



## Trabajo de investigación

### BENEFICIOS DE LA SINVASTATINA COMO AGENTE COADYUVANTE EN EL RECUBRIMIENTO CAVITARIO DE CAVIDADES PROFUNDAS.

BENEFITS OF SIMVASTATIN AS COADJUVANT AGENT FOR DEEP CAVITY LINING

Guerra CC<sup>1</sup>, Leite MLAS<sup>2</sup>, Soares DG<sup>3</sup>, Duque CCO<sup>2</sup>, Basso FG<sup>4</sup>, Hebling J<sup>5</sup>, de Souza Costa CA<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Alumna de pregrado de Odontología, Departamento de Fisiología y Patología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidad Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

<sup>2</sup>Alumna del Doctoro en Rehabilitación Oral, Departamento de Prótesis y Materiales Odontológicos, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidad Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

<sup>3</sup>Profesora Doctora del Departamento de Dentística, Endodoncia y Materiales Odontológicos, Facultad de Odontología de Bauru, Universidad de São Paulo – USP, Rua Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru, SP, 17012-901, Brasil.

<sup>4</sup>Profesora de la Disciplina de Patología Bucal, Universidad de Ribeirão Preto – UNAERP, Avenida Costábile Romano, 2201, Ribeirão Preto, SP, 14096-900, Brasil.

<sup>5</sup>Profesora Titular del Departamento de Ortodontia y Clínica Infantil, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidad Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

<sup>6</sup>Profesor Titular del Departamento de Fisiología y Patología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidad Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

Correspondencia: casouzac@foar.unesp.br

Volumen 7.  
Número 3.  
Sep - Dic 2018

Recibido: 02 febrero 2018  
Aceptado: 22 febrero 2018

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la capacidad de difusión de la simvastatina (SV) a través de la dentina y su capacidad de bioestimular las células pulpares para depositar y mineralizar la matriz dentinaria.

**Material y métodos:** Se adaptaron discos de dentina (0,1 mm de espesor) dentro de cámaras pulpares artificiales (CPAs). Dichos conjuntos disco/CPA se colocaron en placas que contenían 1 mL de medio de cultivo (DMEM). Se aplicaron concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 mg de SV en 1 mL de etanol sobre los discos previamente tratados con EDTA. En el grupo de control negativo (CN) no se realizó ningún tratamiento sobre la dentina. El grupo EDTA+etanol se utilizó como control experimental (CE). Se realizaron los siguientes análisis (n=6): viabilidad celular (MTT), actividad de ALP (timolftaleína monofosfato) y deposición de matriz mineralizada (alizarin red). Los datos se analizaron con las pruebas ANOVA y Tukey (p<0.05). Resultados: No se encontraron diferencias significativas de los valores de viabilidad celular entre los grupos experimentales (p<0.05). El grupo EDTA+SV2,5 presentó valores significativamente superiores de actividad de ALP y deposición de matriz mineralizada respecto a los grupos CN y EDTA+etanol, así como a los demás grupos tratados con SV (p<0.05). **Conclusión:** La aplicación de 2,5 mg/mL de SV sobre la dentina sin barro dentinario aumenta la capacidad de las células pulpares odontoblastoides de depositar matriz mineralizada rica en calcio.

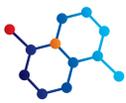
**Palabras clave:** Simvastatina, Odontoblastos, Dentina.

## ABSTRACT

**Objective:** The objective of the present study was to evaluate the transdental diffusion of simvastatin (SV) and its capacity to bioestimate pulp cells to deposit and mineralize dentin matrix.

**Material and methods:** Dentin discs (0.1 mm thick) were adapted in artificial pulp chambers (APCs), being these disc/CPA sets placed in wells containing 1 mL of culture medium (DMEM). Concentrations of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.5 mg of SV in 1 mL of ethanol were applied on discs previously treated with EDTA. In the negative control group (CN) no treatment was performed on dentin. The EDTA+ethanol group was used as experimental control (EC). Then, the following analyzes were performed (n=6): cell viability (MTT), ALP activity (thymolphthalein monophosphate), and deposition of mineralized matrix (alizarin red). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests (p<0.05). Results: There was no significant difference in the cell viability among the experimental groups (p<0.05). The EDTA+SV2.5 group presented higher values of ALP activity and deposition of mineralized matrix compared to CN and CE groups, as well as to the other experimental groups treated with SV (p<0.05). **Conclusion:** The application of 2.5 mg/mL SV on smear layer-free dentin increases the capacity of odontoblast-like pulp cells to deposit calcium-rich mineralized matrix.

