

Trabajo de investigación

COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE DOS CEMENTOS AUTOACONDICIONANTES SOBRE UNA LÍNEA DE CÉLULAS SIMILARES A ODONTOBLASTOS MDPC-23.

CITOTOXICITY COMPARISON EFFECT OF TWO SELF-ETCH RESIN-BASED LUTING CEMENTS APPLIED ON THE ODONTOBLAST-LIKE CELLS MDPC-23.

Bastidas D.¹, Saavedra M.¹, Castilla L.¹, Herrera M.¹, Rueda C.¹, Pinzón F.¹, Riveiro A.¹, Sacono N.¹, De Souza Costa C.²

1. Rehabilitación Oral, Fundación Centro de Investigación y Estudios Odontológicos CIEO, Bogotá, Colombia.

2.. Universidad Estadual Paulista/UNESP, Departamento de Fisiología y Patología, Araraquara, S.P., Brasil.

Autor responsable: María Clara Saavedra maclasaa@yahoo.com

RESUMEN

Objetivo: Comparar los efectos citotóxicos de los cementos autoacondicionantes SmartCem™2 (Caulk Dentsply, Milford, DE, USA) y RelyX™U200 (3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA) sobre una línea de células inmortalizadas MDPC-23 mediante el test de elución de extractos.

Método: Se elaboraron 30 discos con dos cementos autoacondicionantes de 2mm de grosor y 5mm de diámetro. Los especímenes fueron fotocurados durante 40 segundos y colocados en el fondo de dos placas de 24 pozos; se adicionó 1ml de Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) libre de suero y fueron llevados a la incubadora durante 24 horas; con los extractos se formaron dos grupos experimentales: grupo 1: SmartCem™2 y grupo 2: RelyX™U200; el grupo control solo con medio de cultivo. Los extractos fueron aplicados a la línea de células similares a odontoblastos MDPC-23. Después de 24 horas, se determinaron los efectos citotóxicos con los tests: metabolismo celular (MTT), actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y evaluados con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Los datos de MTT se analizaron mediante el estadístico ANOVA 1 vía y Tukey. El test de ALP se analizó con el estadístico Kruskal Wallis y Wilcoxon.

Resultados: La comparación del metabolismo celular entre el grupo 1 experimental (SmartCem™2) y el grupo control mostró diferencia altamente significativa ($p=1E-05$ Tukey) y para la ALP la diferencia fue significativa ($p=0.03$ Wilcoxon). La comparación entre el grupo 2 experimental (RelyX™U200) y el control no fue significativa. La comparación de la citotoxicidad en MTT entre los dos grupos experimentales fue mayor en el grupo 1 con diferencia altamente significativa ($p=1E-05$ Tukey), para la ALP no fue significativa.

Conclusiones: Basados en el protocolo utilizado en esta investigación, se concluyó que el cemento autoacondicionante SmartCem™2 presentó mayor citotoxicidad al ser aplicado sobre células MDPC-23, que el RelyX™U200.

Palabras Clave: Cemento autoacondicionante, Citotoxicidad, Odontoblastos, Cultivo celular.

ABSTRACT

Objectives: Compare cytotoxic effects of self-etching cements SmartCem™ 2 (Dentsply Caulk, Milford, DE, USA) and RelyX™ U200 (3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA) on a line of immortalized cells MDPC-23 by the test extracts elution.

Methods: 30 discs with two different self-etching cements, 2mm thick and 5 mm in diameter were prepared. The samples were light cured for 40 seconds and placed in the bottom of two 24-well dishes; it was added 1 ml of Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) serum-free and were taken to the incubator for 24 hours; with extracts two experimental groups were formed Group 1: SmartCem™ 2 (Caulk Dentsply, Milford, DE, USA); and group 2: RelyX™ U200 (3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA); In control group (G3) only fresh DMEM was applied on the cells. The extracts were applied to the line odontoblast-like cells MDPC-23 previously seeded (30.000 cells/cm²). After 24hours cytotoxic effects were determined by MTT assay (cell metabolism - CM) and ALP assay (alkaline phosphatase activity - APA). Cell metabolism (MTT), activity of alkaline phosphatase (ALP) and evaluated with Scanning Electron Microscope (SEM); The MTT data were analyzed statistically by 1-way ANOVA and Tukey. The ALP test was analyzed with statistical Kruskal Wallis and Wilcoxon.

