento	25
8.4. Ensayo de mieloperoxidasa	28
8.4.1. Procedimiento	28
9. Estadística	30
10. RESULTADOS	31
10.1. Vehículos y TPA como inductores de edema	31
10.1.1. Inducción de edema generado por todos los cementos selladores	
10.1.2. Inducción de edema generado por cada uno de los cementos selladores	33
10.2. Ensayo de actividad de mieloperoxidasa	35
10.2.1. Reclutamiento de neutrófilos	37
11. DISCUSIÓN	39
12. CONCLUSIONES	40
13. ABREVIATURAS	41
14. BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN

Uno de los pasos en un tratamiento de conductos es la obturación de los conductos radiculares. Durante dicha obturación, se utilizan selladores endodónticos que idealmente deben ser biocompatibles. Las pruebas para conocer la biocompatibilidad de un material involucran conocer, entre otras cosas, su citotoxicidad y su actividad inflamatoria. Sabemos que selladores como el AH PlusTM, el RSA RoekoSeal, el SealapexTM y el MTA-FILLAPEX Angelus® poseen una actividad citotóxica deferencial. En este trabajo, evaluamos la actividad inflamatoria generada por estos selladores endodónticos en un modelo *in vivo*, utilizando el método de edema inducido por TPA. A su vez, evaluamos de manera indirecta la infiltración de neutrófilos, la respuesta inmunológica promovida por neutrófilos, mediante la determinación del contenido de la enzima mieloperoxidasa.

2. INTRODUCCIÓN

Un tratamiento de conductos consiste en la limpieza, desinfección, preparación y obturación del sistema de conductos radiculares. Durante la obturación, se utilizan materiales capaces de evitar la comunicación entre la cavidad oral y los tejidos perirradiculares. Los materiales usados comúnmente en la obturación son la gutapercha y un sellador endodóntico. La obturación consiste en el sellado del sistema de conductos en su extremo apical y coronal, además de todo el sistema de conductos. La obturación apical bloquea la salida de microorganismos que pudieran encontrarse en el conducto aún después de la limpieza y preparación, hacia los tejidos periapicales. La obturación coronal evita la reinfección del diente. La obturación es un paso crítico para el éxito de un tratamiento de conductos. Por lo tanto, la selección de selladores que posean propiedades físicas y biológicas adecuadas es decisiva. Los selladores endodónticos idealmente deben ser biocompatibles.

2.1. Materiales de Obturación

2.1.1. Gutapercha

La gutapercha es una sustancia vegetal extraída de los árboles de la familia Sapotáceas, del género *Palaquium* (Gutapercha).(1) La gutapercha es un polímero cristalino lineal que se fusiona a una temperatura fija, provocando un cambio aleatorio pero característico de la estructura.(2) Además, es un material ampliamente utilizado en Odontología y, fue introducida por Bowman en 1867.(3) Las puntas de gutapercha usadas en los tratamientos de conductos, tienen un 20% de gutapercha y de un 60 a un 75% de óxido de zinc.(4) La gutapercha es el material más utilizado para obturar los conductos radiculares en la actualidad.

2.1.2. Selladores endodónticos

Un sellador endodóntico es un material que sirve para rellenar los espacios que la gutapercha no pudo obturar. El sellador forma una barrera impermeable y es tan importante como el material de obturación.(4) Un sellador debe adherirse con fuerza a la dentina y a la gutapercha. Además, debe poseer una buena resistencia cohesiva, ser antimicrobiano y ser radiopaco para lograr observarse radiológicamente. Como aditivos para la radiopacidad se agregan plata, plomo, yodo, bario y bismuto en su formulación.

Existen muchos tipos de selladores en el mercado y la mayoría endurecen mediante una reacción química. En estas reacciones, casi siempre se liberan materiales tóxicos por lo que el clínico debe ser cuidadoso y evaluar todas las características de un sellador antes de seleccionarlo.(2) A continuación se presentan las características de los más usados.

2.1.3. Óxido de Zinc y Eugenol

Los selladores a base de óxido de zinc y eugenol (ZOE) son cementos selladores modificados para uso endodóntico. El ZOE es una mezcla de polvo y líquido. El polvo contiene óxido de zinc que potencia el flujo del cemento y el líquido contiene el eugenol que es el vehículo de la mezcla. Algunos fabricantes añaden paraformaldehído como antimicrobiano y germicida, para una acción antiséptica, o corticoesteroides, para suprimir las reacciones inflamatorias. El fraguado de los cementos a base de ZOE es un proceso químico combinado donde se fija el óxido de zinc y depende del pH y de la resistencia del agua. La causa del endurecimiento del cemento es la formación del eugenolato.(2)

2.1.4. Hidróxido de calcio

Actualmente existen diversos selladores en el mercado como SealapexTM (SybronEndo), RealSeal (SybronEndo), Apexit[®] y Apexit Plus[®] (Ivoclar - vivadent) que contienen hidróxido de calcio Ca(OH)₂. Estos selladores liberan iones hidroxilo y con ello, mantienen un pH alcalino que le confiere un gran efecto antimicrobiano. Además, tienen poca fuerza de cohesión.(2)

El SealapexTM (sybronEndo) tiene como componentes activos óxido de calcio y resinas de trimetilpropano, salicilato de neopentilglicol y salicilato de isobutilo. Sus características son buena plasticidad, corrimiento y radiopacidad. También, favorece la aposición de tejido calcificado en orificio apical.(5)

2.1.5. Ionómero de vidrio

Los selladores a base de ionómero de vidrio causan poca irritación tisular y tienen baja toxicidad *in vitro*. Uno de estos selladores es el Ketac-EndoTM (ESPE) que ha creado controversia en el mercado debido a su poca adherencia a la dentina.(5)

El Ketac-EndoTM (ESPE) tiene como componente principal el ionómero de vidrio y sus características son tiempo de fraguado corto y dificultad de retirarlo del conducto.(3)

2.1.6. Resina

Las resinas son polímeros de macromoléculas encontrados en la naturaleza como una goma. La goma posee diversas propiedades que le permiten ser un buen sellador de conductos radiculares. Como muchos de los selladores, la resina debe tener la capacidad de adherirse a la dentina preparada para el tratamiento de conductos y al material de obturación. Algunos ejemplos de este tipo de selladores son AH26[®] y AH PlusTM y EndoRez[®].(2)

El AH PlusTM tiene como componentes principales resina epoxidiamina, tungsteno, calcio, óxido de circonio y de hierro, aerosil y aceite de silicona. Sus características son fluidez alta, buena adherencia a la dentina, buena radiopacidad, tiempo de trabajo largo y baja solubilidad.(3)

2.1.7. Silicón

El silicón es también un material sellador de conductos radiculares a base de polidimetilsiloxano. Algunos ejemplos de este tipo de selladores son el *RSA RoekoSeal (Roeko)* y el *GuttaFlow® (Roeko)*.