**Keywords:** Simvastatin, Odontoblasts, Dentin.



## INTRODUCCIÓN

El recubrimiento cavitario se realiza con el objetivo de proteger el complejo dentino-pulpar de injurias pos-tratamiento restaurador en cavidades profundas realizadas en dientes vitales. Este tipo de tratamiento puede inducir a la deposición de dentina reaccional en la base de la pared pulpar de la cavidad, reduciendo el riesgo de agentes tóxicos provenientes de materiales restauradores o que los microorganismos lleguen a la pulpa por vía transdentinaria (Ferracane et al., 2010; de Souza Costa et al., 2014).

Así, sobre el piso de cavidades profundas es necesario aplicar un material de recubrimiento cavitario que presente un conjunto de propiedades, tales como: 1) actividad antimicrobiana, 2) resistencia mecánica, 3) baja solubilidad, 4) aislante térmico y eléctrico, 5) adhesión a las estructuras dentarias, 6) co-polimerización con el material restaurador (Hilton, 2002; de Souza Costa et al., 2002; Hebling et al., 2010) y 7) biocompatibilidad (de Souza Costa et al., 2002; de Souza Costa et al., 2007). Además, es esencial que el material de recubrimiento cavitario posea un potencial bioactivo, de tal forma que al ser aplicado sobre la dentina profunda permita o favorezca la reparación/regeneración del tejido pulpar (Wataha, 2012).

Los materiales actualmente recomendados para el recubrimiento cavitario son los cementos de ionómero de vidrio (CIV) modificado o no por resina y los cementos de hidróxido de calcio (Costa et al., 2011). Sin embargo, estos agentes recubridores no presentan todas las propiedades ideales requeridas para tal procedimiento, particularmente las relacionadas a la bioactividad frente a las células pulpares (Siz et al., 2000; Costa et al., 2003; Ferracane et al., 2010; Costa et al., 2011; de Souza Costa et al., 2014). De esa forma, cobra relevancia la mejora de los materiales existentes o incluso de la técnica utilizada, de modo que se confiera al protocolo de recubrimiento cavitario la capacidad de estimular células de la pulpa para depositar, de forma rápida y efectiva, matriz dentinaria reaccional.

Este estímulo celular puede prevenir la pérdida de la vitalidad de los dientes en situaciones clínicas donde el piso cavitario está muy cercano a la pulpa (de Souza Costa et al., 2014). Ante esto, algunos investigadores han sugerido el uso de sustancias bioactivas como potenciales coadyuvantes para la bioestimulación de las células pulpares (Okamoto et al., 2009; Min et al., 2010). Entre estas sustancias, la sinvastatina (SV) se destaca por presentar un efecto bioactivo sobre las células de la pulpa. Incluso cuando se utiliza en bajas concentraciones, la SV induce a la diferenciación odontogénica, provocando que las células depositen una matriz mineralizada. Esto ha sido comprobado en estudios in vitro (Min et al., 2010; Miyazawa et al., 2015; Leite et al., 2017) e in vivo (Okamoto et al., 2009; Karanxha et al., 2013; Asl Aminabadi et al., 2013; Jia et al., 2016). El objetivo del presente estudio fue evaluar el pre tratamiento de la superficie dentinaria con SV, buscando determinar la posible difusión transdentinaria de esta droga en concentraciones capaces de promover el aumento del potencial de células con fenotipo odontoblástico (células MDPC-23) para depositar y mineralizar la matriz dentinaria.

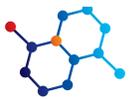
## MATERIAL Y MÉTODOS

**Obtención de los discos de dentina:** Después de la aprobación del proyecto por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología de Araraquara – UNESP (N° del Proceso: 51908415.3.0000.5416), se obtuvieron terceros molares humanos extraídos. Dichos dientes fueron inmersos en timol 0,1% y sometidos a la remoción de restos del ligamento periodontal.

