

EFFECTO CITOTÓXICO DE UN CEMENTO AUTOACONDICIONANTE SOBRE UNA LÍNEA DE CÉLULAS SIMILARES A ODONTOBLASTOS MDPC-23 Y SOBRE TEJIDO PULPAR. PULP RESPONSE AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF A SELF-ETCH RESIN-BASED CEMENT.

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

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

Correspondencia: maclasaa@yahoo.com

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto citotóxico del cemento autoacondicionante SmartCem™2 (Caulk Dentsply, Milford, DE, USA) sobre una línea de células inmortalizadas MDPC-23 y tejido pulpar mediante el test de elución de extractos con barrera y cortes histológicos.

Método: In-vitro: 36 discos de dentina se colocaron en cámaras pulpares artificiales (CPA). Se formaron tres grupos de acuerdo al tratamiento realizado: grupo control-1: sin tratamiento, grupo-2: Life® (Kerr Corp. Orange, CA, USA) y grupo-3: SmartCem™2. Los extractos fueron aplicados a la línea de celular 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 y ALP con ANOVA 1 vía. In-vivo: En 24 premolares de pacientes entre 12 y 25 años que requerían exodoncias con fines ortodónticos, se prepararon cavidades profundas clase V. Se tomaron impresiones, se elaboraron las incrustaciones y se cementaron con SmartCem™2. Se seleccionaron dos grupos experimentales con base al tiempo de extracción de los premolares: grupo-1: después de 7 días y grupo-2: después de 30 días. A los grupos control 3 y 4 antes del procedimiento se les aplicó el protector pulpar Life® y se extrajeron los dientes después de 7 y 30 días. Los dientes extraídos fueron procesados para valoración histológica. **Resultados:** In-vitro: La comparación de MTT entre grupo-2 y grupo control mostró diferencia significativa ($p=0.001$ Tukey); ALP no fue significativa. La comparación entre grupo-3 y control para MTT y ALP no fue significativa. La comparación de MTT entre los dos grupos experimentales fue significativa en el grupo-2 ($p=0.002$ Tukey); ALP no fue significativa. In-vivo: A los 7 días, cuatro muestras del grupo-1: exhibieron inflamación pulpar moderada y leve desorganización tisular. En el grupo-3: dos muestras presentaron leve inflamación y alteración de la capa odontoblástica. A los 30 días, cuatro muestras del grupo-2 exhibieron leve inflamación. Solo una muestra presentó respuesta inflamatoria moderada y desorganización del tejido.

Conclusiones: A pesar de la baja citotoxicidad transdental del cemento autoacondicionante SmartCem™2, éste puede causar inflamación crónica persistente y desorganización del tejido pulpar superficial cuando es aplicado en cavidades profundas.

PALABRAS CLAVES: Cemento autoacondicionante, Citotoxicidad, Tejido pulpar, Cultivo celular, Barrera de dentina.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the biocompatibility of a self-etch luting cement applied in human teeth and its transdental cytotoxicity on odontoblast-like cells.

Methods: In vitro: Thirty-six dentin discs placed in artificial pulp chambers had their occlusal surfaces treated as follows: G1- control (no treatment); G2- Life; and G3- SmartCem™2. After 24 hours, the extracts (culture medium + components of cements that diffused across dentin) were collected and applied for 24h on MDPC-23 cells. Data from cell metabolism (MTT assay) and alkaline phosphatase activity (ALP) were statistically analyzed. In vivo: Deep class V cavities were prepared on the buccal surface of 24 human premolars ($n=6$). Impressions were taken and inlays were prepared and cemented with SmartCem™2 resin-based cement (Caulk Dentsply). In G1 and G2, the teeth were extracted at 7 and 30 days after the clinical procedures, respectively. In G3 and G4 (controls), the cavity floor was lined with Life (Kerr Corp.) before cementation and the teeth extracted at 7- and 30-day periods. Extracted teeth were processed for histological assessment.

Results: In vitro: MTT assay showed that G1 and G3 differed significantly from G2 ($p<0.05$). However no statistical difference was observed between G1 and G3 ($p>0.05$) in which the cells presented normal metabolism. Concerning ALP activity no statistical difference occurred among all groups. In vivo: At 7 days, 4 samples of G1 exhibited moderate pulp inflammation and slight tissue disorganization. In G3, 2 samples presented slight inflammation and odontoblast layer disruption. At 30 days, 4 samples of G2 exhibited slight inflammation. Only 1 sample showed moderate inflammatory response and tissue disorganization.

Conclusions: Despite the very low transdental cytotoxicity of the resin-based luting cement SmartCem™2, this dental material may cause persistent chronic inflammatory reaction and superficial pulp tissue disorganization when applied in deep cavities prepared in human teeth.

KEY WORDS: Resin-based cement, Citotoxicity, Pulp tissue, Cell culture, Dentine barrier.



INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el mercado existen diferentes tipos de agentes cementantes, los cuales tienen como función aumentar el área de contacto entre el diente y la restauración para permitir una buena retención, un sellado marginal, aumentar la resistencia y servir como aislante térmico y químico.¹ Entre ellos se encuentran los cementos autocondicionantes, los cuales sustituyen el grabado ácido, el lavado, posterior secado e imprimación y disminuyen así el riesgo de un colapso de la malla colágena desmineralizada, evitando la reducción del espacio interfibrilar y la difusión de los monómeros si se seca excesivamente la dentina.²

La función primordial de los cementos autocondicionantes es unir la estructura dentaria al material restaurador mediante un proceso adhesivo, por lo tanto las técnicas operativas y materiales utilizados para reparar y restaurar la estructura del diente, plantean un desafío adicional para la supervivencia de las células dentro de la pulpa dental.³ Es claro que el tejido dentinal en su composición histológica contiene túbulos dentinarios a través de los cuales la pulpa y los tejidos mineralizados se comunican formando un complejo dentino pulpar. La dentina morfológicamente presenta túbulos dentinales con sus prolongaciones odontoblásticas en su interior, los cuales ocupan del 20 al 30 % de la dentina intacta, son ligeramente cónicos con su mayor diámetro hacia la pulpa, adoptan una forma de S suave desde la unión dentino esmáltica hasta la pulpa y son la ruta por donde irritantes como bacterias y sustancias químicas alcanzan al tejido pulpar produciendo daño.⁵

Cabe recalcar que la permeabilidad de la dentina está directamente relacionada con la dimensión y cantidad numérica de los túbulos, esto hace que aumente o disminuya la velocidad de transporte con que un agente dañino pueda realizar su efecto de acuerdo a la teoría de Branstrom. Estos al encontrarse expuestos permiten que el líquido intratubular se mueva libremente a través de la dentina produciendo la suficiente fuerza para afectar los odontoblastos y sus terminaciones nerviosas, por lo tanto la intensidad de la respuesta del complejo dentino pulpar también depende del espesor de la dentina remanente.⁷

Los intentos de predecir el estado patológico del tejido pulpar cuando se utilizan materiales adhesivos y cementantes han sido inespecíficos. El uso de los sistemas adhesivos se considera una técnica confiable, aunque la reacción pulpar contra estos sistemas aplicados a la dentina sigue siendo controversial dependiendo principalmente de la profundidad de la preparación.¹⁰ 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.