El *RSA RoekoSeal (Roeko)* tiene como componentes principales polidimetilsiloxano, aceite de silicona, aceite de parafina, dióxido de circonio y, como catalizador, ácido hexacloroplatínico. Sus características son tiempo de trabajo de 15-30 min, elevada radiopacidad, buena solubilidad y fluidez, ligera expansión, buena biocompatibilidad con los tejidos. (3) El *RSA RoekoSeal (Roeko)* es menos citotóxico que el *SealapexTM*. (2)

2.1.8. Mineral trióxido agregado (MTA-FILLAPEX)

El principal componente de estos selladores es el mineral trióxido agregado.(3) El sellador MTA es un polvo blanco se mezcla con agua destilada y endurece en 4 horas.(5)

El *MTA-FILLAPEX Angelus®* tiene como componentes principales cemento portland, óxidos metálicos como el bismuto. Sus características son que puede utilizarse en un medio húmedo y tiene un pH alcalino.(5)

2.2. Normas y propiedades de los selladores

Las propiedades de los selladores se dividen en físicas y biológicas y éstas son regidas por las siguientes normas:

2.2.1. Propiedades físicas

La norma ANSI/ADA nº57 endodontic sealing material 2000 (corregida en 2006) rige las características de los materiales a usarse en endodoncia para el sellado de los conductos radiculares. Esta norma es una adaptación de la norma ISO6876:2001 y describe los métodos para evaluar las propiedades de los materiales selladores de los conductos. Los materiales se clasifican en dos tipos. Los tipo I se usan con un núcleo central y los tipo II se usan con o sin un núcleo central. Los materiales tipo I se dividen a su vez en tres clases. La clase 1 incluye materiales en forma de polvo y líquido que fraguan a través de un proceso distinto de la polimerización. La clase 2 incluye materiales en forma de dos pastas, que también fraguan a través de un proceso distinto de polimerización. Por último, la clase 3 incluye sistemas de polímeros y resina, que fraguan mediante polimerización. Las subclases de los materiales tipo II son iguales que las de los materiales tipo I, excepto por incluir también amalgamas metálicas.(2)

2.2.2. Propiedades biológicas

La norma ANSI/ADA nº41 rige las propiedades biológicas y describe los métodos de pruebas biológicas. Entre estas pruebas se incluyen evaluaciones de toxicidad general, toxicidad *in vivo*, análisis de mutagenicidad, pruebas de implantación y de uso.

Los materiales de relleno del conducto radicular son generalmente tóxicos y frecuentemente no cumplen las expectativas expresadas en la norma ANSI/ADA

nº41. No obstante los métodos descritos en estas especificaciones se pueden emplear para distinguir los materiales más tóxicos.(2)

2.3. Inflamación

La inflamación es una reacción que lleva a cabo nuestro cuerpo como un sistema de defensa ante alguna agresión (figura 1). La inflamación se presenta tanto sistémica como local y se caracteriza por una respuesta que involucra la presencia de mediadores químicos, células y líquido extravascular. Esta respuesta se localiza en la zona de lesión y es donde se eliminan células alteradas, agentes patógenos y se prepara la reparación del tejido.

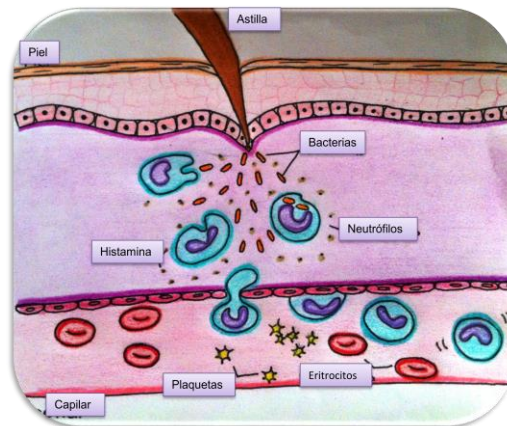


Figura 1. Dibujo que representa el proceso de inflamación. Modificado de http://ladanzaynuestrocuerpo.blogspot.mx/2013/07/que-es-la-inflamacion_22.html

Los signos de la inflamación son rubor (enrojecimiento), calor (aumento de temperatura), aumento de volumen, dolor y pérdida de la función.(6) La inflamación se divide en dos fases, la fase vascular y la fase celular.

2.3.1. Fase vascular

Inmediatamente después de una lesión, el primer cambio es un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos circundantes a la lesión. La vasodilatación

promueve la llegada de las células de defensa a la región de la lesión. El segundo cambio es una vasoconstricción. Como consecuencia, la región se congestiona, genera enrojecimiento y aumenta su temperatura.(7)

2.3.2 Fase celular

La fase celular está marcada por el aumento de células en la región de la lesión. Esta fase comprende varias etapas. La primera etapa es una marginación y adhesión leucocitaria al endotelio. Esto es, los leucocitos reducen su velocidad en el torrente sanguíneo y se adhieren a la pared endotelial iniciando un movimiento de rodamiento. La segunda etapa es una migración de los leucocitos hacia el espacio tisular. La tercera etapa es la quimiotaxis en la que los leucocitos que acaban de migrar atraen otras células del sistema inmunológico a través de quimioatrayentes como las quimiocinas. Finalmente, en la cuarta etapa se realiza la activación leucocitaria y la fagocitosis por parte de monocitos, neutrófilos y macrófagos.(7)

2.3.3. Neutrófilo

Los neutrófilos son leucocitos que forman parte del sistema inmunológico, son la principal línea de defensa de nuestro organismo y son conocidos como neutrófilos segmentados o leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos contienen un núcleo multilobulado y abundantes gránulos de almacenamiento (figura 2). Estos gránulos almacenan agentes bactericidas y enzimas lisosómicas. El neutrófilo maduro tiene en su interior tres tipos de gránulos: gránulos azurofílicos (que contienen mieloperoxidasa), gránulos específicos y gránulos que contienen gelatinasa. La principal función que se les ha atribuido a los neutrófilos es llegar a la región de la lesión y fagocitar las bacterias o partículas extrañas.(8) La mieloperoxidasa es una proteína producida en grandes cantidades por los neutrófilos y cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y iones cloruro en ácido hipocloroso. Este

ácido es un agente oxidante muy potente, oxida aminas, tioles, ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. (8)

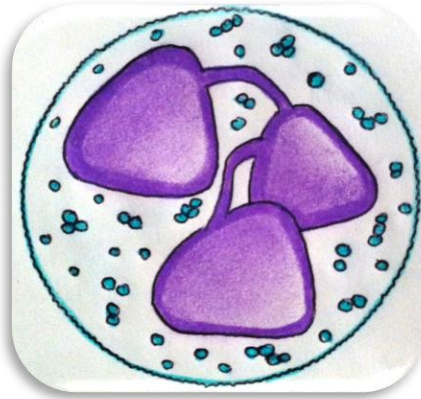


Figura 2. Dibujo de un neutrófilo con núcleo multilobulado y gránulos de secreción, modificado de Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". Licença CC-BY-NC-3.0.

3. ANTECEDENTES

Biocompatibilidad de los selladores endodónticos

Los selladores endodónticos idealmente son biocompatibles. Sin embargo, la mayoría al ser preparados, son citotóxicos y van disminuyendo su citotoxicidad conforme fraguan. Algunas veces, durante el proceso de obturación, los selladores se extruyen a través del ápice y esto permite el contacto del sellador con los tejidos perirradiculares. Los selladores, a su vez, pueden dificultar o interferir en el proceso de curación.(9)

Al evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los selladores se ha encontrado que el sellador AHPlusTM es uno de los selladores más citotóxicos, debido a que contiene resina.(10-12) Su citotoxicidad es más alta en fresco y disminuye con el tiempo, (13) esto es debido a que al polimerizar libera monómero.(14, 15)

Existen resultados controversiales con respecto al MTA-FILLAPEX[®]. Por una parte, se reporta que la citotoxicidad del sellador MTA-FILLAPEX[®] es baja en fresco y al igual que el AH PlusTM, la viabilidad celular aumenta con el tiempo de

fraguado. (9, 10) En contraste, en trabajos recientes se ha reportado que el MTA-FILLAPEX® muestra más citotoxicidad en fresco (16) y es más citotóxico con el tiempo de fraguado. (17)

El cemento Selapex™ en fresco es medianamente tóxico y con el tiempo de fraguado es biocompatible. El sellador RSA RoekoSeal es el único cemento que no demostró citotoxicidad en varios estudios, es altamente biocompatible con los tejidos. (9, 18, 19)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mercado existen diversos selladores endodónticos, sin embargo, no todos ellos poseen características ideales. Uno de los factores a considerar para utilizar un sellador endodóntico es que sea biocompatible. Las normas de la ANSI/ADA y las ISO nos permiten evaluar el grado de inflamación tisular que produce un sellador. En este estudio evaluaremos el grado de inflamación que generan los selladores AH-Plus®, Sealapex™, RSA RoekoSeal® y MTA-FILLAPEX® que son los selladores endodónticos más usados actualmente, en la clínica.