A partir de la corona de cada diente, se obtuvo un disco de dentina, utilizándose para ello, una cortadora metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EE.UU.) acoplada a un disco de diamante (11-4254, 4" x 0,012" / serie 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda.). Las superficies de los discos de dentina se lijaron y regularizaron con lijas de agua con una granulación de 400 y 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) hasta obtener un espesor de 0,1 mm, medido con un calibrador digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil). Se redujo el área total utilizando de los discos de dentina utilizando una punta diamantada cilíndrica (número 1095 - KG Sorensen) en alta velocidad, de tal forma que el diámetro final de los discos fuese de 8 mm. Con el objetivo de estandarizar los grupos y permitir la correcta interpretación de los resultados obtenidos, se midió la conductancia hidráulica (permeabilidad) de todos los discos de dentina previo al inicio de los ensayos transdentinarios, tal como fue descrito por Leite et al. (2018). Después de determinar la permeabilidad dentinaria de cada disco, éstos se distribuyeron en los grupos experimentales, de tal manera que no hubiera diferencia estadísticamente significativa entre los valores numéricos medios obtenidos. A continuación, cada disco se ubicó individualmente en una cámara pulpar artificial (CPA), permaneciendo estabilizado por dos anillos de silicona y sellado periféricamente con cera utilitaria. Cada conjunto disco-CPA se embaló individualmente y se esterilizó en óxido de etileno para realizar las pruebas (Leite et al., 2018).

**Cultivo celular:** Las células inmortalizadas de linaje odontoblástico MDPC-23 se cultivaron en un medio de cultivo DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO, Grand Island, NY, EE.UU.), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EE.UU.) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**Procedimiento experimental:** Se seleccionaron cuatro concentraciones de SV (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) con la finalidad de evaluar el efecto bioactivo transdentinario sobre las células pulpares MDPC-23. Así, esas células se sembraron en placas de 96 compartimientos en DMEM con 10% de SFB, en una densidad de 2.500 células/compartimiento, y mantenidas durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cada conjunto disco/CPA se posicionó en un compartimiento de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimientos, agregándose 1 mL de DMEM con 10% de SFB. Tal como se observa en la Tabla 1, se realizaron diferentes tratamientos sobre los discos de dentina. En los grupos EDTA + SV la superficie oclusal del disco de dentina se acondicionó inicialmente con 10 µL de una solución de 0,5 M de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético; Mallinckrodt, St. Louis, MO, EE.UU.) por 30 segundos, seguido de lavado con agua destilada y secado de la superficie oclusal con disco de papel absorbente esterilizado. A continuación, se aplicó 20 µL de la solución de 0,1; 0,5; 1,0 o 2,5 mg/mL de SV activamente durante 20 segundos sobre la dentina, seguido de secado con chorro de aire durante 10 segundos para evaporar



el solvente (etanol). En el grupo control (CN) los discos de dentina no recibieron ningún tratamiento. El grupo EDTA + etanol se utilizó como control experimental (CE), ya que el etanol (alcohol etílico  $\geq 99,5\%$ ; Sigma-Aldrich) se empleó como un vehículo para diluir la SV. Una vez transcurridas 24 horas después de terminar los protocolos de tratamiento sobre la superficie dentinaria, se retiraron los conjuntos disco/CPA, se recolectó todo el extracto (DMEM + SV que se difunde a través de la dentina) y se distribuyó en alícuotas, las cuales se aplicaron por un período de 24 horas (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>) sobre las células MDPC-23 previamente sembradas en placas de 96 compartimentos.

Tabla 1 – Grupos experimentales según el tratamiento realizado sobre la superficie dentinaria.

GRUPOS	TRATAMIENTO
<b>CN</b>	Sin tratamiento
<b>CE (EDTA+etanol)</b>	0.5 M de EDTA + etanol
<b>EDTA+SV0,1</b>	0,5 M de EDTA + 0,1 mg/mL de SV
<b>EDTA+SV0,5</b>	0,5 M de EDTA + 0,5 mg/mL de SV
<b>EDTA+SV1,0</b>	0,5 M de EDTA + 1,0 mg/mL de SV
<b>EDTA+SV2,5</b>	0,5 M de EDTA + 2,5 mg/mL de SV

Después de un tiempo de contacto con el extracto, las células fueran mantenidas en DMEM con 10% SFB (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>) hasta la realización de cada prueba propuesta en este estudio, renovándose el medio cada 24 horas.

**Viabilidad celular:** La viabilidad celular se determinó por la prueba de MTT (n=6), la cual se realizó después de 24 h de exposición de las células MDPC-23 a los extractos obtenidos.