Results: Higher cytotoxicity, characterized by decrease in CM and APA was observed in G1 compared to G2 and G3 (control group) ($p<0.05$). In G2, only slight cytotoxicity was observed, which was not different from G3 ($p>0.05$). Considering G3 (control) as 100% of CM and APA, it was demonstrated that: G1 and G2 decreased the CM by 41% and 1%, respectively. In addition, G1 and G2 reduced the APA by 30% and 17.5% respectively.

Conclusions: Based upon the research protocol used in this study it can be concluded that the self-etch resin-based luting cement SmartCem 2 is more toxic to the MPDC-23 cells than RelyX U200.

Key Words: Biocompatibility, Biomaterials, Cell culture, Odontoblast, Self-etch cement



INTRODUCCIÓN

Los componentes presentes en los materiales dentales producen efectos citotóxicos mediante diferentes mecanismos, entre ellos: la liberación de monómeros residuales durante la conversión monómero – polímero, la cual ocurre durante las primeras horas después de la fotopolimerización; la inactividad de los grupos metacrilatos; la liberación de sustancias por la erosión y degradación del material a través del tiempo; la liberación de iones y la presencia de bacterias en la interfase. A pesar del gran esfuerzo industrial por erradicar estos problemas aun no lo han logrado.¹

Los monómeros de metacrilato presentes en las formulaciones de los materiales a base de resina han sido ampliamente estudiados ya que pueden difundirse a través de la dentina hacia el espacio pulpar; entre ellos el bisfenol A glicidil metacrilato (Bis-GMA), dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA), el dimetilacrilato de uretano (UDMA) y el hidroxietilmetacrilato (HEMA), los cuales pueden causar efectos adversos;²⁻⁵ también se ha estudiado que la presencia de la canforoquinona (CQ), utilizada como fotoiniciador presenta altos niveles de citotoxicidad y puede actuar como un agente mutagénico.⁶⁻⁸

Para determinar dichos efectos existen diferentes pruebas de biocompatibilidad que permiten evaluar con gran exactitud las propiedades de los biomateriales, evitando al máximo cualquier riesgo a la salud del paciente. Específicamente para el área odontológica, la evaluación completa de un material para poder ser usado, incluye una secuencia de pruebas (in vitro, in vivo, sobre animales y finalmente

sobre humanos) de acuerdo a las normas ANSI/ADA, ISO y FDI, que corresponden al paradigma clásico de evaluación de la biocompatibilidad de los materiales nuevos. Este paradigma fue creado para evaluar eficazmente la cantidad de nuevos materiales y así mantener la economía, la ética y limitar el daño potencial o sufrimiento a los animales y humanos.⁹ La Sociedad Europea de biomateriales definió la biocompatibilidad como “la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica”.

El riesgo de toxicidad pulpar depende de la capacidad de los componentes de cada material para difundirse a través de la dentina y alcanzar la pulpa, por tal motivo, diversos autores¹⁰⁻¹⁸ han realizado investigaciones in vitro para determinar y evaluar los efectos citotóxicos que éstos tienen antes de ser utilizados in vivo.

Por ejemplo, De Souza-Costa y colaboradores¹⁰ en 1999 evaluaron in vitro el efecto citotóxico de 3 sistemas adhesivos: Single Bond™ (3M ESPE), Prime & Bond 2.1® (Dentsply Caulk) y Syntac Sprint® (Ivoclar Vivadent) sobre una línea de células inmortalizadas similares a odontoblastos MDPC-23, encontrando que todos los sistemas adhesivos son citotóxicos por sus componentes Y sugiriendo que se debe reevaluar el uso de estos materiales.

Huang y colaboradores en 2002¹¹, también, investigaron la citotoxicidad in vitro de 5 adhesivos dentinales: Clearfil™SE (Kuraray Medical Inc), Heliobond® (Ivoclar Vivadent), Prime & Bond NT® (Dentsply Caulk), Single Bond™ (3M ESPE) y Syntac® Single Component (Ivoclar Vivadent), sobre un cultivo de células pulpares humanas obtenidas de terceros molares impactados, concluyendo que

Tabla 1: Componentes principales de los cementos autoacondicionantes evaluados.