La respuesta biológica de los materiales dentales puede ser medida de diferentes maneras, siendo las pruebas *in vitro* las más importantes. Actualmente se cuenta con cámaras pulpares *in vitro*, donde se utilizan discos de dentina, que permiten probar la capacidad de los materiales para difundirse a través de los túbulos dentinales, pudiendo llegar a causar efectos citotóxicos sobre cultivos celulares que se colocan en los compartimentos interiores de la misma.¹³ La cámara pulpar artificial (CPA) cuenta con un compartimento

superior y otro inferior, el cual tiene unas perforaciones circulares que permiten la libre difusión al medio de cultivo. Los discos de dentina se posicionan entre dos anillos de silicona de 4.47mm de diámetro interno y 1.78mm de grosor (Rodimar Rolamentos Ltda. Araraquara, SPO, Brasil), los cuales proveen un sellado lateral entre los compartimentos superior e inferior. Este modelo experimental considerado un estudio de investigación moderno, es lo que más se asemeja y se puede extrapolar a una condición *in vivo*.¹⁴

Es importante escoger una línea celular apropiada para desarrollar los estudios de citotoxicidad, ya que estas células deben adherirse homogéneamente a los discos de dentina, imitando la capa odontoblástica;²⁰ cabe aclarar que los odontoblastos son células específicas de la pulpa que están organizados en una monocapa bajo la dentina, siendo las primeras células en ser dañadas por los componentes citotóxicos que provienen de los materiales dentales que son difundidos a través del esmalte y los túbulos dentinales.

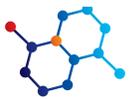
Otra manera de evaluar la biocompatibilidad de un material es mediante pruebas *in vivo*, que se pueden realizar sobre tejido pulpar; aquí los materiales odontológicos ejercerán su acción terapéutica en condiciones similares a las del futuro uso clínico.¹⁵ En este tipo de procedimientos se evalúa la respuesta pulpar en cortes histológicos de un diente que estuvo presente en boca durante un tiempo determinado, y que fue sometido a su ambiente natural (humedad, temperatura, fuerzas de masticación, entre otras).

En la odontología restauradora, la citotoxicidad es uno de los principales problemas que se presentan, debido al contacto íntimo del material con el complejo dentino pulpar, por lo tanto es de vital importancia conocer la biocompatibilidad de ellos para evitar efectos nocivos a nivel local y sistémico. El riesgo de toxicidad pulpar depende de la capacidad de los componentes de cada material de difundirse a través de la dentina y alcanzar la pulpa, por tal motivo, diversos autores,^{16,21} han realizado investigaciones *in vitro* e *in vivo* para determinar y evaluar los efectos que éstos tienen sobre el complejo dentino pulpar.

Estudios *in vivo* han evaluado la biocompatibilidad y respuesta pulpar de varios cementos resinosos aplicados en cavidades profundas, concluyendo que las técnicas de cementación utilizando diferentes cementos pueden causar daños específicos en pulpa con respuestas inflamatorias leves no significativas.

Estudios *in vitro* utilizando cultivos celulares similares a odontoblastos han ganado importancia debido a que los odontoblastos se organizan en una monocapa y son las primeras células que interactúan con cualquier sustancia capaz de difundirse a través de la dentina y llegar a la pulpa, por lo tanto para desarrollar estos estudios y evaluar la citotoxicidad *in vitro* utilizan cámaras pulpares con barreras de dentina, demostrando ser útiles para probar la capacidad de los materiales de difundirse a través de los túbulos dentinales pudiendo ocasionar efectos citotóxicos.

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico de un cemento autocondicionante sobre una línea de células inmortalizadas MDPC-23 y sobre tejido pulpar mediante el test de elución de extractos con barrera y cortes histológicos.



MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio *in vitro* se obtuvieron 36 discos de dentina de terceros molares sanos, extraídos y recolectados de diferentes clínicas, los cuales fueron donados por los cirujanos maxilofaciales. Inmediatamente después de la extracción de cada molar se eliminaron los restos orgánicos y se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 2.5% a temperatura ambiente. Se posicionó y fijó cada diente en el equipo Isomet 1000 (Buehler Ltda., Illinois, EUA) con un disco diamantado (11-4254, 4" x 0,012" / serie 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler, Ltda, Illinois, EUA). Se realizaron cortes secuenciales obteniéndose de un molar 3 discos, eligiendo así los que solo presentaron dentina. Se midió el espesor de cada disco con un calibrador digital (model 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., SP, Brasil), y se pulió cada lado con lija húmeda de grano 400 y 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), hasta obtener un disco de 0.4 mm de espesor.

Se aplicó solución ácida etileno diamino tetracético (EDTA) de 0.5N sobre cada superficie del disco por 60 segundos y se ubicó en la cámara pulpar artificial acrílica (CPAA desarrollada por Thomas Hanks y David Pashley) para evaluar la permeabilidad dentinal (desarrollado por UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil). La medición de permeabilidad de la dentina se realizó con un sistema de agua a alta presión, se introdujo una burbuja de aire en la cánula y se midió la distancia que ésta recorre en un tiempo determinado por segundos. Una vez evaluada la permeabilidad, se escogieron 36 de los discos que tenían una permeabilidad similar. Se ubicó cada disco en una CPA (UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil). La cámara pulpar artificial (CPA) cuenta con un compartimento superior y otro inferior, el cual tiene unas perforaciones circulares que permiten la libre difusión al medio de cultivo y el contacto con las células. Cada disco de dentina se posicionó entre dos anillos de silicona de 4.47mm de diámetro interno y 1.78mm de grosor (Rodimar Rolamentos Ltda. Araraquara, SPO, Brasil), empacaron en bolsas de esterilizar, se marcaron y fueron esterilizados con óxido de etileno.

Las células inmortalizadas similares a odontoblastos MDPC-23 fueron retiradas del reservorio criogénico (Bio Cane II, Barnstead / ThermoLyne – Dubuque, IA, EUA), donde permanecían congeladas, ubicándolas en una botella esterilizada para cultivo celular de 25cm² de base, se adicionó el medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma – Aldrich Missouri, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se realizaron pasajes celulares (3 x 10⁴ cell/cm²) durante 3 días hasta conseguir las células suficientes para desarrollar el estudio. Con los discos de dentina esterilizados se colocaron en la CPA y se ubicaron boca abajo dentro de una placa de 24 pozos, se adicionó 2ml del DMEM en cada pozo. Se formaron tres grupos de acuerdo al tratamiento realizado: grupo control-1: sin tratamiento, grupo-2: Life® (Kerr Corp. Orange, CA, USA) y grupo-3: SmartCem™2. Los extractos fueron aplicados a la línea de celular 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 y ALP con ANOVA 1 vía.

