



Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929

Magnolia Peralta Pérez,* Eileen Uribe Querol,§ Raúl Luis García Aranda,|| G Gutiérrez Opsina¶

RESUMEN

Los selladores endodóncicos pueden causar citotoxicidad en los tejidos periapicales después de un tratamiento de conductos. En general, las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* realizadas a los selladores evalúan su citotoxicidad cuando éstos ya endurecieron, lo que limita la evaluación de sus efectos durante la aplicación aguda; condición observada en la clínica. En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad de tres selladores: AH-Plus™, RoekoSealAutomix® (RSA) y Roth Root utilizando un dispositivo que permite evaluar los efectos de los selladores durante su fase de polimerización. Cultivos de fibroblastos murinos fueron expuestos a los distintos selladores durante 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Después de cada período de tiempo se evaluó la morfología celular por microscopía de luz y la viabilidad mediante la prueba de exclusión del azul tripano. La morfología de fibroblastos expuestos al RSA no se altera. Sin embargo, al exponerlos a los otros dos selladores la mayor parte de los fibroblastos se despegan después de las primeras 6 horas. El ensayo de viabilidad muestra que el número de fibroblastos fue muy parecido entre el grupo control y el grupo expuesto a RSA a lo largo del curso temporal. En contraste, la muerte de fibroblastos es evidente desde las primeras 6 horas de exposición al AH-Plus™ y al Roth Root. En conclusión, debido a que el RSA no mostró citotoxicidad, parece que los selladores con base de silicona constituyen la primera elección para el tratamiento de conductos.

Palabras clave: Cultivo celular, azul tripano, Roth Root, AH-Plus™, RoekoSealAutomix®.

Key words: Cell culture, tripan blue, Roth Root, AH-Plus™, RoekoSealAutomix®.

INTRODUCCIÓN

En el tratamiento odontológico, la terapia de conductos radiculares (i.e., endodoncia) es uno de los procedimientos más empleados para conservar los dientes que en otro caso se perderían. La endodoncia tiene como objetivo eliminar el tejido pulpar (para detener el dolor) y las bacterias (para evitar que invadan los tejidos periapicales) del conducto. Además, permite ampliar el conducto, desde la región apical hasta la coronal para obtener una cavidad de forma cónica limpia y de fácil obturación.^{1,2}

La obturación es el relleno tridimensional de todo el conducto radicular. Este relleno se coloca lo más cercano al límite de la unión cemento-dentinaria. Los materiales que se usan para la obturación son esencial-

ABSTRACT

Endodontic sealers may cause periapical tissue cytotoxicity following root canal treatments. In general, *in vitro* biocompatibility tests evaluate the cytotoxicity of sealers long after they have hardened. Hence, in this study we evaluated the acute effects of three sealers: AH-Plus™, RoekoSealAutomix® (RSA) and Roth-Root using a pore membrane system where the sealers are placed on top just after mixing. Mouse fibroblast cultures were exposed for 6, 12, 24, 36, 48 y 72 hours to the sealers described above. After each period, the morphology and viability of fibroblasts were evaluated. There were no differences in morphology between cells exposed to RSA and control conditions. Fibroblasts exposed to the other two sealers detached from the culture dish, lost their flame-like morphology and appeared rounded. The number of cells in cultures exposed to RSA was similar to that of the control cultures. In contrast, fibroblast exposed to the other two sealers died after 6 hours of culture. In conclusion, because RSA essentially showed no cytotoxicity, it appears that silicon-based sealers are the best options for treating root canals.

mente la gutapercha, que tiene biotolerancia comprobada^{3,4} y los selladores.

Los selladores son sustancias que idealmente facilitan la obtención de un sellado hermético.¹ Se clasifi-

* Alumna de la Especialidad de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

§ Profesora de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

|| Profesor de la Especialidad de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

¶ Investigador Titular A del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

can por sus constituyentes en tres grupos principales: 1) con base de óxido de zinc-eugenol (ZnOE), 2) plásticos (e.g., resinas epóxicas, siliconas) y 3) aquéllos cuyo componente principal es el hidróxido de calcio.^{1,5}