PRODUCTO	COMPONENTES
SmartCem™2 Caulk DENTSPLY Cemento autoacondicionante de curado dual, con liberación de flúor.	<ul style="list-style-type: none"> • Urethane Dimethacrylate Resin UDMA • Urethane Modified Bis GMA Dimethacrylate Resin • Polymerizable dimethacrylate Resins • Polymerizable trimethacrylate resin • Strontium Fluoride • Barium Boron Fluoro Alumino Silicate Glass • Hydrophobic Amorphous Silica Dioxide • EBPADMA urethane resin • PENTA • Phosphene oxide photoinitiator • Phosphoric acid modified acrylate resin • Organic peroxide initiator • Camforoquinona
RelyX™U200 3M ESPE Cemento autoacondicionante de curado dual. Espatulado manual	<ul style="list-style-type: none"> • Silane treated Glass Powder • 2 Propenoic Acid, 2 Methyl, 1, 1' - [1-(Hydroxymethyl)-1,2-Ethanediy] Ester, reaction products with 2-Hydroxy-1,3- Propanediyl dimethacrylate and Phosphorus Oxide • Triethylene Glycol dimethacrylate (TEGMA) • Silane treated Silica • Sodium Persulfate • Calcium Hydroxide



todos fueron citotóxicos dependiendo del material evaluado, por lo tanto, sugieren el reemplazo de las sustancias citotóxicas por otras alternativas que produzcan menor citotoxicidad. Es importante resaltar que los autores suponen que la circulación de la pulpa in vivo reducirá la concentración de agentes citotóxicos, ya que la dentina es una barrera importante contra los efectos o sustancias del agente adhesivo.

Más adelante, De Mendonça y colaboradores¹⁶, en 2007 evaluaron los efectos citotóxicos de los cementos: Hydro C (Dentsply Caulk), Vitrebond™ (3M ESPE), RelyX™ Luting (3M ESPE) y RelyX™ Unicem (3M ESPE) aplicados sobre células similares a odontoblastos MDPC-23 incubadas por 24 horas y 7 días, concluyendo que para el Hydro C, Vitrebond™ y RelyX™ Luting se presentaron los efectos citotóxicos más intensos, al contrario de RelyX™ Unicem, que presentó la más baja citotoxicidad, debido a que sus componentes no se liberan tan rápido al medio de cultivo.