Para el estudio *in vivo* se seleccionaron 24 premolares sanos de pacientes entre 12 y 25 años que requerían exodoncias con fines ortodónticos. Se tomaron radiografías periapicales iniciales descartando posibles caries interproximales o signos de patología periapical.

Se prepararon cavidades profundas clase V tomando impresiones parciales para cada preparación, para el vaciado de la impresión se utilizó yeso de fraguado rápido Mounting Stone (Whip Mix Corporation); se elaboraron las incrustaciones en polividrio Gradia® (GC American Inc.) y se cementaron con SmartCem™2 (Dentsply Caulk). Se seleccionaron dos grupos experimentales con base al tiempo de extracción de los premolares: grupo-1: después de 7 días y grupo-2: después de 30 días. A los grupos control 3 y 4 antes del procedimiento se les aplicó el protector pulpar Life® y se extrajeron los dientes después de 7 y 30 días. Los dientes extraídos fueron procesados para valoración histológica. (Tabla 1).

GRUPOS		Nº ESPECÍMENES	PERIODOS	PROCEDIMIENTO
1	EXPERIMENTAL	6	7 DÍAS	Cemento autocondicionante SmartCem™2.
2	EXPERIMENTAL	6	30 DÍAS	Cemento autocondicionante SmartCem™2.
3	CONTROL	6	7 DÍAS	Life® + Cemento autocondicionante SmartCem™2.
4	CONTROL	6	30 DÍAS	Life® + Cemento autocondicionante SmartCem™2.

Tabla 1: Diagrama de distribución de grupos



Todas las secciones fueron evaluadas aleatoriamente observando características histológicas de acuerdo a criterios definidos según la tabla 2. La respuesta pulpar fue evaluada bajo el microscopio de luz (Carl Zeiss 62774, Oberkochen, West Germany).

También se evaluó el espesor de dentina remanente (RDT), el cual es determinado por la distancia entre el piso de la cavidad y la cámara pulpar; éste fue medido para cada diente usando un microscopio de luz (Carl Zeiss) conectado a una video cámara (Samsung Digital Camera – SSC/131, Samsung Electronics Co. Ltd., Korea). (Fig. 1).

Para comparar los valores de espesor remanente de dentina entre el grupo control y el experimental de acuerdo al tiempo de extracción se aplicó la prueba de Shapiro Wilk que determinó que las variables presentaban distribución normal, la prueba F para comparar las varianzas entre grupos diferentes y la prueba T para varianzas iguales para comparar los promedios de dos variables con la misma varianza. Para comparar los valores de espesor remanente de dentina intragrupos se aplicó la prueba de Shapiro Wilk que determinó que las variables presentaban distribución normal y la prueba T pareada para comparar los promedios de la misma variable en dos tiempos.

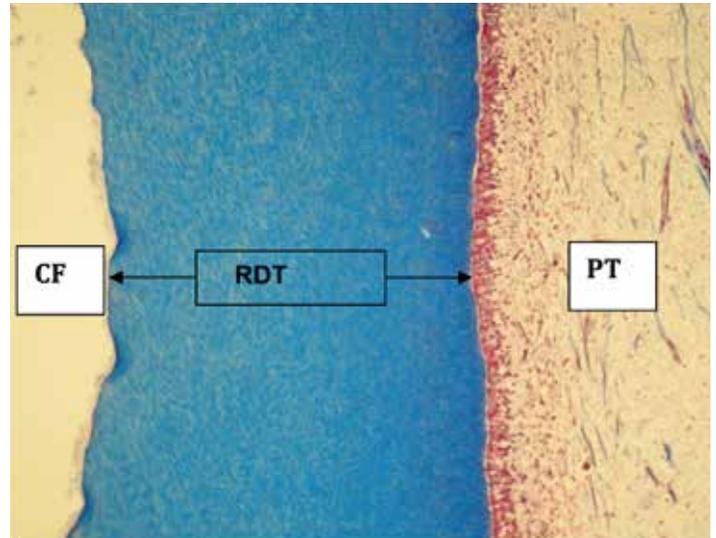


Figura 1- Se observa un corte histológico de una preparación clase V para evaluar la proximidad a la cámara pulpar (RDT = espesor remanente de dentina, CF = piso de la cavidad y PT = tejido pulpar).

EVENTOS HISTOPATOLÓGICOS Y PUNTAJE				
EVENTO HISTOPATOLOGICO	PUNTAJE			
	0	1	2	3
Respuesta Inflamatoria	Ninguna o pocas células inflamatorias se presentaron en el área pulpar que corresponde a la pared axial, característica de un tejido normal.	Poca infiltración de células inflamatorias con polimorfo nucleares (PMN) o leucocitos mono nucleares (MNL).	Moderada infiltración de células inflamatorias que involucran la pulpa coronal.	Severa infiltración de células inflamatorias que involucran la pulpa coronal o un absceso característico
Organización tisular	Tejido normal	Desorganización de la capa odontoblástica pero la pulpa central es normal	Desorganización total de la morfología del tejido pulpar.	Necrosis pulpar
Formación de dentina reaccionaria	Ausencia	Poco tejido duro depositado bajo la pared axial	Moderado tejido duro depositado bajo la pared axial	Bastante tejido duro depositado bajo la pared axial
Presencia de bacterias	Ausencia	Presencia de bacterias a lo largo de las paredes laterales de la cavidad.	Presencia de bacterias a lo largo de las paredes laterales y axial de la cavidad.	Presencia de bacterias a lo largo de las paredes de la cavidad y dentro de los túbulos dentinales.

Tabla 2: Evento histopatológico y puntaje.



RESULTADOS

Para el estudio *in vitro* en la prueba del metabolismo celular (MTT) los resultados mostraron que el extracto de Life® presentó una citotoxicidad del 23.4% y el SmartCem™2 del 6.4% para las células similares a odontoblastos MDPC-23. Al comparar Life® con el grupo control y SmartCem™2, se encontró que éste fue significativamente más citotóxico ($p < 0.05$). Al comparar el grupo control con SmartCem™2 no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). Para la prueba de ALP, el extracto de SmartCem™2 disminuyó el 26% de la actividad de la fosfatasa alcalina y el Life® el 28.7%. Al comparar los grupos no se presentó diferencia significativa ($p > 0.05$), sin em-

bargo se observó una ligera disminución para los dos grupos experimentales. Al realizar la microscopía electrónica de barrido (MEB) en el grupo control se observó células MDPC-23 adheridas al sustrato de vidrio. Estas células mostraron citoplasmas amplios, que cubren toda la superficie del sustrato, morfología normal y exhibieron varios procesos citoplasmáticos que se originan de su membrana. (Fig. 2A y B). En el grupo de Life®, se observó células con alteraciones morfológicas; se redondearon y perdieron las prolongaciones citoplasmáticas. Además se observaron zonas amplias libres de células. (Fig. 3A y B). En el grupo Smartcem™2 se observó baja disminución del número de células. Sin embargo, no se observó alteración de la morfología celular. (Fig. 4A y B)