Para realizar esta prueba, las células se incubaron con DMEM suplementado con 10% de la solución de MTT (5 mg/mL; Sigma Chemical Co) durante 4 h. Después de este período, el medio se aspiró y los cristales de formazán producidos se disolvieron en solución de isopropanol acidificado, siendo realizada la lectura de la absorbancia a 570 nm. El valor medio de absorbancia del grupo CN fue considerado como 100% de viabilidad celular, siendo los valores en porcentaje de los demás grupos calculados a partir de este parámetro (Leite et al., 2017).

**Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP):** La actividad de ALP fue evaluada por la prueba de timolftaleína monofosfato (n=6) durante un período de 5 días, por medio del protocolo del avío de Fosfatasa Alcalina – Ensayo de Punto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) de acuerdo con Leite et al. (Leite et al., 2017). Para la normalización de la ALP, se realizó la cuantificación del dosaje de la proteína total. Para ello, se aplicó una solución de lauril sulfato de sodio 0.1% (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EE.UU.) sobre las células con el fin de promover la lisis celular. Una alícuota de esa reacción se transfirió a una placa de 96 compartimentos, seguido de adición del reagente de Lowry (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EE.UU.) e incubación durante 20 minutos. A continuación, se agregó solución de Folin y Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EE.UU.), la que permaneció en contacto durante 30 minutos, luego de los cuales se midió la absorbancia a 655 nm. El dosaje de ALP y proteína total se obtuvo a partir de una curva estándar, y el valor de la actividad de ALP se calculó a partir de la división de

los valores del dosaje de la ALP por el de la proteína total. Estos valores se tradujeron a porcentajes, considerándose el grupo CN como 100% de actividad de ALP.

**Deposición de la matriz mineralizada:** La deposición de la matriz mineralizada se evaluó utilizando la prueba de Alizarin Red (n=6) a los 14 días. Inicialmente, para fijación de las células, éstas fueron mantenidas a 4°C por 1 hora con etanol al 70%, seguido de incubación con solución de Alizarin Red (40 mM, pH 4,2; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EE.UU.) por 15 minutos bajo agitación. Después de este período, las células se lavaron con agua desionizada, luego se obtuvieron imágenes de la formación de nódulos de mineralización con una cámara fotográfica acoplada al microscopio de luz (Olympus BX51TF, Tokio, Japón) con un aumento de 4x. A continuación, se agregó una solución de cloruro de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EE.UU.) para disolver los nódulos. La absorbancia de la solución resultante se evaluó a 560 nm. Para este análisis, el grupo CN se consideró como 100% de marcación.

**Análisis estadístico:** Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad. Una vez comprobada dicha normalidad, los datos se evaluaron con la prueba ANOVA a un criterio, seguida de la prueba Tukey, para identificar las diferencias entre los grupos experimentales. Todas las pruebas se fijaron a un nivel de significancia de 5%.

## RESULTADOS

**Viabilidad celular:** Las concentraciones de 0,5; 0,1; 1,0; y 2,5 mg/mL de SV, cuando se aplicaron sobre la dentina previamente tratada con EDTA, no demostraron diferencias significativas en relación al grupo CN (p>0.05). También se observó que el grupo EDTA + etanol, utilizado como control experimental (CE), se mostró citocompatible (Figura 1).

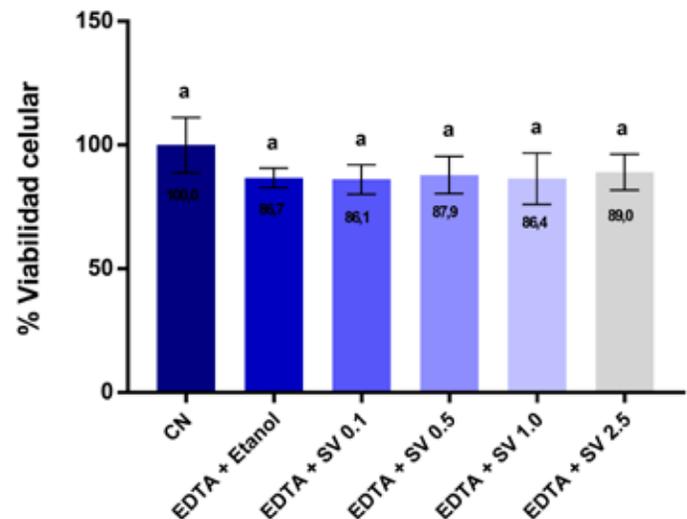


Figura 1 – Media y desviación estándar de los valores de viabilidad celular (%) de los grupos experimentales 24 h después del tratamiento realizado sobre la superficie dentinaria (n=6; pruebas ANOVA y Tukey; p<0,05). Las letras diferentes denotan diferencia estadística entre los grupos.