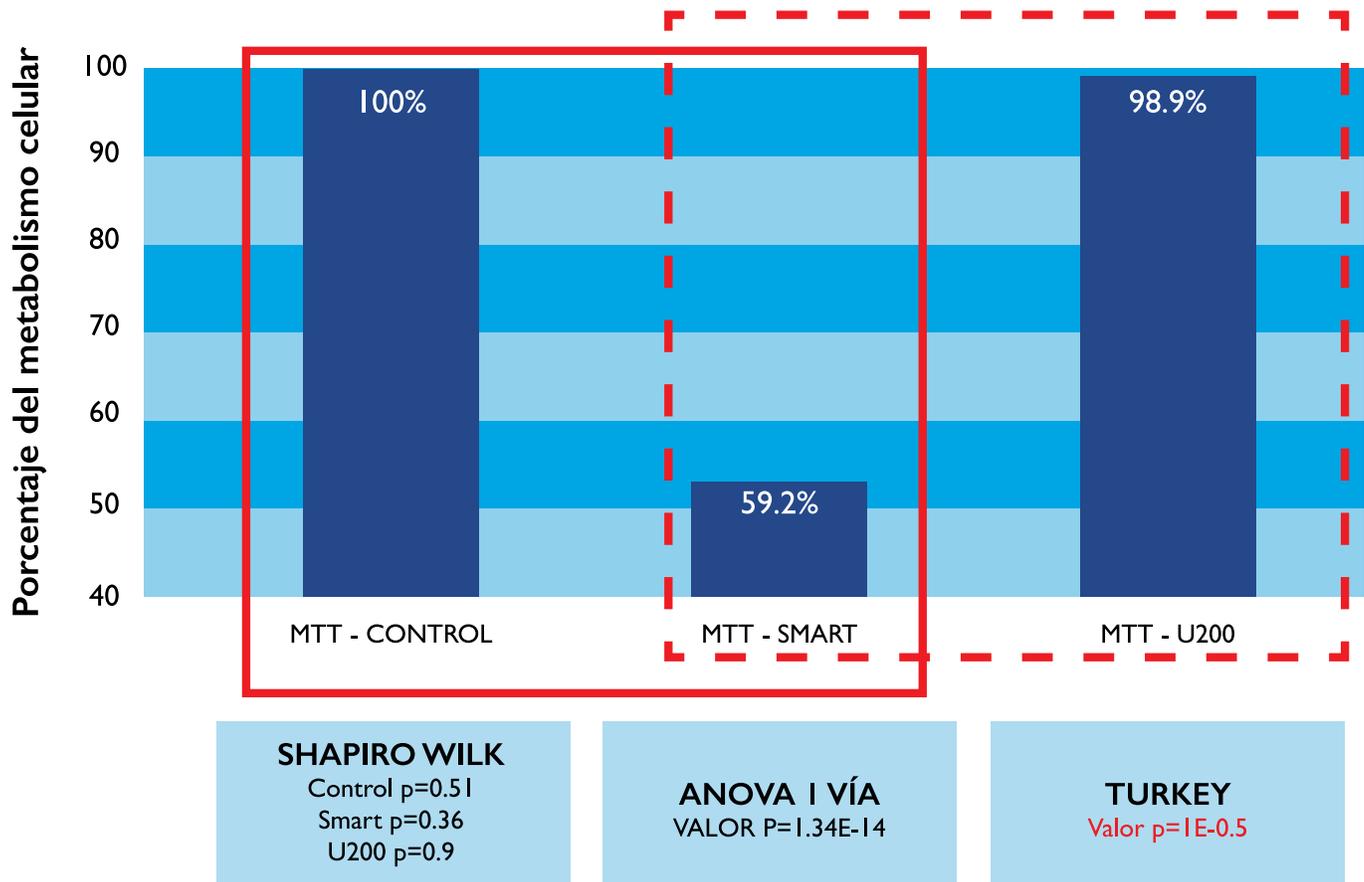
En el 2008, Yasuda y colaboradores¹⁷ compararon la citotoxicidad de cinco adhesivos dentinales de un solo paso: Absolute (Dentsply Sankin), Adper™ Prompt™ (3M ESPE), AQ Bond Plus (Sun Medical), G-Bond™ (GC Dental Products Corp.) y Clearfil Tri-S Bond (Kuraray Medical Inc) sobre pulpa dental humana y células similares a odontoblastos. Los resultados indicaron que la citotoxicidad difiere marcadamente dependiendo del adhesivo utilizado, por lo cual su-

gieren tener en cuenta el grosor de la capa híbrida cuando la acidez de los monómeros aumente.

Durante el mismo año, Schmid-Schwab y colaboradores¹⁸ evaluaron ocho cementos dentales: Nexus 2® (Sybron Kerr), Variolink® II (Ivoclar Vivadent), Harvard® (Harvard dental GmbH), RelyX™ Unicem (3M ESPE), Panavia™ 21 (Kuraray Medical Inc), FujiCEM® (GC Dental Products Corp.), Durelon® (3M ESPE) y MaxCem® (Sybron Kerr), utilizando un cultivo de fibroblastos estandarizados L929. Observaron que todos los cementos presentaron una citotoxicidad significativa a las 24 horas, la cual disminuyó después de 7 días de preincubación y concluyeron que los cementos dentales tienen un riesgo potencial de causar daño al tejido, siendo mayor o menor de acuerdo al tipo de curado del material y la marca utilizada.

Actualmente, se han introducido en el mercado una variedad de cementos autoacondicionantes que han sido recomendados para la cementación de restauraciones indirectas, los que muy posiblemente van a jugar un papel importante en la rehabilitación y en la salud oral de los pacientes, sin embargo, estos cementos no han sido ampliamente estudiados. El objetivo del estudio fue comparar los efectos citotóxicos de dos cementos autoacondicionantes aplicados directamente sobre una línea de células inmortalizadas MDPC-23, derivada de la papila del molar de ratón y caracterizada como células similares a odontoblastos. Esta investigación puede ser de gran