5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Existen diversos selladores en el mercado. Sin embargo, el grado de inflamación que puedan causar algunos selladores endodónticos sobre tejidos ha sido poco estudiado. En este trabajo decidimos evaluar la inflamación y citotoxicidad que producen los cuatro selladores. AH-Plus™, Sealapex™, RSA RoekoSeal® y MTA-FILLAPEX®, los tres primeros que ya existen en el mercado y el último es de reciente incorporación. La inflamación fue evaluada mediante la prueba de edema y la prueba de mieloperoxidasa.

6. HIPÓTESIS

El RSA RoekoSeal® al ser un material inocuo, no genera edema en las orejas de ratones, por lo que posee menor actividad inflamatoria que los otros tres selladores.

HIPÓTESIS ALTERNA

El RSA RoekoSeal® al no ser un material inocuo, genera edema en las orejas de ratones, por lo que posee mayor actividad inflamatoria que los otros tres selladores.

7. OBJETIVOS

Objetivo general.

Analizar el grado de inflamación que generan los selladores endodónticos AH-Plus®, Sealapex™, RSA RoekoSeal, MTA-FILLAPEX Angelus® en un modelo *in vivo*.

Objetivos particulares:

1. Obtener medios condicionados de los selladores endodónticos.
2. Manejar ratones de la cepa CD-1.
3. Realizar la prueba de edema inducido por TPA, en orejas de ratón, para medir inflamación.
4. Cuantificarla enzima mieloperoxidasa como indicador indirecto de presencia de neutrófilos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS:

8.1. Obtención de medios condicionados de selladores endodónticos

Los medios de cultivo condicionados en este caso, son medio de cultivo (DMEM) expuestos a cementos selladores endodónticos a diferentes tiempos: tiempo fresco (0 h), tiempo de fraguado (figura 3), tiempo 1, 24 y 72 horas, después de fraguado. Así, los medios condicionados contienen los compuestos químicos que liberan los cementos y se disuelven en el medio a esos tiempos.



Figura 3. Imagen de los cementos selladores, método de preparación y tiempo de fraguado.

Los selladores 1) AH PlusTM, 2) MTA-FILLAPEX[®], 3) RSA RoekoSeal, 4) SelapexTM se prepararon dentro de la campana de flujo laminar en condiciones estériles y de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes (figura 4). En losetas estériles sobre campos estériles se mezclaron los selladores que así lo requirieron y se colocaron dentro de cilindros de teflón (Tetraflón, Toluca, Estado México).

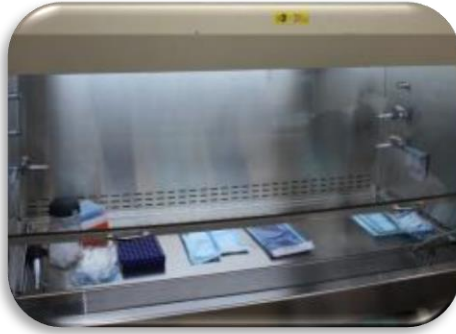


Figura 4. Fotografía de la campana de flujo laminar vertical con el material a utilizar.

- 1) En cajas de cultivo de 24 pozos, se colocó un cuadro de MylarSheet (Tetraflón, Toluca, Estado de México) estéril por pozo. Sobre cada uno de los cuadros se colocó un cilindro de teflón estéril de 5.5 mm de diámetro. Dentro de cada cilindro se colocó el sellador (figura 5). A cada pozo de cultivo se le agregó 1.5 mL de medio de cultivo (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY).

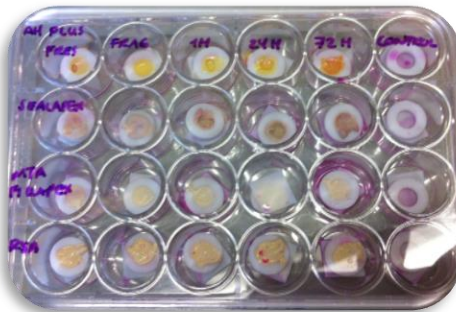


Figura 5. Fotografía de la placa de 24 pozos con los cilindros de teflón y los cementos selladores.

- 2) El medio de cultivo se dejó en contacto con el sellador por diferentes tiempos (figura 6) y luego se recolectó y transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se guardó a -20°C hasta su uso (figura 7).

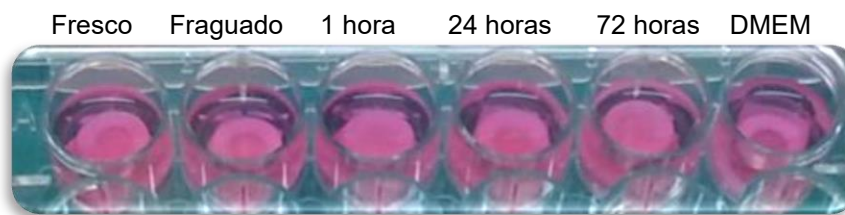


Figura 6. Fotografía de pozos con medio condicionado de los selladores.



Figura 7. Fotografía que muestra la colecta de los medios de cultivo condicionados.

- 3) Los medios condicionados de los cementos se obtuvieron en: fresco (tiempo inicial, 0 h), tiempo de fraguado, y 1, 24 y 72h después del fraguado. Como control de medio condicionado se recolecto medios que no fueron expuestos a ningún cemento, a los mismos tiempos.

8.2. Ratones

Los ratones adultos machos de la cepa CD1 (figura 8) de un peso entre 25 y 30 g, fueron donados del CINVESTAV Sur y se utilizaron bajo las condiciones de manejo y cuidado de animales de la norma NOM-62-Z00 1999.(20) Los ratones se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* con fotoperiodo de luz-obscuridad 12h/12h, temperatura 18 a 26°C y humedad relativa 40 a 70% en el bioterio del Instituto de Química de la UNAM, hasta su uso.

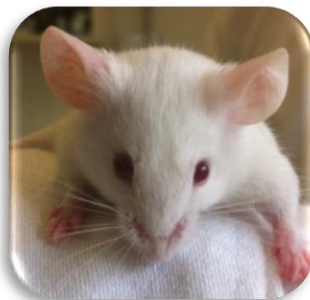


Figura 8. Fotografía de un ratón de la cepa CD1.

8.3. Edema inducido con TPA para medir inflamación

El TPA es un éster de forbol, su siglas significan 13-aceato-12-0-tetradecanoil-forbol (3) es un promotor de tumores e induce una respuesta inflamatoria de larga duración. El TPA es utilizado para inducir edema en las orejas de ratones y medir de forma indirecta la inflamación, a este ensayo se le denomina edema inducido por TPA y se realiza de la siguiente forma. Los controles de este experimento fueron el TPA que produce edema, el etanol que es el vehículo donde se disolvió el TPA, el DMEM, que es el vehículo para los medios condicionados y las biopsias de oreja intacta (blanco).

8.3.1. Procedimiento

1. Los ratones se seleccionaron de forma aleatoria en grupos de diez, se pesaron, se marcaron en la cola con plumón indeleble y se les asignó un número (figura 9).

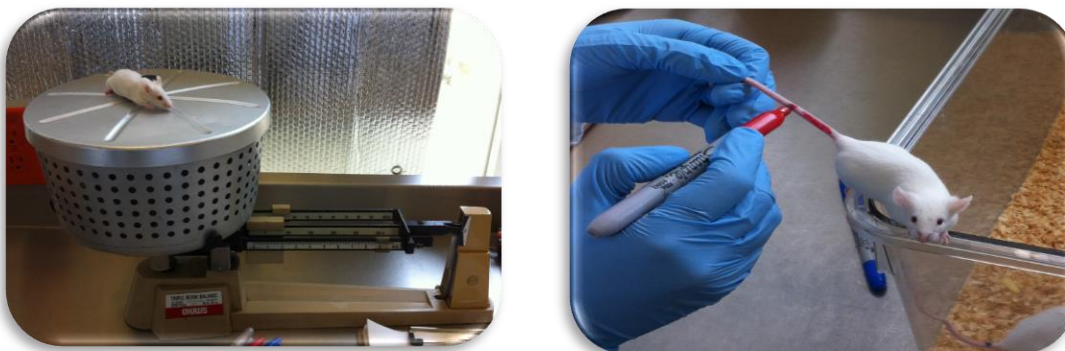


Figura 9. Fotografía de un ratón en la balanza granataria (izquierda) y de las marcas realizadas en sus colas (derecha).