**Actividad de ALP:** Hubo un aumento significativo de la actividad de ALP en el grupo donde el disco de dentina se trató con EDTA seguido de la aplicación de 2,5 mg/mL de SV, comparado a los grupos control (CN - 55,5%) y EDTA + etanol (CE - 45,8%)



( $p < 0,05$ ). A pesar del aumento de los demás grupos tratados con SV, estos no difieren estadísticamente en relación al CN ( $p > 0,05$ ). Los datos de ALP se exponen en la Figura 2.

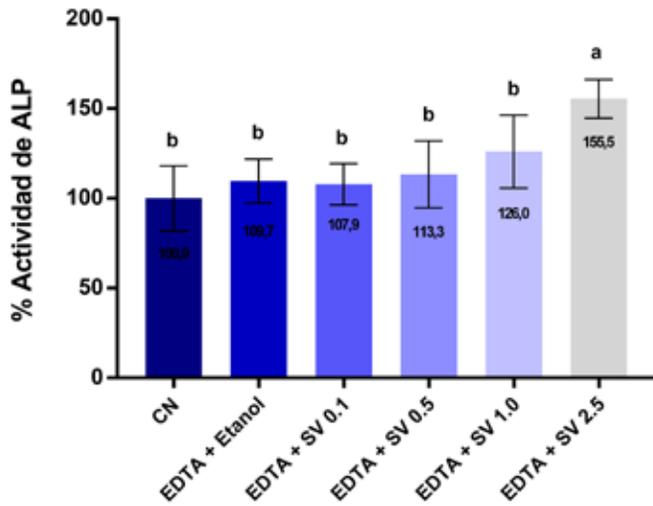


Figura 2 – Media y desviación estándar de los valores de actividad de ALP (%) de los grupos experimentales 5 días después del tratamiento realizado sobre la superficie dentinaria (n=6; pruebas ANOVA y Tukey;  $p < 0,05$ ). Las letras diferentes denotan diferencia estadística entre los grupos.

Deposición de la matriz mineralizada: Se observó un aumento significativo de 18,7%; 20,9%; 30,4% y 78,4% en la deposición de la matriz mineralizada de los grupos donde los discos de dentina se trataron con 0,1; 0,5; 1,0; y 2,5 mg/mL de SV, respectivamente, comparado con el grupo CN ( $p < 0,05$ ; Figura 3). Sin embargo, sólo el grupo EDTA + 2,5 SV difirió estadísticamente, tanto del grupo EDTA + etanol (CE), como de los demás grupos tratados con SV ( $p < 0,05$ ). En la Figura 3 se muestran imágenes de la formación de nódulos de mineralización por las células MDPC-23 durante el período de análisis de 14 días.

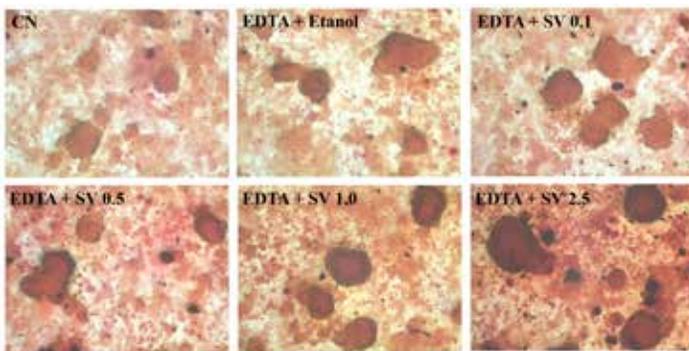


Figura 3 – Imágenes obtenidas con microscopio de luz invertida de la formación de nódulos de mineralización por la prueba de Alizarin Red después de 14 días. Se nota una mayor deposición de matriz mineralizada en el grupo EDTA+SV2,5 respecto a los demás grupos experimentales.