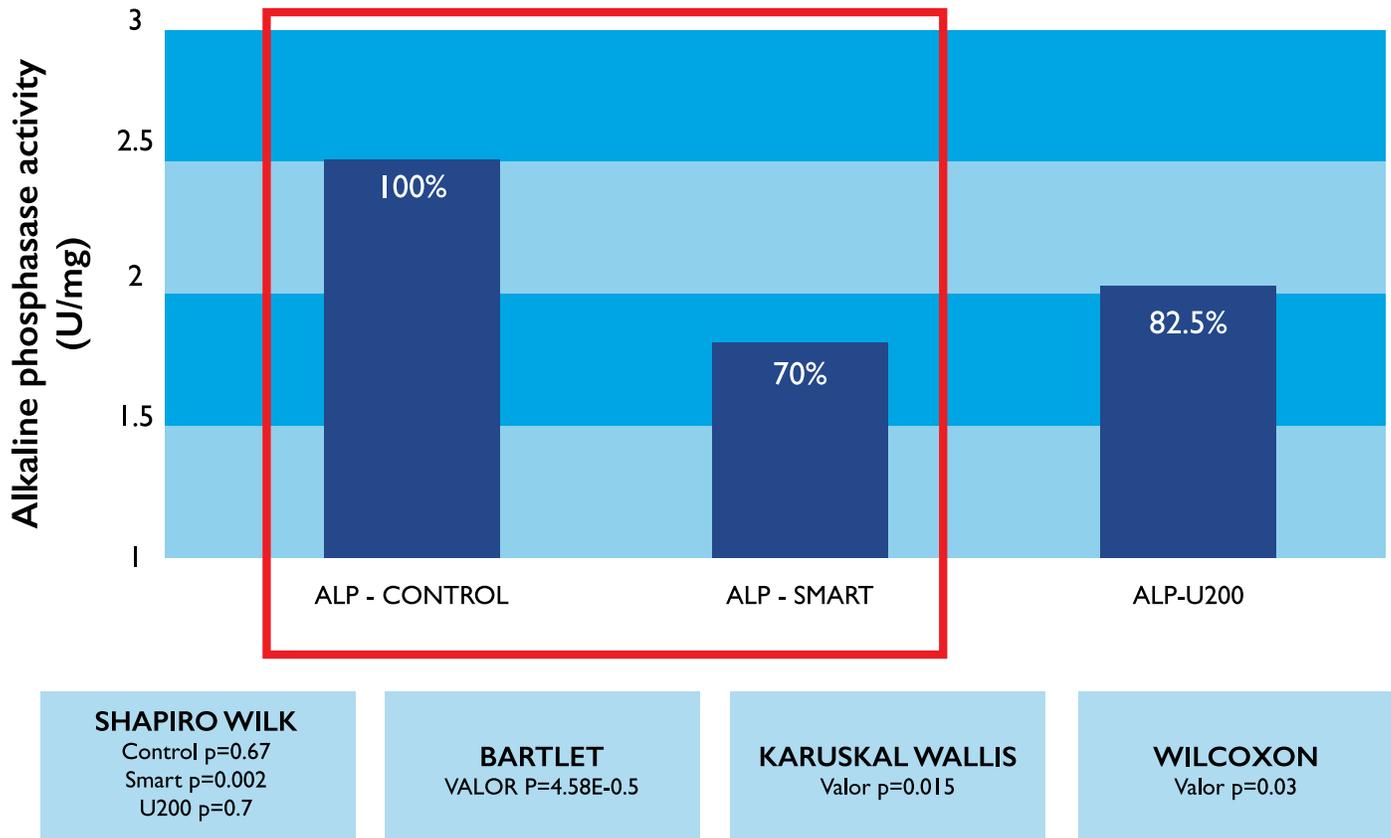
Figura N2.- Porcentaje del metabolismo celular y análisis estadístico



Porcentaje del metabolismo celular después del contacto con las células MDPC-23 con los extractos obtenidos de los materiales experimentales en relación con el grupo control (DMEM 100%)



Figura N2.- Porcentaje de la actividad de la fosfatasa alcalina y análisis estadístico.



Actividad de la fosfatasa alcalina después del contacto con las células MDPC-23 con los extractos obtenidos de los materiales experimentales en relación con el grupo control (DMEM 100%)

utilidad en la práctica diaria para obtener un mayor conocimiento sobre el uso adecuado, la biocompatibilidad o citotoxicidad de los materiales autoacondicionantes que van a estar en íntimo contacto con los tejidos dentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación de tipo experimental in vitro se utilizó el test de elución de extractos según la ISO 10993-5 de 1999¹⁹ y se evaluaron dos cementos autoacondicionantes: SmartCem™2 (Caulk Dentsply, Milford, DE, USA)(G1) y RelyX™U200 (3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA) (G2) (Ver tabla 1), los cuales fueron mezclados con la cánula de mezcla y de forma manual respectivamente, acorde con las recomendaciones del fabricante.