- Los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 63 mg/Kg de peso, diluido en solución salina al 0.9% (figura 10).



Figura 10. Fotografías de inyección de anestesia intraperitoneal (izquierda) y de los ratones anestesiados (derecha).

- Una vez anestesiados (figura 10), se procedió a la aplicación tópica 20 μ L de medios condicionados en la oreja derecha del ratón (figura 11) y 20 μ L de DMEM en la oreja izquierda.

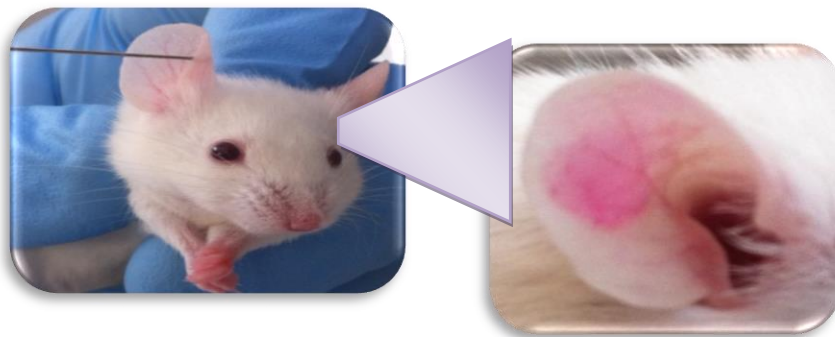


Figura 11. Fotografía de la aplicación tópica del medio condicionado en la oreja derecha del ratón (izquierda). Acercamiento (derecha).

- Después de cuatro horas, los ratones se sacrificaron con CO_2 y se tomó una biopsia de cada oreja con un sacabocados de 7 mm de diámetro que fue colocada en un microtubo (figura 12).

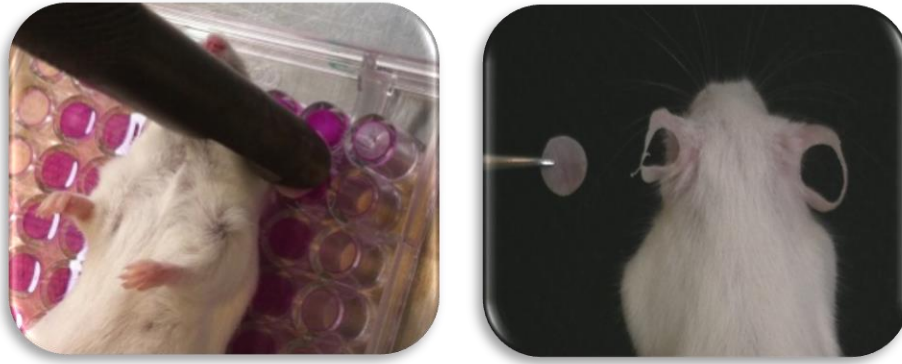


Figura 12. Fotografía de la toma de la biopsia de la oreja con un sacabocados de 7mm (izquierda). Orejas y biopsia de oreja (derecha).

- Los microtubos pesaron antes y después de colocar la biopsia de las orejas para conocer el peso real de cada biopsia (figura 13).

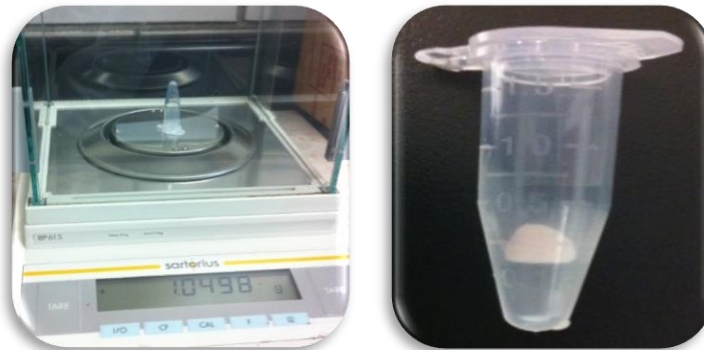


Figura 13. Fotografía de la balanza analítica con el peso del microtubo (izquierda). Tubo con biopsia (derecha).

Para obtener el peso real de la biopsia se pesan los tubos con la biopsia y se resta el peso de los tubos solos.

8.4. Ensayo de mieloperoxidasa

8.4.1. Procedimiento

1. Las biopsias de las orejas se colocaron en viales de 3mL conteniendo 1mL de 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) frío y se homogeniza por 30 segundos a 25,000rpm con un homogenizador de acero inoxidable marca OMNI (figura 14).

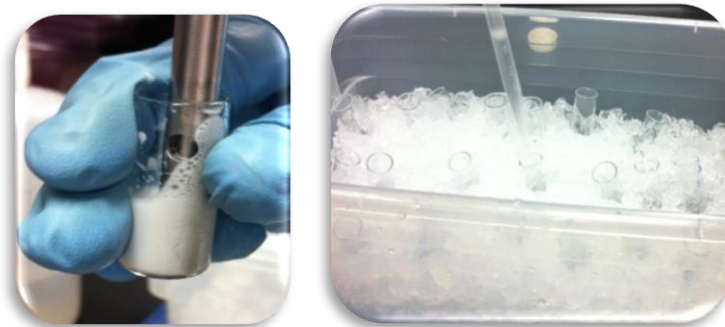


Figura 14. Fotografías de la homogenización del tejido (izquierda) y colocación de HTAB (derecha).

2. El homogeneizado se congeló y descongeló tres veces. Posteriormente, se sonicó tres veces por 20 s y se centrifugó 10 min a 12,000rpm a 4°C.
3. 10 μ L del sobrenadante de cada homogeneizado se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos (por cuadruplicado). A cada pozo, se agregaron 180 μ L de PBS (amortiguador de fosfatos) 80 mM, pH= 5.4 sin HTAB (figura 15).



Figura 15. Fotografía de la adición de sobrenadante de biopsias a la placa de 96 pozos.

4. La placa se calentó a 37°C y se mantuvo la temperatura durante el resto del ensayo (figura 16), se agregaron 20 μL de 0.017% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a cada pozo y se inició la reacción adicionado 20 μL de tetrametilbenzidina (TMB) 18.4 mM disuelto en DMF al 50% (figura 16).

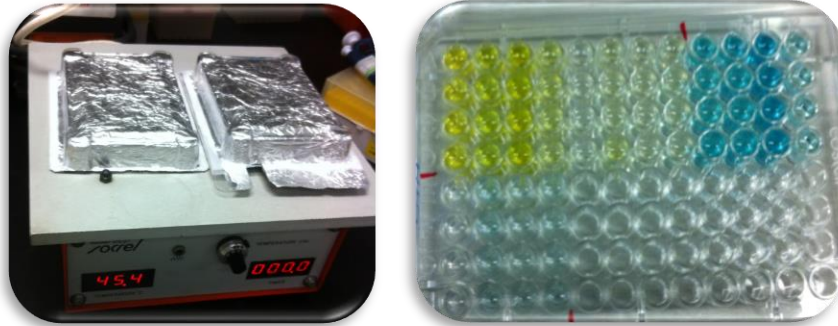


Figura 16. Fotografía de placas de 96 pozos siendo calentadas (izquierda). Reacción de mieloperoxidasa en color azul y al detenerse la reacción con la adición de H_2SO_4 el color vira a amarillo (derecha).