Debido al estrecho contacto entre los selladores y los tejidos perirradiculares, y a que se sabe que se liberan sus subproductos a través del foramen apical antes y después de su endurecimiento, es necesario conocer el grado de citotoxicidad que presentan. En la especificación #41-1982 de la American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA)⁶ sobre la biocompatibilidad de materiales dentales, se establecen los parámetros necesarios para que los especialistas comparen y elijan sus materiales dentales. La toxicidad de un material se determina en general, utilizando un sistema de tres pasos. Primero se evalúa su citotoxicidad *in vitro*. El segundo paso es la implantación subcutánea o intraósea del material para evaluar la reacción tisular local. El tercer paso consiste en evaluar la reacción *in vivo* entre el tejido y el sellador, en animales y en humanos.^{7,8} Las pruebas *in vitro* son el primer paso para establecer la biocompatibilidad. En estas pruebas se emplean preferentemente fibroblastos de líneas celulares tumorales^{9,10} y se estudian los efectos tóxicos de los selladores a largo plazo; es decir, con los selladores endurecidos.

Consideramos que es de innegable importancia conocer los efectos agudos de los selladores. En este trabajo se cultivaron fibroblastos de la línea celular L929 y se expusieron a tres diferentes selladores: AH-Plus™, RoekoSeal Automix® (RSA) y Roth Root. Los selladores se colocaron utilizando un sistema que evita el contacto directo del sellador con el cultivo y permite evaluar los efectos citotóxicos de manera más aproximada a las condiciones utilizadas en clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para el cultivo celular se emplearon fibroblastos de ratón de la línea celular L929. Los fibroblastos fueron cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY; suplementado con: 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 8mM de L-glutamina (GIBCO) y penicilina/estreptomina (50,000 unidades/mL 50,000 µg/mL respectivamente; GIBCO).

Los cultivos entre 80-90% de confluencia fueron despegados con 5 mL de tripsina/EDTA (150 µM/318 µM; GIBCO) durante 5 minutos. La tripsina fue neutralizada con un volumen igual de medio fresco. La suspensión celular fue centrifugada 2 minutos a 1,500 rpm; el sobrenadante fue desechado y el botón de fibroblas-

tos fue resuspendido en 5 mL de medio fresco. Se sembraron 200 µL de esta suspensión y los cultivos fueron mantenidos en un incubador (Nuair™) a 37°C y 5% de CO₂.

Para los experimentos, los fibroblastos se siembran a una concentración de 30,000 fibroblastos/pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Corning, New York, NY) en un volumen final de 300 µL de medio. Los cultivos se incubaron toda la noche para permitir que los fibroblastos se adhirieran a los pozos. Los selladores fueron colocados en los cultivos 24 horas después.

Todos los experimentos se realizaron entre la siembra 3 y la 16.

Preparación y colocación de los selladores

Los selladores RoekoSeal Automix® (RSA), AH-Plus™ (DENTSPLY, DeTrey) y Roth Root (Roth Internacional) fueron mezclados según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se colocó una gota en la parte central de insertos (dispositivos de plástico con membranas porosas de 0.4 µm Millicell Millipore; Figura 1).

Los insertos fueron colocados en los cultivos y fueron retirados pasadas 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de exposición a los selladores.

Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles.

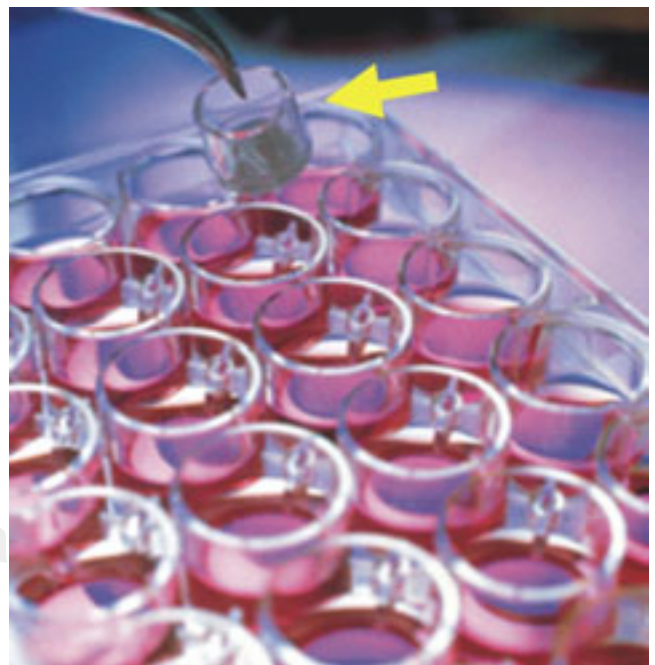


Figura 1. Colocación de insertos de plástico en cajas de cultivo de 24 pozos.