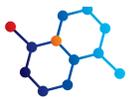
Se conformaron 15 discos de cada cemento de 2mm de grosor por 5mm de diámetro, utilizando una matriz metálica bipartida y fueron fotopolimerizados durante 20 segundos por cada lado, con lámpara de fotocurado halógena (VCL500; Demetron Kerr Optilux – Danbury, CT, EUA). Inmediatamente después de la elaboración de los discos de cemento, éstos se ubicaron en el fondo de una placa de 24 pozos (Costar Corp.) que contenía 1ml de DMEM libre de

suero. Las muestras sumergidas en DMEM fueron incubadas durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Las células inmortalizadas similares a odontoblastos MDPC-23 fueron retiradas del reservorio criogénico (Bio Cane II, Barnstead / ThermoLyne – Dubuque, IA, EUA), donde permanecían conservadas y ubicándolas en una botella esterilizada para cultivo celular de 25cm² de base se realizaron pasajes celulares (3 x 10⁴ cel/cm²) durante 3 días hasta conseguir las células suficientes para desarrollar la investigación. Se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma – Aldrich Missouri, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Para evaluar los efectos citotóxicos de estos materiales, se procedió a hacer el subcultivo, sembrando 3 x 10⁴ cel/cm² (MDPC-23) más 1ml de DMEM en una placa de 24 pozos, y se llevó a la incubadora con 5% de CO₂, 95% de aire a 37°C durante 24 horas. Después, el medio de cultivo fue reemplazado con 0.5ml del DMEM + los componentes liberados de los discos de cada cemento. Adicionalmente se utilizó DMEM fresco como grupo control (G3).

Las células MDPC-23 en contacto con los extractos fueron incuba-



das durante 24 horas adicionales. Se evaluó el metabolismo celular mediante la actividad de la deshidrogenasa succínica, la cual es una enzima de la respiración mitocondrial de las células y, además, se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina mediante el test de ALP. Los datos obtenidos de la prueba de metil tetrazolio (MTT) se analizaron mediante el estadístico ANOVA 1 vía y Tukey y para el test de ALP se analizaron con el estadístico Kruskal Wallis y Wilcoxon. Los grupos se compararon para determinar si los efectos citotóxicos de los cementos dentales en las condiciones experimentales eran estadísticamente diferentes con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Metabolismo celular (Test de MTT)

En la figura 1 se muestran los resultados del metabolismo celular. Considerando que el grupo control (G3) tiene el 100% del metabolismo celular, la actividad metabólica de las células similares a odontoblastos MDPC-23 disminuyó en un 40.8% para el SmartCem™2 (G1) y en un 1.1% para el RelyX™U200 (G2). El análisis estadístico de los datos de la prueba MTT mostró diferencia significativa en el metabolismo celular cuando se comparó el G1 con el G2, así mismo al comparar el G1 con el G3 ($p < 0.05$), pero no se encontró diferencia al comparar el G2 con el G3, mostrando que el cemento SmartCem™2 tuvo los efectos citotóxicos más severos sobre las células MDPC-23.

Actividad de la fosfatasa alcalina (Test de ALP)

Los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina se muestran en la figura 2. Considerando que las células similares a odontoblastos MDPC-23 del grupo de control (G3) presentan el 100% de la actividad de la fosfatasa alcalina, ésta disminuyó en un 30% para el SmartCem™2 (G1) y en un 17.5% para el RelyX™U200 (G2). El análisis estadístico de los datos de la prueba ALP mostró que al comparar el G1 con el G3, disminuyó significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina ($p < 0.05$), pero no hubo diferencia significativa al comparar el G1 con el G2, así mismo al comparar el G2 con el G3 ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