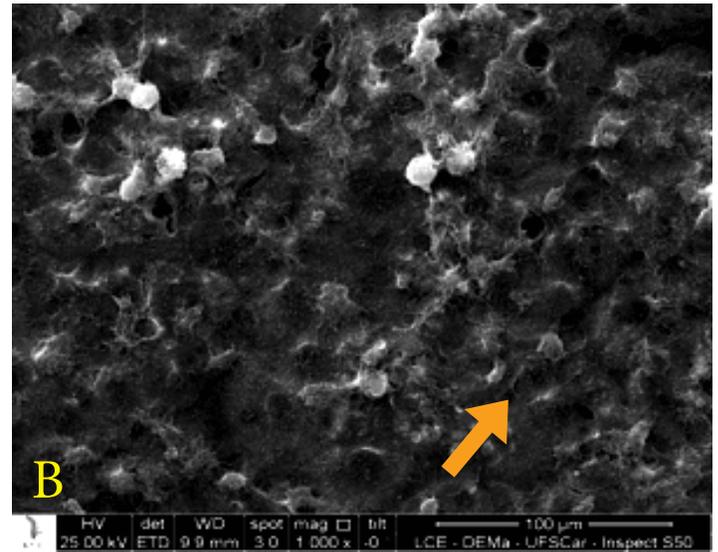
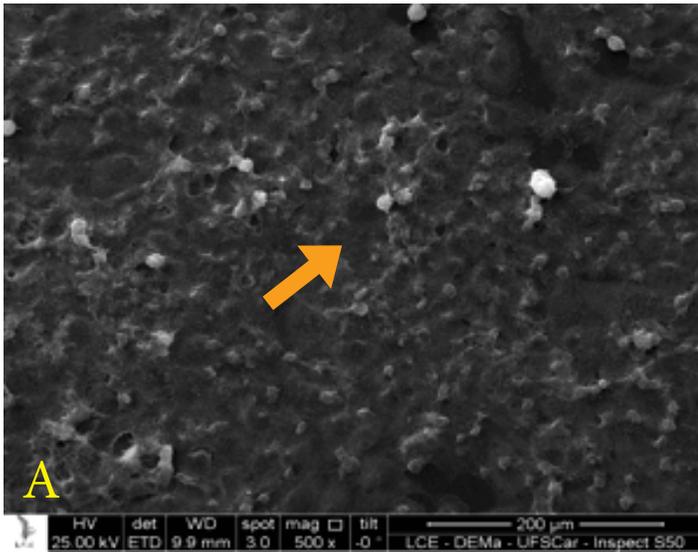


Figura 2- Análisis de la morfología celular. (A) grupo control, magnificación 500x. (B) magnificación 1000x. Las flechas muestran células en proceso de mitosis, por lo cual presentan forma redondeadas.

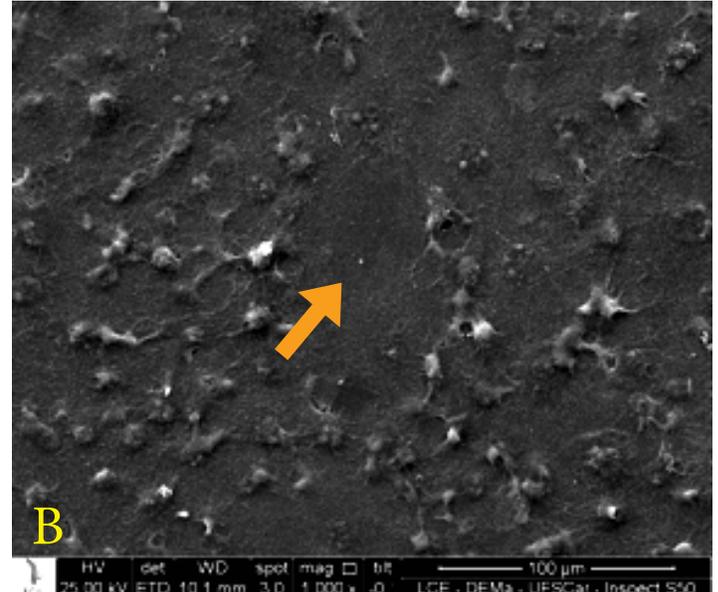
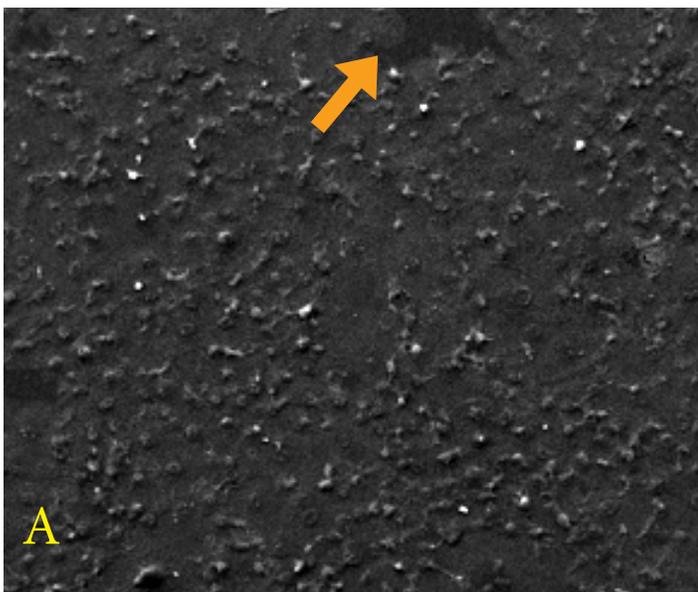


Figura 3- Análisis de la morfología celular. (A) grupo Life®, magnificación 500x. (B) magnificación 1000x. Se observaron zonas amplias libres de células.