5. La reacción se incubó 5 min a 37°C con agitación suave y se detuvo agregado 20 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2M (figura 17). La absorbancia se midió en un lector de placas a 450nm (figura 17).(21)

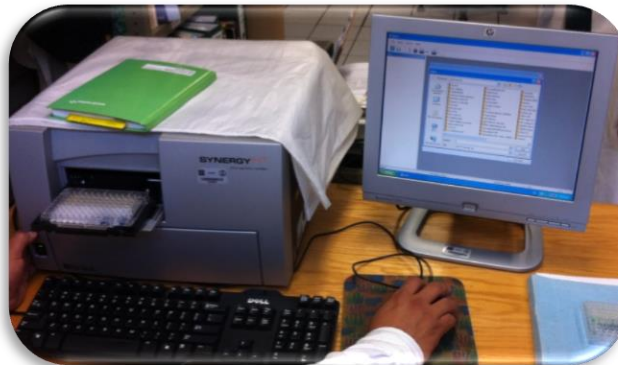


Figura 17. Fotografía de la lectura en un lector de placas.

9. ESTADÍSTICA

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer qué sellador induce el mayor grado de edema y posee la mayor actividad de reclutamiento de neutrófilos. La prueba post hoc usada fue Dunnet's.

10. RESULTADOS

10.1. Vehículos y TPA como inductores de edema

Para conocer si los cementos selladores causan inflamación utilizamos el método de edema inducido por TPA. Al aplicar un irritante, existe un aumento en el peso de las biopsias a causa del edema. El edema es entonces una manera indirecta de medir la inflamación producida por un material.

El TPA es el agente irritante que causa un severo edema en las orejas de los ratones ($23.9 \text{ mg} \pm 0.86$), mientras que los vehículos, etanol y medio de cultivo DMEM no generan inflamación (de 8 a 9 mg) (figura 18).

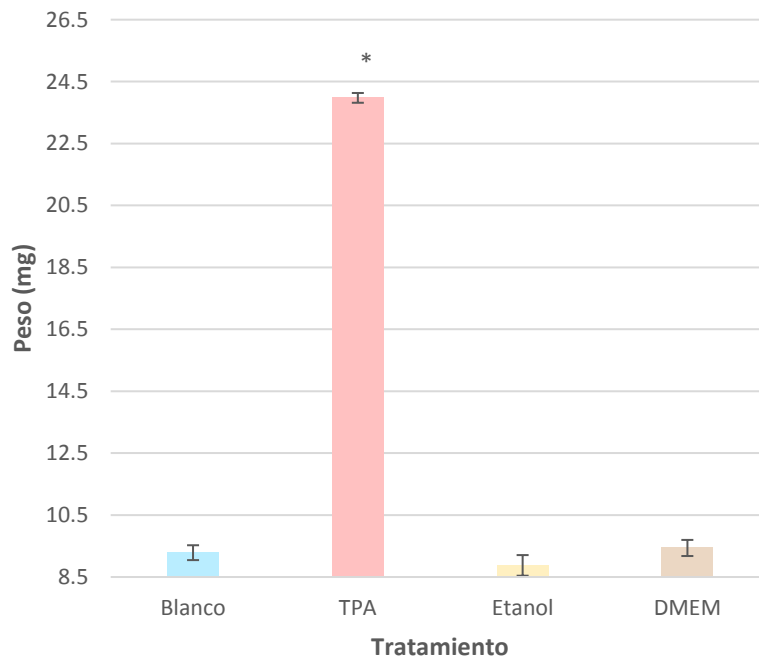


Figura 18. Peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones tratados con: sin tratamiento (blanco), TPA, etanol y medio de cultivo (DMEM). $n = 4$, $*P \leq 0.05$.

10.1.1. Inducción de edema generado por todos los cementos selladores

De los selladores, el AH-Plus genera el edema más severo. En cambio, el RSA, el Sealapex™ y el MTA-FILLAPEX® no parecen generar edema (figura 19).

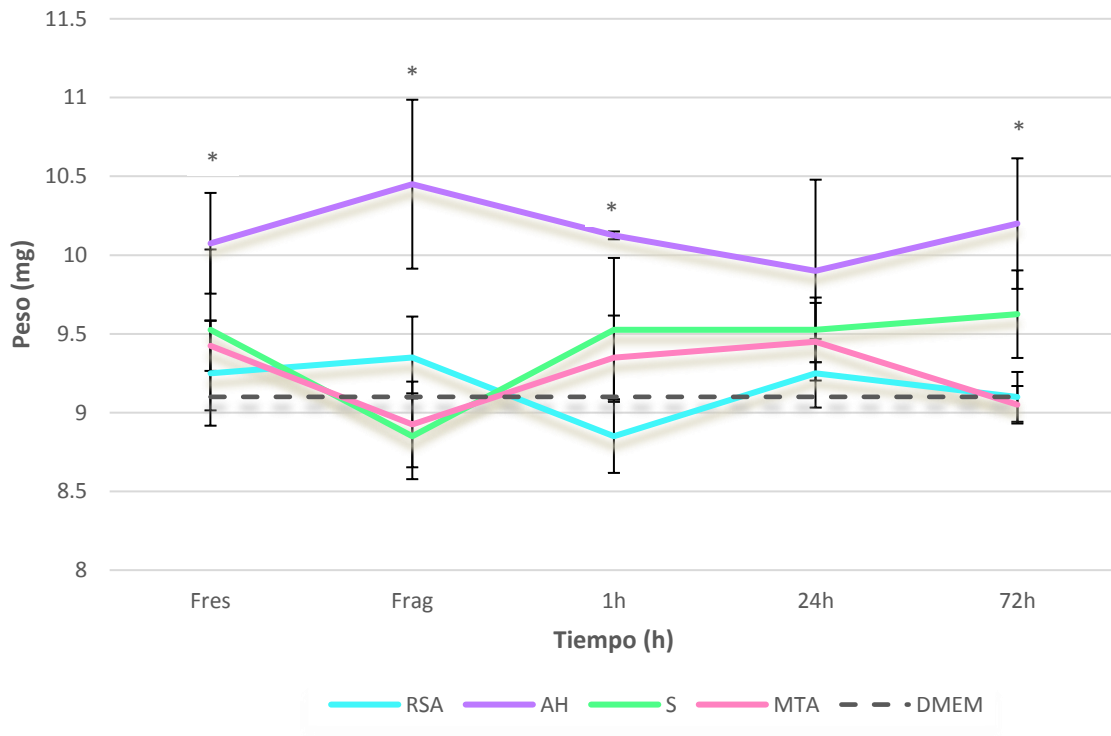


Figura 19. Gráfica de peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones bajo diferentes tratamientos. Las orejas fueron tratadas con medio de cultivo (DMEM), RSA RoekoSeal (RSA), AH-Plus™ (AH), Sealapex™ (S), MTA-FILLAPEX® (MTA) en condiciones de Fresco (Fres), Fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h) y 72 horas (72 h). n = 4, *P ≤ 0.05.

10.1.2. Inducción de edema generado por cada uno de los cementos selladores

El RSA RoekoSeal no genera edema. El peso de las orejas tratadas con RSA a los diferentes tiempos es muy parecido al de las orejas sólo tratadas con DMEM (figura 20).

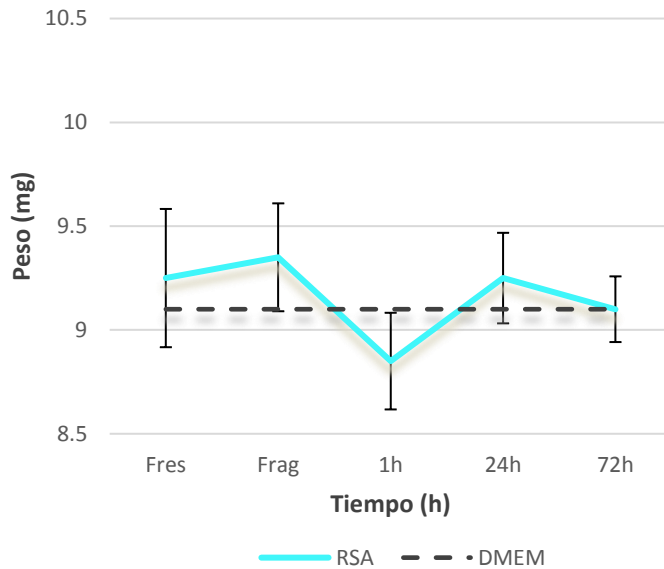


Figura 20. Gráfica de peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones tratados con el cemento sellador RSA RoekoSeal (RSA) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

El AH-Plus genera edema en el tiempo fresco, fraguado, 1 hora y 72 horas. Al parecer a 24 horas el edema es menor que a otros tiempos (figura 21).