La configuración experimental de este estudio donde la línea de células inmortalizadas similares a odontoblastos MDPC-23, fue expuesta a los extractos obtenidos de los especímenes en forma de discos, preparados con cada uno de los cementos, muestra que SmartCem™2 y RelyX™U200, fueron capaces de liberar componentes que dieron como resultado una disminución del metabolismo celular en un 40.8% y 1.1% y de la actividad de la fosfatasa alcalina de 30% y 17.5% respectivamente; por lo cual, se puede presumir que ésta respuesta biológica se debe a la presencia de UDMA, Bis-GMA, canforoquinonas y TEGDMA dentro de la composición de los cementos.²⁻⁸

Se puede analizar que SmartCem™2 presentó mayor citotoxicidad, posiblemente por la presencia de UDMA, Bis-GMA y canforoquinonas dentro de sus componentes, al igual que la interacción de los

mismos.^{6,10,11} Algunos estudios²⁰⁻²² reportan que la interacción de diferentes componentes pueden causar mayor o menor toxicidad, que la presencia individual de éstos. Sin embargo, no es posible extrapolar estos resultados a la clínica, ya que es difícil determinar la cantidad de liberación de las sustancias y qué tanto pueden actuar en las células pulpares después de la difusión a través de la dentina, teniendo en cuenta que la circulación pulpar in vivo puede reducir la concentración de los agentes citotóxicos.¹¹

El cemento autoacondicionante RelyX™U200 tiene como componentes: monómeros de metacrilato, grupos de ácido fosfórico y dimetacrilatos, por lo cual se esperaría una citotoxicidad alta para las células; sin embargo, contrario a lo esperado, se demostró que los extractos obtenidos del RelyX™U200 causaron los efectos más bajos de toxicidad, lo cual es consistente con lo reportado por De Mendonça y colaboradores,¹⁶ quienes al evaluar los efectos citotóxicos de diferentes cementos aplicados sobre células similares a odontoblastos MDPC-23, demostraron que el RelyX™Unicem, el cual presenta una composición similar al RelyX™U200, presentaba la más baja citotoxicidad.

Consecuentemente a esto, se presume que los porcentajes de vidrio tratados con silano (5% por peso), polvo de vidrio silanizado (55-65% por peso) y la presencia del iniciador inorgánico persulfato de sodio en la composición de RelyX™U200, no dejan que se liberen los componentes en el medio de cultivo en un periodo de 24 horas, acorde con Shajii y colaboradores,²³ quienes demostraron que el aumento de los refuerzos de vidrio en los materiales con base de resina pueden prevenir la degradación inmediata en un ambiente húmedo.

Según diferentes autores,^{10,11,20,21} los monómeros hidrófilos como HEMA y TEGDMA fueron citotóxicos, pero en menor grado que los monómeros más hidrófobos Bis-GMA o UDMA causando inhibición en el metabolismo celular; por lo tanto, estos monómeros de resina son capaces de agotar el glutatión e interferir en la expresión de algunas proteínas como el colágeno I, la osteonectina y la sialoproteína dental. Adicionalmente, la canforoquinona, utilizada como fotoiniciador genera radicales libres que podrían causar efectos mutagénicos.⁶⁻⁸

Por otro lado, algunos autores²⁴⁻²⁷ han evaluado la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual es una enzima que es expresada en las fases tempranas de la mineralización, que estimula al tejido pulpar para formar una matriz dentinal en terapias de recubrimiento pulpar; por lo cual se puede sugerir que en las etapas iniciales de exposición del complejo dentino pulpar a los diferentes materiales dentales, se inicia un proceso inflamatorio, donde la presencia de citoquinas como: el factor de necrosis tumoral y la interleukina I, ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la fosfatasa alcalina debido a una desnaturalización proteica, así como retrasos en la cicatrización de las células y en el proceso de mineralización.^{27,28}

Los resultados obtenidos en la presente investigación no se pueden extrapolar directamente a la situación clínica donde los cementos dentales son aplicados sobre dentina sana y donde el complejo dentino pulpar presenta mecanismos intrínsecos de defensa; sin embargo, sí nos proporcionan una proyección para evaluar los diferentes



sistemas poliméricos para cementación, ya que cada producto tiene diferente composición y comportamiento ante una situación in vivo.

En consecuencia, se sugiere realizar estudios in vitro donde se utilicen barreras dentinales que permitan un mejor acercamiento a la situación clínica y realizar estudios in vivo para evaluar la permeabilidad y difusión de los cementos autoacondicionantes en diferentes sustratos dentinales.