## DISCUSIÓN

Se sabe que un importante factor que puede contribuir decisivamente al fracaso del recubrimiento cavitario es la falla en restablecer la homeostasia del complejo dentino-pulpar, sea por componentes citotóxicos lixiviados de los materiales de recubrimiento, o incluso por patógenos cariogénicos que liberan toxinas que pueden alcanzar a la pulpa por vía transdentinaria y desencadenar un proceso inflamatorio intenso y persistente (de Souza Costa et al., 2014). Además, los materiales recubridores cavitarios contemporáneos no presentan un potencial bioactivo capaz de inducir una respuesta positiva de las células pulpares relacionadas con el piso de la cavidad (Costa et al., 2003; Costa et al., 2011; de Souza Costa et al., 2007). Así, el empleo de sustancias capaces de devolver la homeostasia pulpar y inducir a la deposición de dentina reaccional cuando se aplican sobre el piso de una cavidad muy profunda, en la eminencia de la exposición pulpar, sería muy interesante, ya que podría evitar la pérdida precoz de la vitalidad del diente y la necesidad de tratamiento endodóncico. Dentro de este contexto, la propiedad de la SV de inducir la diferenciación odontogénica y estimular la síntesis y deposición de matriz dentinaria ocasiona que esta droga adquiera mayor protagonismo como una interesante alternativa para aplicarse en situaciones clínicas críticas, tal como en el caso del recubrimiento cavitario de cavidades muy profundas (Okamoto et al., 2009; Min et al., 2010; Lee et al., 2012; Asl Aminabadi et al., 2013; Karanxha et al., 2013; Varalakshmi et al., 2013; Jia et al., 2016; Soares et al., 2018). A pesar de los promisoros resultados observados cuando la SV se aplicó sobre pulpas expuestas (Asl Aminabadi et al., 2013; Karanxha et al., 2013; Jia et al., 2016), aún no existían estudios que comprobaran su capacidad de difusión a través de la dentina y así bioestimular a las células con fenotipo odontoblástico.

En el presente estudio, se evaluaron cuatro diferentes concentraciones de SV después de aplicarse sobre finos discos de dentina. La SV se diluyó en etanol al 100%, ya que estudios in vitro e in vivo previos demostraron que la aplicación de este solvente sobre un sustrato dentinario muy delgado ( $< 0,5$  mm) no causó efecto citotóxico sobre las células pulpares (Bianchi et al., 2013; Scheffel et al., 2015). Además, se sabe que el etanol presenta rápida volatilización, lo que permite su empleo dentro de un tiempo clínico aceptable (Bianchi et al., 2013). En el presente estudio, la solución de SV+etanol se aplicó activamente sobre la superficie de la dentina, seguida de un leve chorro de aire, con la finalidad de evaporar el solvente y favorecer la incorporación de la SV sobre el sustrato dentinario tubular, acelerando así su difusión a través de la dentina. El acondicionamiento previo de la dentina con EDTA 0,5M durante 30 segundos realizado en la presente investigación buscó eliminar el barro dentinario presente en la embocadura de los túbulos dentinarios (Sauro et al., 2010) para facilitar la posible difusión transdentinaria de la SV. De esta manera, de acuerdo con los resultados de la presente investigación, constatamos que tanto en el grupo EDTA+etanol, así como en los demás grupos experimentales donde la dentina se trató con SV, no hubo reducción significativa de la viabilidad celular, confirmando estudios previos donde las células pulpares en cultivo se expusieron a la SV (Leite et al., 2017; Karanxha et al., 2013; Saewong et al., 2013; Jia et al., 2016).

Respecto a la bioactividad de la SV sobre las células MDPC-23, observamos, en el presente estudio realizado en el laboratorio, que en el grupo EDTA + 2,5 mg/mL de SV los