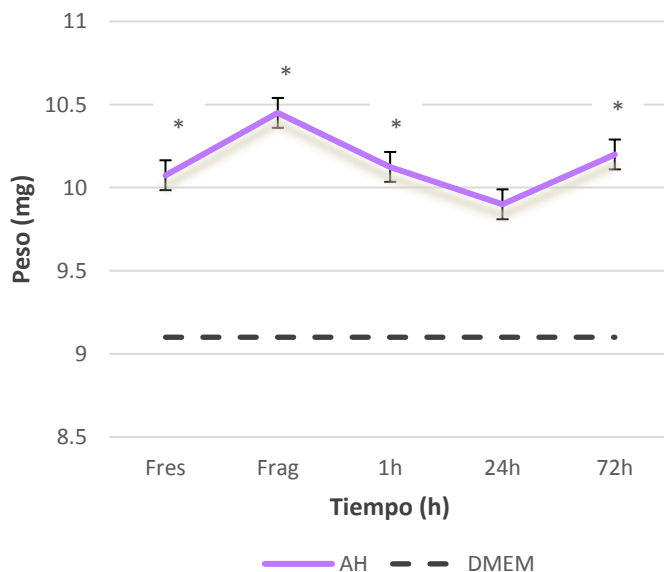


Figura 21. Gráfica de peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones tratados con el cemento sellador AH-Plus™ (AH) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

El Sealapex™ no genera edema. El peso de las orejas tratadas con Sealapex™ a los diferentes tiempos es muy parecido al de las orejas sólo tratadas con DMEM (figura 22).

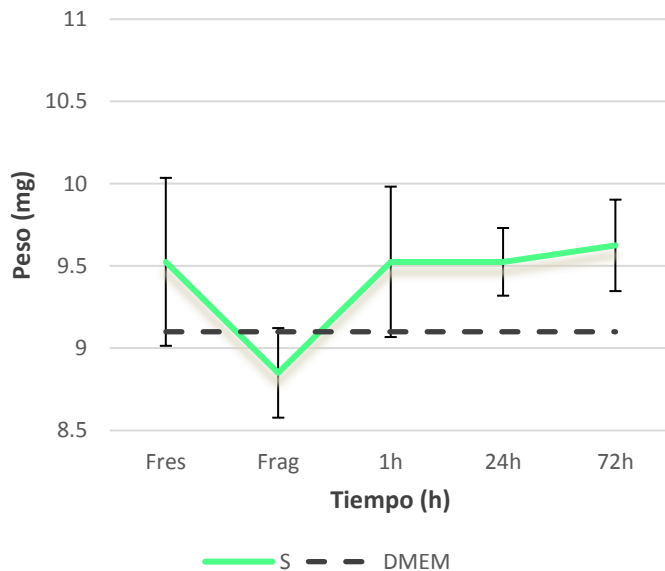


Figura 22. Gráfica de peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones tratados con el cemento sellador Sealapex™ (S) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag) , 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

El MTA-FILLAPEX (MTA) no genera edema. El peso de las orejas tratadas con MTA-FILLAPEX a los diferentes tiempos es muy parecido al de las orejas sólo tratadas con DMEM (figura23).

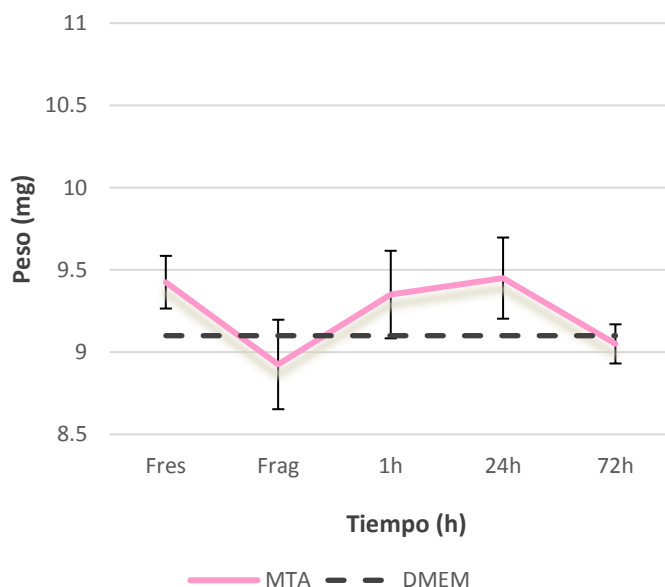


Figura 23. Gráfica de peso (mg) de las biopsias de las orejas de los ratones tratados con el cemento sellador MTA-FILLAPEX® (MTA) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

El único sellador que generó un poco de edema fue el AH-Plus en todas las condiciones probadas. Los demás cementos selladores no generaron edema.

10.2. Ensayo de actividad de mieloperoxidasa

Para conocer si los cementos selladores reclutan neutrófilos en el sitio de inflamación, utilizamos el método de ensayo de actividad de mieloperoxidasa. La mieloperoxidasa es una proteína muy abundante en los leucocitos polimorfonucleares por lo que es una manera indirecta de medir la infiltración de neutrófilos en un tejido en condiciones sanas o inflamado.

El TPA es el agente que recluta mayor número de neutrófilos en el área de inflamación (0.25 ± 0.03 ; figura 24). Los vehículos etanol y DMEM no generan reclutamiento de neutrófilos ($0.05 - 0.1$, figura 24).

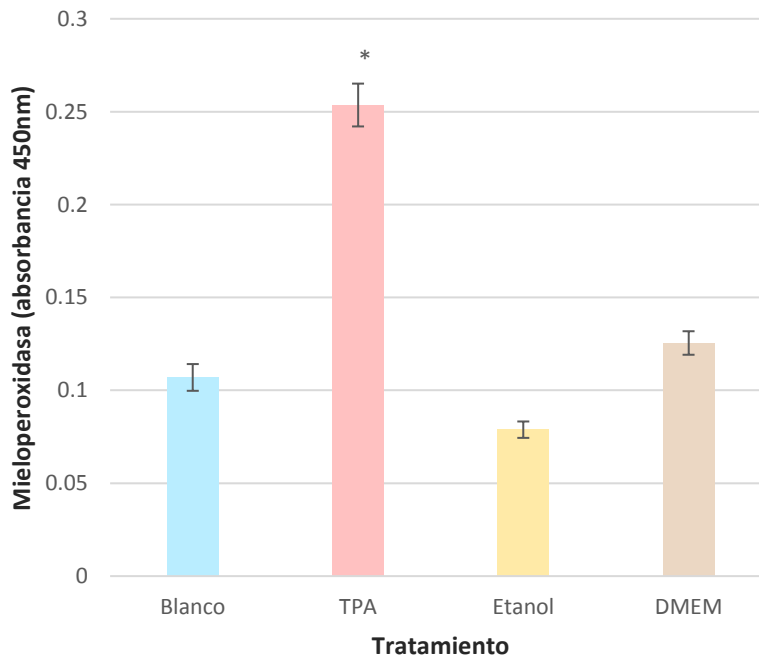


Figura 24. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm \pm ES) en las biopsias de las orejas de los ratones tratados con: sin tratamiento (blanco), TPA, etanol y medio de cultivo (DMEM).n = 4, *P \leq 0.05.