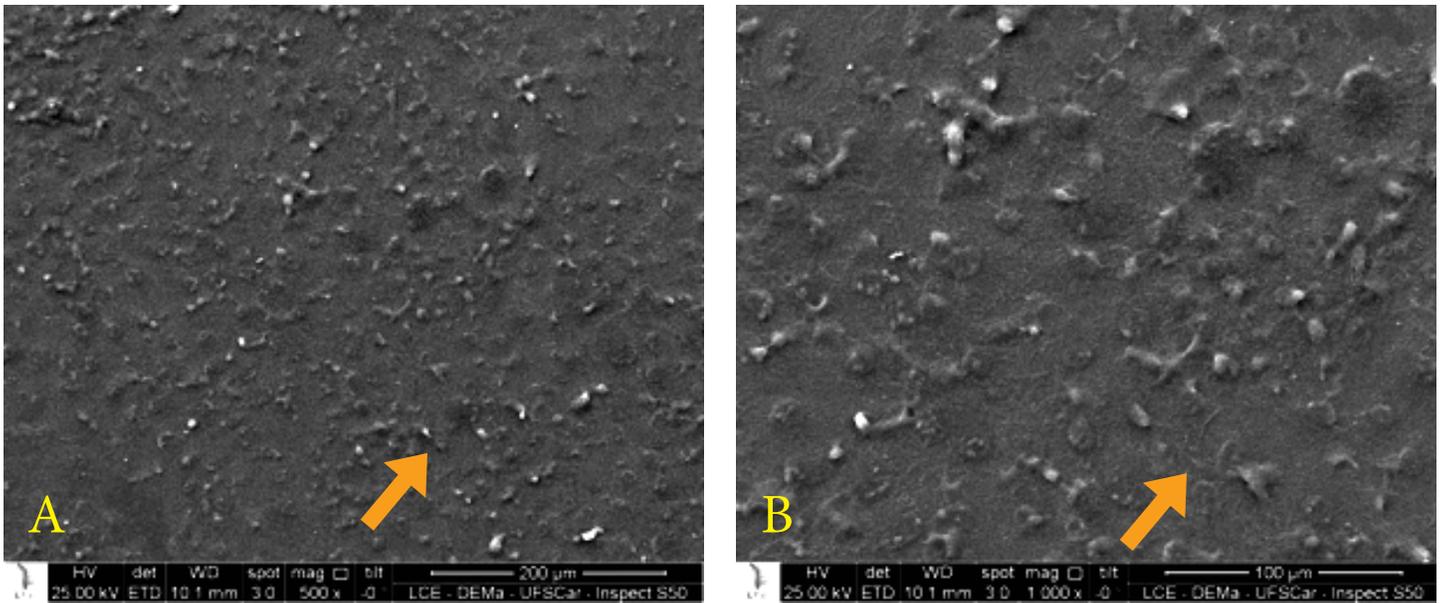


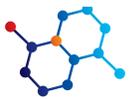
Figura 4- Análisis de la morfología celular. (A) grupo Smartcem™2 magnificación 500x. (B) magnificación 1000x. No se observa alteración de la morfología celular.

Durante el estudio *in vivo*, los pacientes no reportaron síntomas o dolor. La evaluación radiográfica de todos los dientes no reportaron signos de patología periapical antes del procedimiento clínico. Las radiografías tomadas inmediatamente antes de la extracción (7 - 30 días) no mostraron ningún cambio en el área periapical del diente restaurado. Los porcentajes observados para cada criterio de acuerdo a los grupos y a los períodos están en la tabla 3. Los valores del espesor remanente de dentina al igual que el periodo al cual los dientes fueron extraídos se presentan en la tabla 4. Los valores del espesor remanente de dentina al comparar el grupo control con el experimental de acuerdo al tiempo de extracción no mostraron una diferencia significativa, al igual que cuando se compararon los grupos controles y experimentales.

El Grupo I SmartCem™ 2 - 7 días cuatro muestras evidenciaron respuesta inflamatoria moderada asociada con leve desorganización tisular. La capa de odontoblastos relacionada con el piso de la cavidad fue interrumpida y un número de odontoblastos fueron aspirados dentro de los túbulos dentinales. (Fig. 5). En este corto periodo de evaluación (7 días), no se evidenciaron bacterias en todas las secciones coloreadas con Brown & Brenn. La falta de aposición de dentina terciaria fue un hallazgo histológico común para todas las muestras evaluadas. El promedio del RDT para este grupo fue 431 μm.

EVENTO HISTOPATOLOGICO	GRUPOS	PUNTAJE / PERIODOS								TOTAL
		7 DÍAS				30 DÍAS				
		0	1	2	3	0	1	2	3	
RESPUESTA CELULAR INFLAMATORIA	SmartCem™2.	1	4	1	0	1	4	1	0	12
	Life®+SmartCem™2.	4	2	0	0	6	0	0	0	12
ORGANIZACIÓN TIZULAR	SmartCem™2.	1	5	0	0	2	3	1	0	12
	Life®+SmartCem™2.	4	2	0	0	5	1	0	0	12
PRESENCIA DE DENTINA	SmartCem™2.	6	0	0	0	6	0	0	0	12
	Life®+SmartCem™2.	6	0	0	0	5	1	0	0	12
FORMACIÓN DE DENTINA TERCIARIA	SmartCem™2.	6	0	0	0	5	1	0	0	12
	Life®+SmartCem™2.	6	0	0	0	5	1	0	0	12

Tabla 3: Número de dientes por cada puntaje de acuerdo con los grupos y períodos.



GRUPO	ESPECÍMENES	RDT POR PERIODO	
		7 DÍAS	30 DÍAS
SmartCem™2.	1	488 µm	503 µm
	2	451 µm	416 µm
	3	509 µm	419 µm
	4	364 µm	411 µm
	5	411 µm	318 µm
	6	367 µm	349 µm
PROMEDIO		431 µm	402 µm
Life®	1	337 µm	589 µm
	2	412 µm	414 µm
	3	517 µm	513 µm
	4	443 µm	332 µm
	5	529 µm	403 µm
	6	381 µm	505 µm
PROMEDIO		436 µm	459 µm

Tabla 4: Espesor del remanente de dentina.

El grupo 2 SmartCem™2 – 30 días cuatro muestras exhibieron una leve respuesta pulpar inflamatoria. En éstas se redujo el número de odontoblastos subyacentes al tejido dentinario relacionado con el piso de la cavidad. En esta área superficial de la pulpa se observaron vasos sanguíneos pequeños y pocas células inflamatorias mononucleares. No se evidenció bacterias en las paredes de la cavidad de estas 4 muestras. Sin embargo hay una discreta aposición de dentina reaccionaria en el área pulpar relacionada con el piso de la cavidad. (Fig. 6). En este periodo de evaluación (30 días), no se observó microfiltración en ninguna de las muestras. La aposición de dentina terciaria, se caracterizó por una discreta presencia de matriz de dentina reaccionaria tubular en el área relacionada con el piso de la cavidad, presente solo en una muestra. El promedio del RDT en este grupo experimental fue de 402µm.

El grupo 3 Life® + SmartCem™2 – 7, 2 muestras evidenciaron una leve ruptura de la capa de odontoblastos relacionado con el piso de la cavidad, también un número de células inflamatorias mononucleares y pequeños vasos sanguíneos (Fig. 7). Sin embargo, el tejido pulpar mostró características histológicas normales. El promedio de RDT para este grupo fue de 436µm.

En el grupo 4 Life® + SmartCem™2 - 30 ninguna muestra de este grupo experimental evaluado a los 30 días presentó inflamación ni desorganización del tejido. En solo una muestra se evidenció bacterias en las paredes laterales de la cavidad. Sin embargo como en todas las otras muestras de este grupo la capa de odontoblastos relacionada al piso de la cavidad fue continua con el espacio pulpar circundante. Se preservaron las zonas ricas y libres de células. (Fig. 8A and B). El promedio del RDT para estas muestras fue de 459µm.