valores de actividad de ALP y deposición de matriz mineralizada fueron mayores cuando se les comparó a los grupos control CN y CE. Ya fue demostrado que las concentraciones específicas de SV (0,01 a 1,0  $\mu\text{M}$ ) son capaces de acelerar la expresión de marcadores del proceso de síntesis de la matriz ósea/dentinaria en células tronco pulpaes humanas (hDPSCs), tales como ALP, OCN, OPN, Runx-2, OSX, DSP e DMP-1 (Min et al., 2010; Lee et al., 2012; Karanxha et al., 2013), siendo este proceso relacionado con la activación de la vía ERK1/2 (Karanxha et al., 2013). Okamoto et al. (2009) reportaron el aumento en la formación de tejido mineralizado cuando las células hDPSCs fueron tratadas continuamente con 0,1  $\mu\text{M}$  de SV por 7 días y luego trasplantadas al tejido subcutáneo de ratones. Además, la asociación de una matriz (scaffold) macroporosa y nanofibrilar con bajas concentraciones de SV (0,1  $\mu\text{M}$ ) en un ambiente pro inflamatorio demostró ejercer efectos positivos sobre la angiogénesis, lo que resulta en un aumento de la vascularización in vivo, así como el aumento del potencial regenerativo del tejido dental (Soares et al., 2006). Varios investigadores (Min et al., 2010; Lee et al., 2012; Jia et al., 2016) también refirieron el aumento de la deposición de matriz mineralizada cuando las células pulpaes se trataron continuamente con 1,0  $\mu\text{M}$  de SV. Sin embargo, esta concentración redujo a proliferación de células hDPSC in vitro (Jia et al., 2016). Cuando se aplicaron diferentes concentraciones de SV (1,0; 5,0 y 10  $\mu\text{M}$ ) sobre el tejido pulpar de dientes deciduos humanos, se observó que las concentraciones más bajas de esta droga indujeron a una mayor deposición de la matriz dentinaria y redujeron la inflamación de los tejidos (Asl Aminabadi et al., 2013).

Diversos estudios in vitro demostraron que el tratamiento continuo de células pulpaes con bajas concentraciones de SV (0,01 a 0,1  $\mu\text{M}$ ) aumenta la diferenciación odontogénica cuando se les compara con concentraciones más elevadas (1,0 a 10  $\mu\text{M}$ ), las cuales presentaron efectos citotóxicos (Okamoto et al., 2009; Min et al., 2010; Karanxha et al., 2013; Saewong et al., 2013). Recientemente, Leite et al. (2017) observaron que células pulpaes expuestas durante 24 o 72 horas a concentraciones de 0,01 y 0,1  $\mu\text{M}$  de SV presentaron un aumento significativo en la actividad de ALP y formación de nódulos de mineralización. Así, los autores demostraron que concentraciones bajas de SV aplicadas durante períodos cortos sobre células odontoblastoides MDPC-23, no causan efectos tóxicos, sino estimulan el metabolismo celular. Sin embargo, en el presente estudio, la concentración más elevada de SV (2,5 mg/mL) estudiada fue aquella que estimuló, de forma citocompatible, una mayor síntesis y deposición de matriz mineralizada respecto a las concentraciones más bajas. Probablemente, esto ocurrió debido a que una gran cantidad de SV aplicada sobre la superficie oclusal de los discos permaneció retenida en el sustrato dentinario. Así, solo una reducida concentración de esta droga alcanzó el espacio pulpar para formar parte del extracto que se aplicó sobre las células pulpaes. Es importante resaltar que la SV es una droga liposoluble, lo que puede dificultar su capacidad de difundirse por los túbulos dentinarios. De esta manera, las bajas concentraciones de SV evaluadas en este estudio pueden haber resultado en la obtención de extractos con cantidad insuficiente de esta droga para bioestimar las células pulpaes en cultivo. Ante estos interesantes datos científicos obtenidos en el presente estudio, se vuelve evidente el potencial de la SV de difundirse a través de la dentina y estimular la formación de matriz mineralizada por células pulpaes, siendo que estos efectos positivos dependen de la concentración y protocolo de aplicación de la droga sobre

el sustrato dentinario. Es posible que los discos de dentina más gruesos limiten aún más la difusión de la SV a través de los túbulos dentinarios, lo que puede indicar que cuanto menos profunda sea una cavidad, mayor concentración de SV debe aplicarse sobre su pared axial. Además, son necesarios futuros estudios para esclarecer estas suposiciones y establecer parámetros seguros y eficaces de aplicación de la SV para el recubrimiento cavitario de dientes vitales.