De los cementos selladores, el AH-Plus fraguado y el RSA fraguado generan el mayor reclutamiento de neutrófilos. En cambio, el RSA a 72 horas, el MTA fresco y a 1 hora no parecen generar reclutamiento de neutrófilos (figura 25).

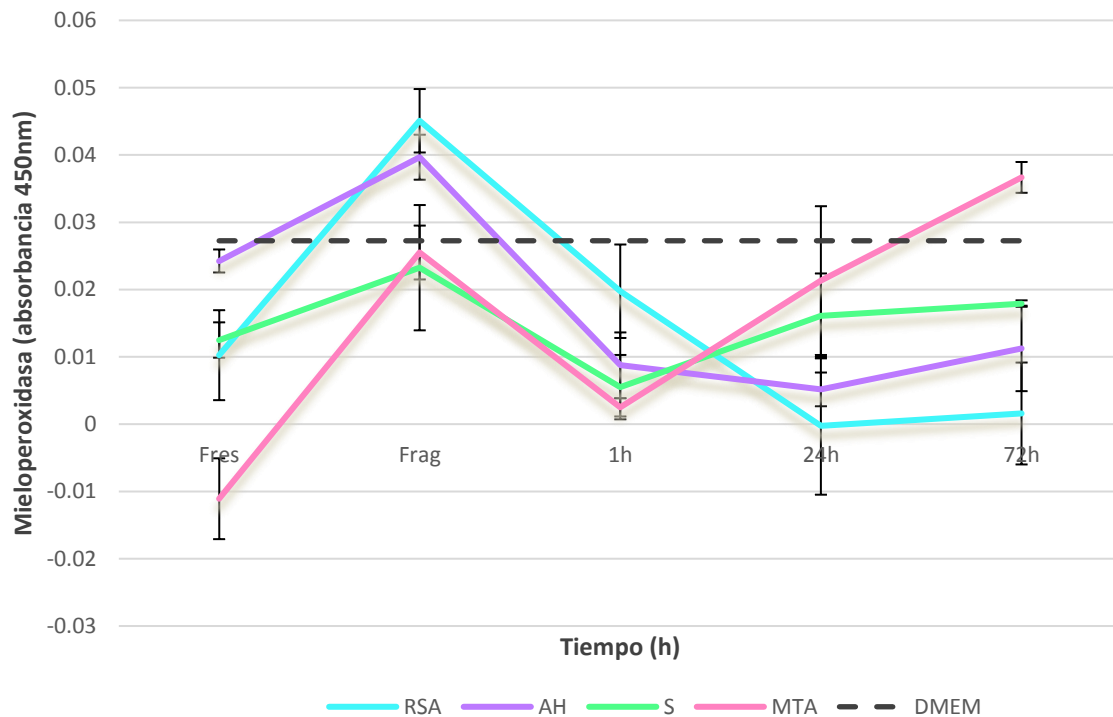


Figura 25. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm \pm ES) en las biopsias de las orejas de los ratones bajo diferentes tratamientos. Las orejas fueron tratadas con medio de cultivo (DMEM), RSA RoekoSeal (RSA), AH-PlusTM (AH), SealapexTM (S), MTA-FILLAPEX[®] (MTA) en condiciones de Fresco (Fres), Fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h) y 72 horas (72 h). n = 4, *P \leq 0.05.

10.2.1 Reclutamiento de neutrófilos generado por cada uno de los cementos selladores

El RSA RoekoSeal genera reclutamiento de neutrófilos en el tiempo fraguado y en los demás tiempos es menor que con sólo medio de cultivo (figura 26).

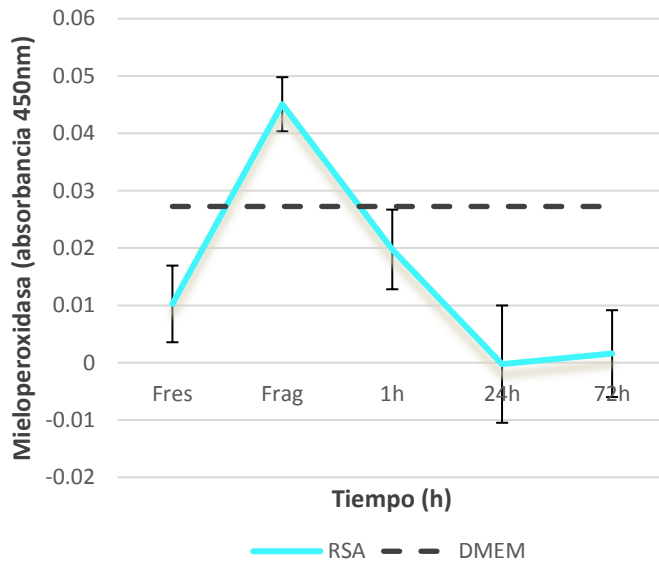


Figura 26. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm \pm ES) en las biopsias de las orejas de los ratones tratados con cementos sellador RSA RoekoSeal (RSA) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P \leq 0.05.

El AH-PlusTM genera reclutamiento de neutrófilos en el tiempo de AH fraguado y disminuye en los demás tiempos (figura 27).

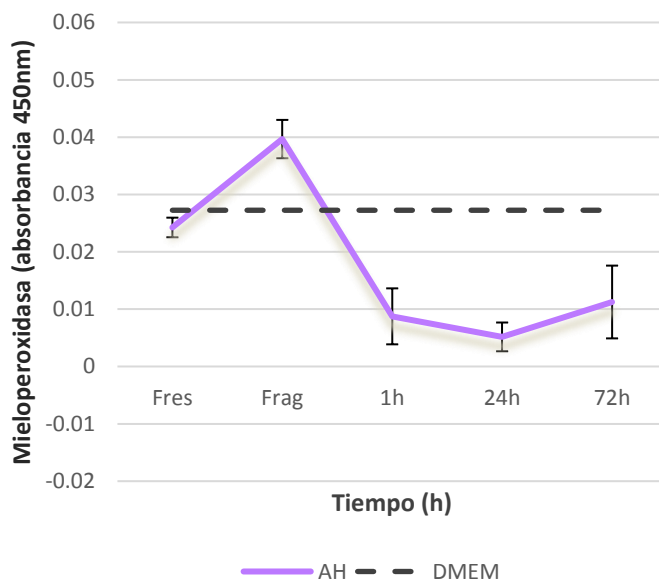


Figura 27. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm \pm ES) en las biopsias de las orejas de los ratones tratados con cementos AH-PlusTM, (AH) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P \leq 0.05.

El SealapexTM no genera reclutamiento de neutrófilos (figura 28).

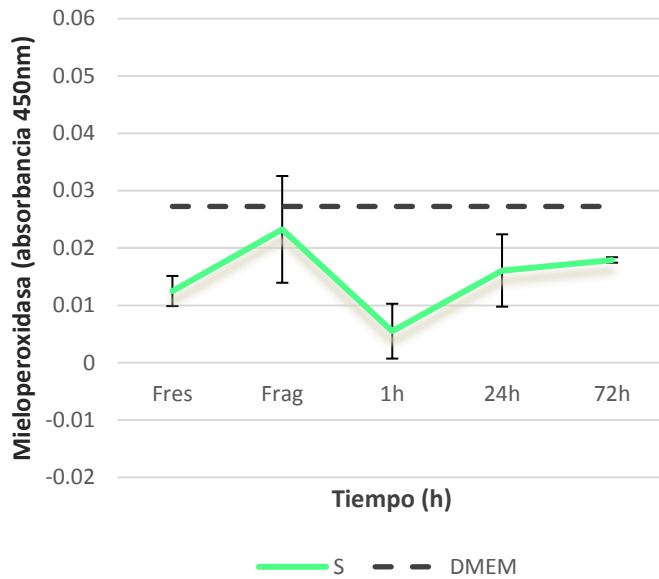


Figura 28. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm ± ES) en las biopsias de las orejas de los ratones tratados con cemento sellador SealapexTM (S) en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

El MTA-FILLAPEX[®] (MTA) no genera reclutamiento de neutrófilos (figura 29).