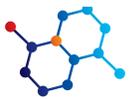
CONCLUSIÓN

Basados en las condiciones experimentales de la presente investigación, se concluye que los efectos citotóxicos más intensos fueron causados por el cemento autoacondicionante SmartCem™2. Por otro lado, el RelyX™U200 causó menos efectos citotóxicos a las células similares a odontoblastos MDPC-23.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo se basa en una tesis presentada a la Universidad Militar Nueva Granada y a la Fundación Centro de Investigación y Estudios Odontológicos CIEO, en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el título de Especialista en Rehabilitación Oral.

Especial agradecimiento al Departamento de Fisiología y Patología de la Escuela de Odontología de Araraquara, Universidad Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil, donde se realizaron las pruebas in vitro.



Referencias

1. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investing* 2008; 12: 1-8.
2. Gerzina T, Hume W. The effect of dentin on the release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 463-468.
3. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P. Cytotoxicity effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 1998; 14: 429-440.
4. Gerzina T, Hume W. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996; 24: 125-128.
5. Geurtsen W, Lehman F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 474-480.
6. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 1996; 28: 181-194.
7. Geursten W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Variability of cytotoxicity and leaching of substances from five dentin adhesives. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 772-777.
8. Atsumi T, Murata J, Kamiyanagi I, Fujisawa S, Ueha T. Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular duct cell line in vitro. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 73-81.
9. Wataha J. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater* 2012; 28: 23-40.
10. Costa C, Vaerten M, Edwards C, Hanks C. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999; 15: 434-441.
11. Huang F, Chang Y. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J* 2002; 35: 905-909.
12. Costa C, Teixeira H, Lopez A, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res Part B* 2007; 81B: 175-184.
13. Costa C, Hebling J, Randall R. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restoration. *Dent Mater* 2006; 22: 954-962.
14. Nayyar S, Tewari S, Arora B. Comparison of human pulp response to total-etch and self-etch bonding agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104: 45-52.
15. Poskus L, Sampaio R, Russoni I, Antunes J, Granjeiro J. Cytotoxicity of current adhesive systems: in vitro testing on cell culture of L929 and Balb/c 3T fibroblast. *Rev odonto cienc* 2009; 24: 129-134.
16. De Mendonça A, Souza P, Hebling J, De Souza-Costa C. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2007; 104: 102-108.
17. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör J, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil* 2008; 35: 940-946.
18. Schmid-Schwab M, Franz A, König F, Bristela M, Lucas T, Piehlinger E, Watts D, Schedle A. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater* 2009; 25: 369-368.
19. International Standard Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5, 2nd ed. 1999.
20. Ratanasthien S, Watnha J, Hanks C, Dennison J. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995; 74: 1602-1606.
21. Issa Y, Watts D, Brunton O, Walters C, Duxbury A. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro. *Dent Mater* 2004; 20: 12-20.
22. Dammaschke T, Stratmann U, Fischer R, Sagheri D. A histologic investigation of direct pulp capping in rodents with dentine adhesives and calcium hydroxide. *Quintessence Int* 2010; 42: e62-e71.
23. Shajii L, Santerre A. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomater* 1999; 20: 1897-2008.
24. Tsukamoto Y, Fukutani S, Takeuchi S, Tanaka Y, Mori M. Cultivation of fibroblast-like cells derived from human dental pulp demonstrated 1,25(OH)2D3 sensitive alkaline phosphatase. *Shika Kiso Igakkai Zasshi* 1988; 30: 851-854.
25. Hao J, Shi S, Niu Z, Xun Z, Yue L, Xiao M. Mineralized nodule formation of human dental papilla cells in culture. *Eur J Oral Sci* 1997; 105(4): 318-324.
26. Inoue T, Chen S, Usuda J, Morohoshi Y, Shimono M. Osteogenic activity of cells from dental pulp, periodontal ligament, bone marrow and muscle in vitro, an ultrastructural study and alkaline-phosphatase activity. *Bull Tokyo Dent Coll* 1992; 33(1): 7-12.
27. Shibba H, Nakamura S, Shiriaka M, Nakanish K. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin and ALP, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 1995; 170: 457-466.
28. Lacey D, Simmons P, Graves S, Hamilton J. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(6): 735-742.

Recibido 20 de Junio 2015
Aceptado 1 de Agosto 2015