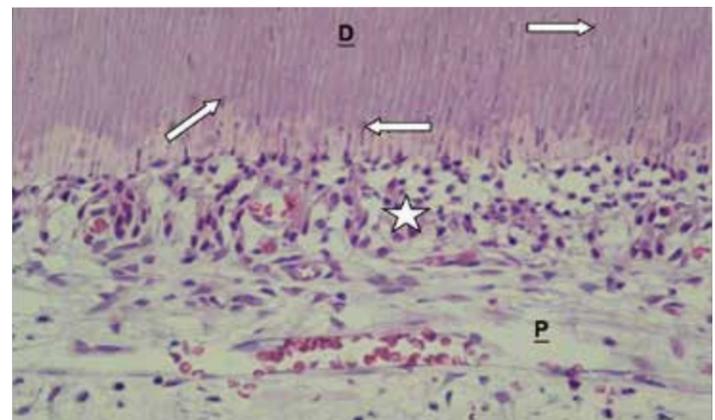


Figura 5- Grupo 1 SmartCem™2 - 7 días: magnificación 400x. Se observó el detalle del área pulpar relacionada con el piso de la cavidad (H/E - RDT = 367 µm) en la cual hay ruptura de la capa de odontoblastos (estrella), aspiración odontoblástica (flechas), y congestión severa de pequeños vasos sanguíneos alrededor de las células inflamatorias mononucleares. (D=dentina – P=pulpa).

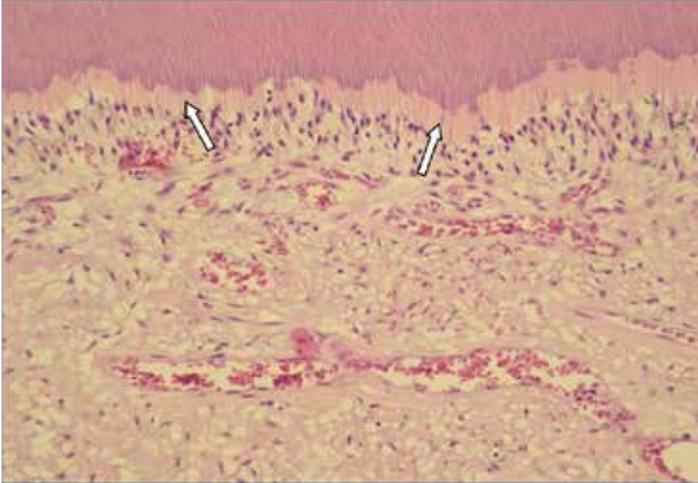
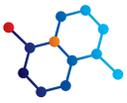


Figura 6- Grupo 2 SmartCem™2 – 30 días: magnificación 250x. Se observó respuesta inflamatoria pulpar leve, la capa de odontoblastos es continua pero el número de células es reducido (flechas RDT = 407 μ m – H/E). Se observaron un número de vasos sanguíneos entre pocas células inflamatorias mononucleares.

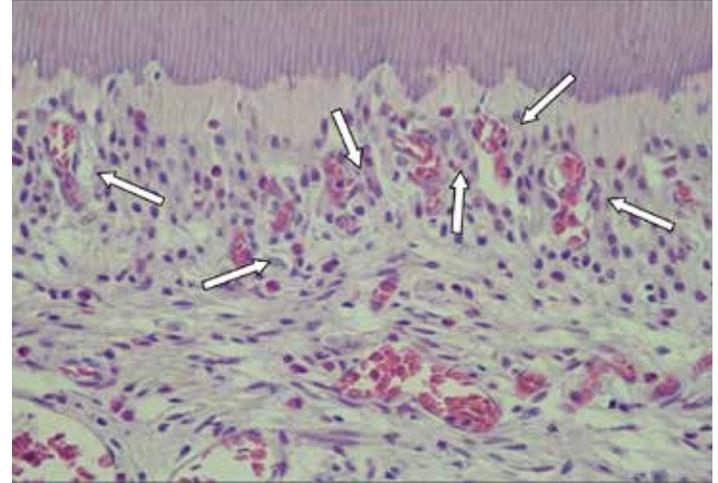


Figura 7- Grupo 3 Life®+SmartCem™2 - 7 días: magnificación 400x. Se observó que el tejido pulpar subyacente al piso de la cavidad mostró leve disrupción de la capa de odontoblastos (flechas - RDT= 381 μ m – H/E). Se observó una discreta desorganización del tejido pulpar adyacente en el cual las células inflamatorias mononucleares están entre vasos sanguíneos dilatados y congestionados (flechas).

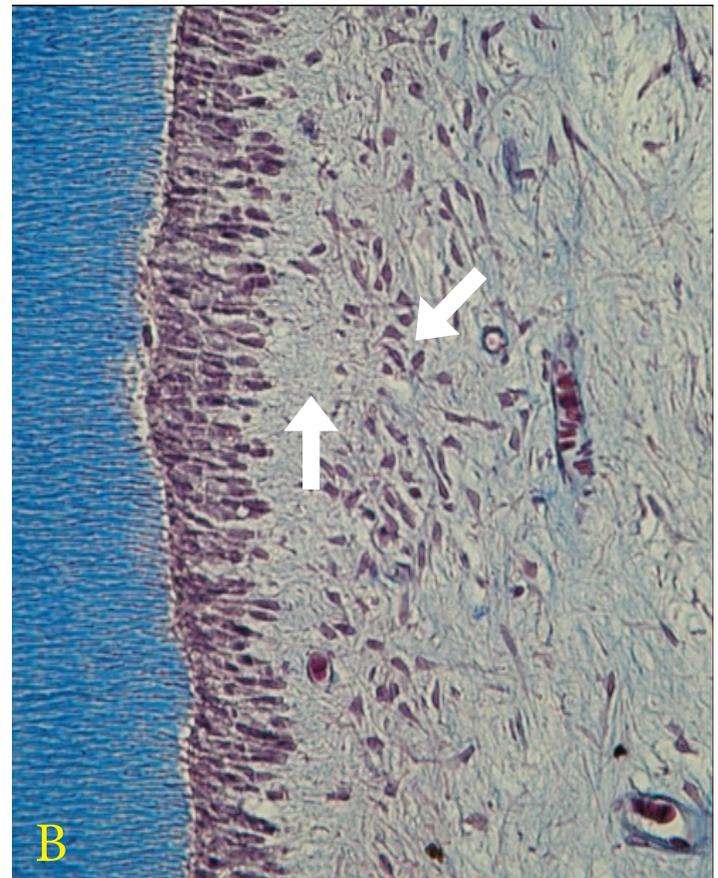
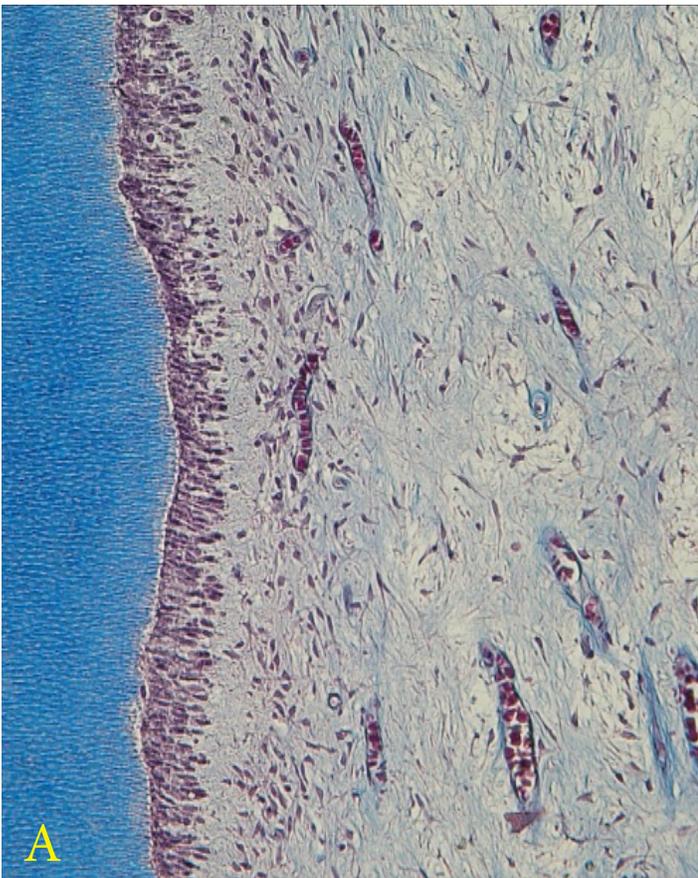
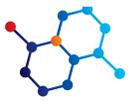