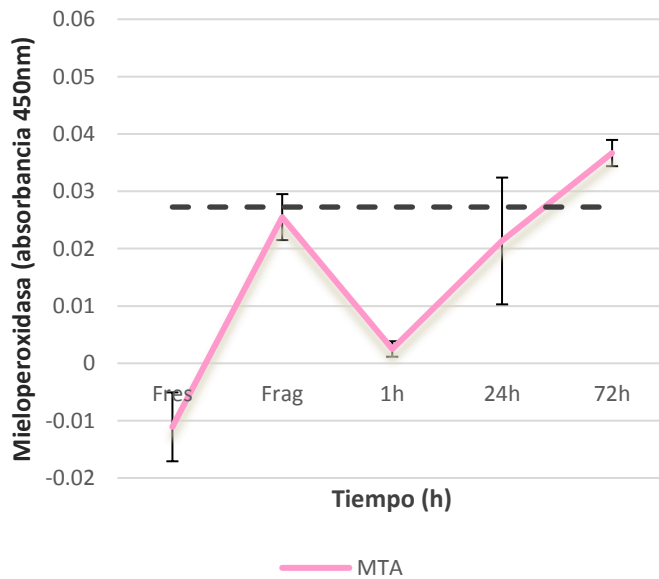


Figura 29. Producción de mieloperoxidasa (absorbancia nm ± ES) en las biopsias de las orejas de los ratones tratados con cemento sellador MTA-FILLAPEX[®] (MTA), en condiciones de fresco (Fres), fraguado (Frag), 1 hora (1h), 24 horas (24 h), 72 horas (72 h) y medio de cultivo DMEM (línea punteada) n = 4, *P ≤ 0.05.

11. DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos el grado de inflamación que poseen cuatro selladores endodónticos, RSA RoekoSeal, AH-PlusTM, SealapexTM y MTA-FILLAPEX[®] en condiciones de fresco, fraguado, 1, 24 y 72 horas. Para conocer este grado de irritación, se usó el método de inflamación por edema y para evaluar la cantidad de neutrófilos que se reclutaron en el sitio de aplicación de los selladores, se midió la cantidad de mieloperoxidasa producida.

Nuestros resultados muestran que el único sellador que produjo inflamación fue el AH-Plus. Dicha inflamación recluta neutrófilos en las primeras horas de exposición, sin embargo el reclutamiento de neutrófilos cesa al tiempo de fraguado. A nuestro saber, este es el primer estudio que evalúa el grado de inflamación producido por selladores en un modelo *in vivo*. En general, existen trabajo sobre diversos cementos selladores y su acción proinflamatoria o citotóxica en modelos *in vitro*. En el caso del RSA se ha documentado ser no citotóxico (22) o tener toxicidad parecida al AH-PlusTM en condiciones de fraguado. Se sabe que el sellador AH PlusTM es muy citotóxico (12, 13, 23, 24) y destruye las células en las primeras horas después de ser mezclado (25, 26). El SealapexTM es menos citotóxico, probablemente por sus propiedades de liberar iones de calcio y promover un pH alcalino (27). Por otra parte, el MTA-FILLAPEX Angelus es menos citotóxico que AH PlusTM y el RSA RoekoSeal, (28).

Es importante mencionar que los selladores fueron probados en tejido vivo y que ninguno de los selladores causó una inflamación parecida a la del TPA. Al realizar los tratamientos de conductos muchas veces existe cierto grado de inflamación o de sensibilidad por la misma manipulación. Estudios bajo estas condiciones serían ideales para conocer el grado de inflamación de los tejidos periapicales.

12. CONCLUSIONES

El AH-Plus genera una inflamación, mientras que ninguno de los otros selladores endodónticos genera inflamación. La inflamación generada por el AH-Plus recluta neutrófilos mientras el sellador está fresco y hasta el tiempo de fraguado. Después del tiempo de fraguado, al disminuir la inflamación, también disminuye la cantidad de neutrófilos reclutados.

Los selladores endodónticos en general no producen inflamación en el sitio de aplicación.

13. ABREVIATURAS

ZOE: Óxido de zinc y Eugenol

Ca(OH)₂: Hidróxido de calcio

AH: AH PlusTM

RSA: RoekoSeal

S: SealapexTM

MTA: FILLAPEX Angelus®

ANSI: Instituto Nacional Estadounidense de Estándares

ADA: Asociación Dental Americana

NOM-62-Z00: NORMA Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

TPA: éster de forbol 13-aceato-12-0-tetradecanoil-forbol

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

TMB: Tetrametilbenzidina

DMF: Dimetilformamida

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Soares IJ. Endodoncia Técnicas y fundamentos. Buenos Aires 2012.
2. Cohen S. Vías de la pulpa 2011. 263-269, 786-789 p.
3. Sahli CC. Endodoncia Técnicas clínicas y bases científicas. España 2014.
4. Torabinejad M. Endodoncia principios y practica 2010. 17-20, 302-307 p.
5. Soares IJ, Goldberg F. Endodoncia técnica y fundamentos 2012. 225-246 p.
6. Rubin R. Patología: fundamentos clinicopatológicos en medicina 2012. 47-80 p.
7. Grossman SC. Phort fisiología alteraciones de la salud. conceptos básicos 2014. 307-321 p.
8. Parslow TG. Inmunología básica y clínica 2002. 23-45 p.
9. Martinez Vaquero R, Eileen Uribe-Querol, Enrique C, Carlos R. Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de cuatro cemento selladores endodóncicos sobre fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos de ratón de la linea celular L929. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México 2014.
10. Esra PG, Mehmet EY, Mehemet BY, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calciumsilicate based endodontic cements. Appl Oral Sci. 2014;21(4):351.
11. Souza CJA, Montes CRM, Pasco EA, Loyola AM, MA V. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, Endo REZ, and Epiphany root Canal Sealers. Endod. 2006;32:656-662.
12. Silva EJNLd, Santos CC, Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. Journal of Applied Oral Science. 2013;21(1):43-47.
13. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, R. SdS. Realease of formaldehyde by 4 endodontic sealers. Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88:221-225.
14. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. Journal of Endodontics. 2000;26(4):228-229.
15. Eick JD, Smith RE, Pinzino CS, Kostoryz EL. Stability of silorane dental monomers in aqueous systems. Journal of Dentistry. 2006;34(6):405-410.
16. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. Journal of Endodontics. 2013;39(2):274-277.
17. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KCdS, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. Brazilian dental journal. 2013;24(2):111-116.

18. Eldeniz A, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl J. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International endodontic journal*. 2007;40(5):329-337.
19. Lodiené G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *International Endodontic Journal*. 2008;41(1):72-77.
20. De Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*. 2002;138(3):295-298.
21. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982;78(3):206-209.
22. Peralta Pérez M, Uribe-Querol E, García Aranda RL, Gutiérrez Opsina G. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón. *Revista Odontológica Mexicana*. 2010;10(2).
23. Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos A, Silva L, Silva R, et al. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *International endodontic journal*. 2011;44(5):440-446.
24. Al-Hiyasat A, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International endodontic journal*. 2010;43(2):148-153.
25. Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2009;91(2):839-844.
26. Correa GTB, Veranio GAC, Silva LE, Hirata JR, Coil JM, Scelza MFZ. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *Journal of Applied Oral Science*. 2009;17(5):457-461.
27. Fermín TB, Dextre TLO, das Neves LT, Pinheiro CR, Nishiyama+ CK. Actividad antimicrobiana y biocompatibilidad de los cementos endodóncicos a base de hidróxido de calcio. *Revista ADM*. 2016;73(2):60-64.
28. da Silva Linhares G, Cenci MS, Knabach CB, Oliz CM, Vieira MA, Ribeiro AS, et al. Evaluation of pH and Calcium Ion Release of a Dual-cure Bisphenol A Ethoxylate Dimethacrylate/Mineral Trioxide Aggregate-based Root-end Filling Material. *Journal of endodontics*. 2013;39(12):1603-1606.