Morfología

Los cultivos fueron observados en un microscopio estereoscópico (Nikon™) con un objetivo de proyección de 16X. Se tomaron fotografías de los cultivos al momento de colocar los insertos (hora cero), y después de cada uno de los tiempos y tratamientos usados. Se evaluó la morfología celular y su adhesión en cada una de las condiciones experimentales ensayadas.

Viabilidad celular

Un método ampliamente empleado para discernir entre una célula viva y una muerta es el denominado

prueba de exclusión del azul tripano. El azul tripano es un colorante supravital que se incorpora a las células muertas.

Los fibroblastos de cada condición experimental fueron despegados con 200 µL de tripsina/EDTA por pozo, neutralizada con medio fresco, centrifugados a 14,000 rpm durante un minuto y resuspendidos nuevamente en 200 µL de medio. En cada caso se tomaron 100 µL de muestra, 250 µL de azul tripano al 0.4% (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 150 µL de solución balanceada de sales de Hank's (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY). Las suspensiones celulares se contaron en hemocitómetros. El conteo se realizó según el protocolo antes descrito¹¹ con un microscopio de luz

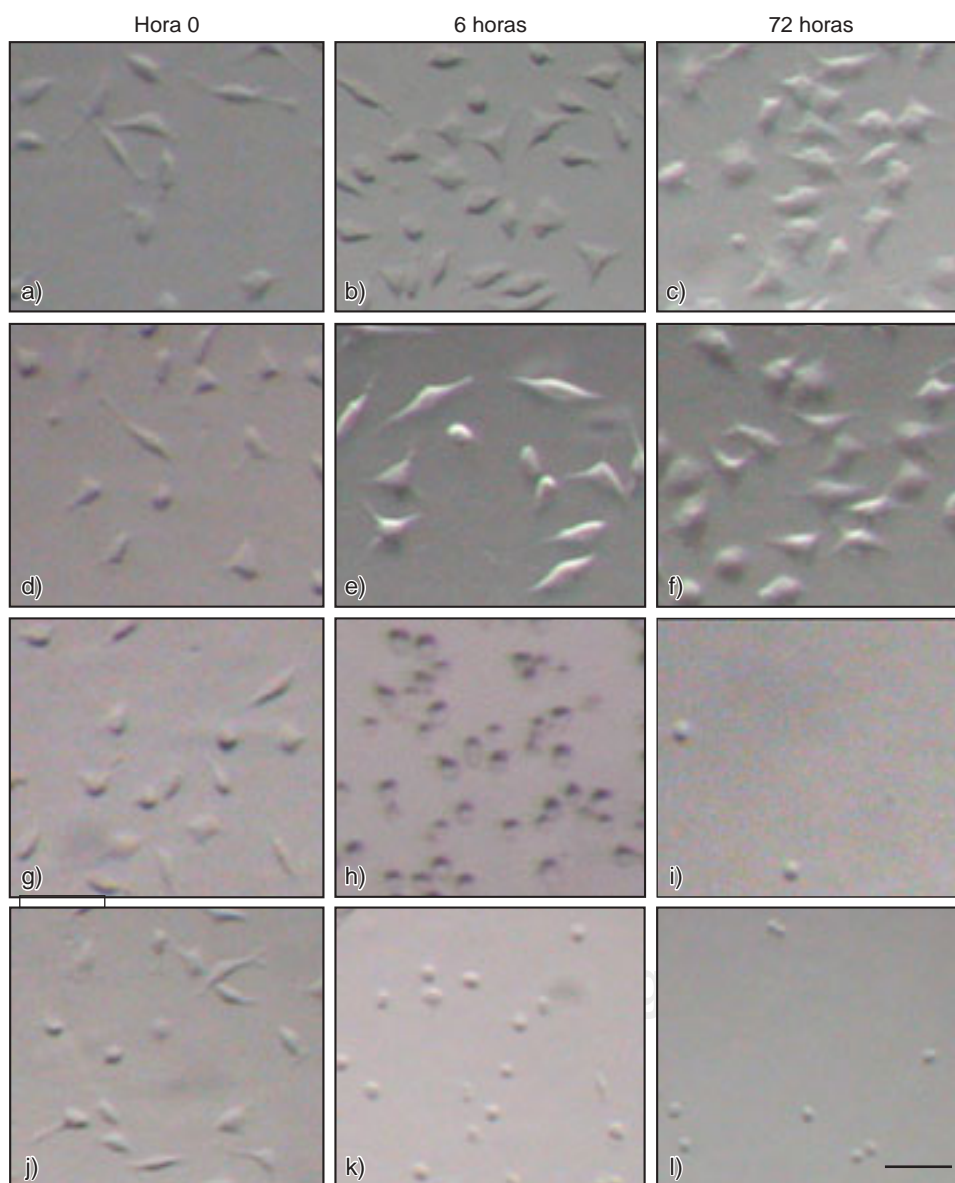


Figura 2. Fotografías que muestran la morfología de los fibroblastos controles (a, b, c) y expuestos a RSA (d, e, f), AH-Plus™ (g, h, i) y Roth Root (j, k, l) a la hora 0, a las 6 y a las 72 horas. Los fibroblastos tratados con RSA muestran una morfología normal, mientras que los tratados con los otros dos selladores presentan una morfología redondeada desde las primeras 6 horas. Escala 30 µm.

(Nikon™) a un aumento de 10x. Brevemente, se contabilizaron las células usando un contador manual en cada una de las cuatro esquinas y en el cuadro central del hemocitómetro. El número de células por mililitro se determinó usando la siguiente fórmula.

Células/mL = Promedio del conteo por cuadro x factor de dilución x 10^4

Total de células = Células/mL x volumen total original de suspensión celular

Donde 10^4 es el volumen del factor de corrección para el hemocitómetro: cada cámara es 1 x 1 mm y la profundidad es 0.1 mm.

Estadística

Se determinaron las diferencias significativas entre los grupos y los cursos temporales mediante un análisis de varianza y una prueba *post hoc*.

RESULTADOS