Figura 8 - Grupo 4 Life® +SmartCem™2 - 30 días: (A) magnificación 125x. (B) magnificación 250x. (A) se observó que el tejido pulpar relacionado con el piso de la cavidad, evidenció características histológicas normales. Se observó la capa de odontoblastos homogénea y continua al igual que la zona libre de células (flecha vertical) y la zona rica en células (flecha oblicua). (B) detalle de la (A) se observó que la parte central del tejido pulpar presentó características histológicas normales. (Tinción Tricrómica de Masson).



DISCUSIÓN

Los cementos autocondicionantes y sus componentes tales como monómeros, ácido fosfórico y solventes, usados como medio cementante para restauraciones indirectas, pueden a través del fluido dentinal difundirse durante los procedimientos clínicos y causar daño pulpar en mayor o menor grado, dependiendo de la permeabilidad de la dentina, que a su vez es dependiente de la edad del paciente y a las agresiones a que haya sido sometido el complejo dentino pulpar.¹² Los estudios in vitro han sido recomendados para evaluar la citotoxicidad de los materiales restauradores, usando líneas celulares como modelos experimentales, como la implementación de células diana, que estén disponibles para dichos propósitos.¹³

Al comparar los resultados se observó una menor citotoxicidad del SmartCem™2 (Dentsply Caulk), debido probablemente a que el extracto del cemento autocondicionante se obtuvo utilizando una barrera de dentina, lo que hace que lleguen menos productos citotóxicos y que haya poca lixiviación de los componentes liberados del material dentro del medio, como lo refiere el estudio de Poskus y colaboradores en el 2009.²¹ y Darmian y colaboradores en 2007.²⁴

Posiblemente, los monómeros de resina Bis-GMA y UDMA, presentes en la composición del SmartCem™ 2 tuvieron poca difusión a través de los túbulos dentinales por su mayor peso molecular; la diferencias en la composición química y/o la presencia de fluido intratubular.²⁵ Esto es acorde con el estudio de Ratanasathien y colaboradores,²⁶ donde demostraron que los diferentes tipos de monómeros presentes en los agentes de adhesión a la dentina pueden interactuar y alterar la citotoxicidad in vitro; estas interacciones al igual que el tiempo de exposición pueden hacer que los agentes adhesivos sean más o menos tóxicos.²⁶ La baja citotoxicidad evidenciada para el SmartCem™2, donde se seleccionaron discos de dentina con una permeabilidad similar es acorde con el estudio de Bouilleguet y colaboradores,²⁷ donde se evidenció que a pesar de la baja permeabilidad de los discos, todos los adhesivos estudiados evidenciaron supresión de la actividad de la enzima deshidrogenasa succínica, por la liberación de los componentes.

La alta citotoxicidad presentada por el Life®, posiblemente fue ocasionada por la liberación de los iones hidroxilo y el ácido salicílico, los cuales hacen parte de los componentes de éste, lo cual es acorde con los estudios de Murray,²⁸ y De Mendonça,²⁹ quienes confirman que la reacción química del agente es la responsable de los altos niveles de citotoxicidad. La ligera disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina para el Life® y el SmartCem™ 2, se debe posiblemente a la iniciación de un proceso inflamatorio donde hay activación de los macrófagos, que secretan citoquinas como la interleukina I y el factor de necrosis tumoral retrasando el proceso de reparación y disminuyendo la actividad de la enzima, como es referido en el estudio de Dammaschke y colaboradores en el 2010.³⁰

Estos hallazgos fueron confirmados con lo observado en el MEB, donde el grupo Life® presentó una disminución significativa en el número de células, así como alteración en la morfología celular. Para SmartCem™2 solo se observó una disminución pequeña de la cantidad de células y la morfología celular fue similar a la del grupo control.

Para el estudio in vivo se utilizó el Life® como grupo control positivo por presentar mecanismos de acción y respuestas conocidas sobre los tejidos del complejo dentino pulpar; tales como sus propiedades antibacterianas, su alta alcalinidad, la estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina y la formación de tejido mineralizado, de acuerdo a diferentes estudios.^{18,31,33} En el grupo 1 (SmartCem™2 - 7 días) se observaron 4 muestras con una respuesta inflamatoria moderada asociada con leve desorganización tisular; mientras que en el grupo 3 (Life® + SmartCem™ 2 - 7 días), se observaron 2 muestras con una leve respuesta inflamatoria y desorganización tisular; debido probablemente a que el Life® actuó como una barrera y como refuerzo del espesor de dentina ante el efecto citotóxico del cemento autocondicionante.³⁴ En el grupo 2 (SmartCem™ 2 - 30 días) se observaron 4 muestras con una leve respuesta pulpar inflamatoria mientras en el grupo 4 (Life® + SmartCem™ 2 - 30 días) no se observó respuesta inflamatoria a excepción de 1 muestra donde hubo presencia de bacterias, probablemente debido a la microfiltración marginal durante el periodo de tiempo que duró el diente en cavidad oral. De igual forma, el tiempo transcurrido permitió que todos los mecanismos de defensa fueran activados ante la aplicación de los materiales dentales entre estos dos grupos.³⁴

La respuesta inflamatoria del complejo dentino pulpar ante el cemento autocondicionante pasó de ser moderada a leve en el periodo estudiado (7 - 30 días), lo cual sugiere que este material puede causar una inflamación crónica persistente, ya que se supone que en este periodo de tiempo debería haber una resolución de dicha inflamación, esto se debe posiblemente a que se mantiene el estímulo irritante,³⁴ y que inicialmente los componentes liberados son abundantes y gradualmente van disminuyendo a medida que pasa el tiempo.²⁷

La distancia entre el fondo de la cavidad y la pulpa es referido como el espesor de remanente de dentina (RDT) y se le ha atribuido como factor importante que influencia la respuesta de la pulpa ante procedimientos restaurativos. El valor promedio de RDT encontrado en este estudio in vivo fue de 432µm lo que explicaría la respuesta inflamatoria, acorde a lo reportado por Koliniotou-Koumpia en 2007 y colaboradores,³⁸ quien refiere que un espesor menor o igual a 500 µm produce un efecto adverso sobre el tejido pulpar.