Finalmente, basados en los resultados positivos obtenidos en el presente estudio, pero salvando las debidas limitaciones de datos científicos obtenidos a partir de investigaciones realizadas en el laboratorio, podemos considerar el posible empleo de la SV como coadyuvante al recubrimiento de cavidades profundas, asociando su potencial bioactivo a materiales con interesantes propiedades biológicas, antimicrobianas y mecánicas, tales como los cementos de ionómero de vidrio. Sin embargo, para validar esta hipótesis y definitivamente indicar con seguridad el uso clínico de la SV en cavidades profundas, es necesario realizar nuevas investigaciones in vitro e in vivo que evalúen la capacidad de difusión transdentinaria de esta droga y su efecto a largo plazo sobre la pulpa, cuando se asocia a diferentes cementos recubridores.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la metodología empleada en el presente estudio, fue posible concluir que la concentración de 2,5 mg/mL de sinvastatina, cuando se aplicó sobre la dentina libre de barro dentinario, es capaz de bioestimar, por vía transdentinaria, las células odontoblastoides MDPC-23 en cultivo, aumentando el potencial de síntesis y mineralización de la matriz dentinaria.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de São Paulo/FAPESP (# 2015/15635-7) y al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico/CNPq (# 303599/2014-6; # 443153/2014-0; # 126310/2016-5).

### TRADUCCIÓN AL IDIOMA ESPAÑOL:

Dra. Natalia Henostroza Quintans

-Magister en Dentística Restauradora- Universidad de Sao Paulo/ Baurú- Brasil.

-Profesora de la Sección académica de Operatoria Dental y Materiales Dentales del DACE.

-Miembro fundador de la Asociación Latinoamericana de Operatoria Dental y Biomateriales.



## REFERENCIAS

1. Asl Aminabadi N, Maljaei E, Erfanparast L, Ala Aghbali A, Hamishehkar H, Najafpour E. Simvastatin versus calcium hydroxide direct pulp capping of human primary molars: a randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2013;7(1):8-14.
2. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdental cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dent Mater* 2013;29(9):980-90.
3. Costa CAS, Ribeiro APD, Giro EMA, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater* 2011;27(7):e158-70.
4. Costa CAS, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* 2003;36(12):831-9.
5. de Souza Costa CA, do Nascimento AB, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater* 2002;18(7):543-51.
6. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater* 2014;30(7):769-84.
7. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81(1):175-84.
8. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology* 2010;98(1):2-14.
9. Hebling J, Ribeiro APD, de Souza Costa CA. Relação entre materiais dentários e o complexo dentino-pulpar. *Rev Odontol Bras Central* 2010;18(48):1-9.
10. Hilton TJ. Can modern restorative procedures and materials reliably seal cavities? In vitro investigations. Part 1. *Am J Dent* 2002;15(3):198-210.
11. Jia W, Zhao Y, Yang J, Wang W, Wang X, Ling L, et al. Simvastatin promotes dental pulp stem cell-induced coronal pulp regeneration in pulpotomized teeth. *J Endod* 2016;42(7):1049-54.
12. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nör JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2013;39(1):76-82.
13. Lee SY, Min KS, Choi GW, Park JH, Park SH, Lee SI, et al. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 2012;38(3):405-10.
14. Leite MLAS, de Souza Costa CA, Duarte RM, Andrade AKM, Soares DG. Bond Strength and Cytotoxicity of a Universal Adhesive According to the Hybridization Strategies to Dentin. *Braz Dent J* 2018;29(1):68-75.
15. Leite MLAS, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Biostimulatory effects of simvastatin on MDPC-23 odontoblast-like cells. *Braz Oral Res* 2017;18(31):e104.
16. Min KS, Lee YM, Hong SO, Kim EC. Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells. *J Endod* 2010;36(3):447-52.
17. Miyazawa A, Matsuno T, Asano K, Tabata Y, Satoh T. Controlled release of simvastatin from biodegradable hydrogels promotes odontoblastic differentiation. *Dent Mater J* 2015;34(4):466-74.
18. Okamoto Y, Oshima M, Tsuchimoto Y, Matsuka Y, Yasuda T, Shi S, et al. Simvastatin Induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *J Endod* 2009;35(3):367-72.
19. Saewong S, Thammasitboon K, Wattanaroonwong N. Simvastatin induces apoptosis and disruption of the actin cytoskeleton in human dental pulp cells and periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2013;58(8):964-74.
20. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater* 2010;26(4):368-79.
21. Scheffel DL, Sacono NT, Ribeiro AP, Soares DG, Basso FG, Pashley D, et al. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. *J Dent* 2015;43(5):537-45.
22. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent*. 2000;28(6):413-22.
23. Soares DG, Zhang Z, Mohamed F, Eyster TW, de Souza Costa CA, Ma PX. Simvastatin and nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment. *Acta Biomater* 2018;1(68):190-203.
24. Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with  $\beta$ -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod* 2013;39(6):806-12.
25. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012;28(1):23-40.