También se encontró, que no existió aposición de dentina para 5 muestras, lo cual sugiere que hay una relación inversa entre el RDT y la aposición de dentina terciaria. La presencia de dentina terciaria es una indicación de que ha habido un grado de irritación que es capaz de producir tanto síntesis como aposición de esta; o de la total inhibición cuando hay una severa inflamación.³⁸ La poca presencia o ausencia de aposición de dentina reparativa a los 30 días en los dos materiales dentales estudiados además sugiere que ha habido: una leve agresión hacia los tejidos dentales durante el procedimiento clínico, una leve inflamación y/o que el espesor de dentina remanente fue lo suficiente como defensa para no producirse ninguna estimulación.

Se concluye que el cemento autocondicionante SmartCem™2 presentó un buen desempeño clínico para ser utilizado como material cementante, debido a la ausencia de síntomas clínicos referidos por el paciente. Adicionalmente la observación histológica confirmó



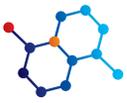
la poca o ninguna presencia de dentina terciaria y la disminución de la inflamación a través del periodo estudiado que según Mjör y colaboradores,³⁹ el hecho de que haya una inflamación persistente, no es sinónimo de una destrucción pulpar; siempre y cuando se tengan en cuenta el RDT, la permeabilidad de los túbulos dentinarios, el bajo grado de citotoxicidad de los componentes y la composición de los materiales a utilizar.

Por último, la investigación in vivo hace una invitación a que haya un adecuado y cuidadoso manejo de las diferentes técnicas restaurativas en los procedimientos clínicos, para que prevalezca y se resalte la importancia de la preservación de la estructura dental y así, disminuir el elevado número de dientes vitales que requieren el tratamiento endodóntico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr Carlos Alberto de Souza Costa (UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil), Dra Maria Clara Saavedra Gómez, Dra Libia Stella Castilla Díaz.

Recibido Octubre 2015
Aceptado Noviembre 2015



Referencias

1. Pisani-Proença J. Estudio in vitro de la eficacia de unión de cementos autoadhesivos a sustratos biológicos y no biológicos en Odontología: Efecto de pretratamientos de superficie. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada, España. 2010: 46-48.
2. Cabral R, Mazzola I. Acción de un medio de fijación autocondicionante sobre esmalte y dentina: observación con MEB. RAOA 2009; 97: 409-414.
3. Cox C, White K, Ramus D, Farmer J, Snuggs H. Reparative dentin: factors affecting its deposition. Quintessence Int 1992; 23: 257-270.
4. Gómez ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. Ed. Médica Panamericana; 2003.
5. Ponce H, Canalda C, Vilar J. Study of Dentinal Tubule Architecture of Permanent Upper Premolars: Evaluation by SEM. Aust Endod J 2001; 27(2): 66-72.
6. Love R. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. Endodontics Topics 2004; 3(1): 52-65.
7. Markowitz K, Pashley D. Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. J Oral Rehabil 2008; 35(4): 300-315.
8. Seltzer S, Bender I. Dental pulp: Biologic Considerations in Dental Procedures. 3ra ed. Quintessence Publishing Co. Inc, 1990.
9. Goldberg M, Smith A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15: 13-27.
10. Costa C, Lopez A, Teixeira H. Response of human pulps following acid conditioning and application of bonding agent in deep cavities. Dent Mater 2002; 18: 543-551.
11. Guzmán HJ. Biomateriales odontológicos de uso clínico. Bogotá D.C: ECOE Ediciones; 2006.
12. Mjör I, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. Quintessence Int 2002; 33: 35-63.
13. Demirci M, Hiller K, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. Dent Mater 2008; 24: 362-71.
14. Campos F, Nogueira I, Huck C, Hebling J, Costa C. Transdental cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine gel applied on acid-conditioned dentin substrate. J Biomed Mater Res 2010; 92B: 40-47.
15. Mayra C, Vallejo M, Erazo N. Citotoxicidad de los adhesivos dentinarios. Rev CES Odont 2010; 23(2): 79-90.
16. 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.
17. Huang F, Chang Y. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. Int Endod J 2002; 35: 905-909.
18. 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.
19. Costa C, Hebling J, Randall R. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restoration. Dent Mater 2006; 954-962.
20. 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: e45-e52.
21. 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 3T1 fibroblast. Rev Odontol Cienc 2009; 24: 129-134.
22. Ulker H, Sengun A. Cytotoxicity evaluation of self adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. Eur J Dent 2009; 3: 120-126.
23. International Standard Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5, 2nd ed. 1999.
24. Darmani H, Al-Hiyasat A, Mihem N. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. Quintessence Int 2007; 38: 789-795.
25. Hanks C, Strawn J, Wataha J, Craig R. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblast. J Dent Res 1991; 70(11): 450-455.
26. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 1995; 74: 1602-1606.
27. Bouillaguet S, Virgilio M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. J Oral Rehabil 1998; 25: 45-51.
28. Murray P, Lumley P, Ross H, Smith A. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. Biomaterial 2000; 21: 1711-1722.
29. 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 Radiol Endod 2007; 104: 102-108.
30. Dammaschke T, Stratmann Udo, Fischer RJ, Sagheri D, Schafer E. Proliferation of rat molar pulp cells after direct pulp capping with dentine adhesive and calcium hydroxide. Clin Oral Invest 2011; 15: 577-587.
31. Subramaniam P, Konde S, Prashanth P. An in vitro evaluation of pH variations in calcium hydroxide liners. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2006; 24(6): 144-145.
32. Estrella C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci 2003; 11 (4): 269-282.
33. Mohammadi Z, Dummer P. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J 2011; 44: 697-730.
34. Dahl J, Orstavik D. Responses of the pulp-dentin organ to dental restorative biomaterials. Endodontic Topics 2007; 17(1): 65-73.
35. Pashley D. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7: 104-133.
36. Gerzina TM, Hume WR. Movement of glass ionomer cement through human dentin during crown cementation in vitro. J Dent Res 1990; 69: 934.
37. Al-Fawaz A, Gerzina TM, Hume WR. Movement of resin cement components through acid treated dentin during crown cementation in vitro. J Endo 1993; 19: 219-223.
38. Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tziapas D. Pulpal responses after application of current adhesive. Clin Oral Invest 2007; 11: 313-320.
39. Mjör I, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. Quintessence Int 2002; 33: 35-63.