Morfología

Los fibroblastos control se adhieren al plato y adquieren una forma ahusada que se mantiene a lo largo del curso temporal (desde las 6 y hasta las 72 horas). La morfología de los fibroblastos en los cultivos expuestos a RSA es también ahusada y se conserva a lo largo del tiempo (Figura 2). La mayor parte de los fibroblastos que fueron expuestos al AH-Plus y al Roth Root perdieron su morfología desde las primeras 6 horas de exposición, se redondearon y despegaron del pozo. Los fibroblastos que sobrevivieron se veían aún adheridos al pozo pero su morfología era redondeada (Figura 2).

Crecimiento celular

La curva crecimiento de los fibroblastos cultivados en condiciones control muestra aumentos del 28% para las 6 horas, del 40% para las 12, del 140% para las 24 que llegan hasta un 316% para las 72 horas (Cuadro I). Esto sugiere que los fibroblastos están dividiéndose sin llegar aún a la fase estacionaria de su crecimiento.

Al comparar los porcentajes de crecimiento obtenidos con los diferentes selladores observamos que el crecimiento de los fibroblastos tratados con RSA es muy parecido al del grupo control hasta las doce horas. A partir de las 24 horas, sin embargo, el crecimiento celular en estos cultivos parece hacerse más

lento siendo esta diferencia significativa hasta las 72 horas ($p < 0.001$; Cuadro I). En contraste, los fibroblastos expuestos a AH-Plus™ y Roth Root no muestran indicios de crecimiento ($p < 0.001$ vs control desde las 6 horas; Cuadro I).

Viabilidad celular

La viabilidad que muestran los fibroblastos expuestos a RSA es comparable con la del grupo control hasta las 48 horas. Sin embargo, a las 72 horas el número de fibroblastos vivos es menor ($p < 0.001$; Figura 3). Esto no implica necesariamente que haya muerte celular, sino más bien una detención del crecimiento.

En el caso de los fibroblastos expuestos a AH-Plus™ y Roth Root, se observa una disminución muy significativa en el número de fibroblastos vivos desde las primeras horas de incubación ($p < 0.001$ vs control desde las 6 horas; Figura 3).

Muerte celular

Al cuantificar el número de fibroblastos muertos se observó que el patrón de muerte a lo largo de las 72 horas es muy similar entre el grupo control y el expuesto a RSA. En ambos grupos la cantidad de fibroblastos muertos incrementa con el tiempo pero no existen diferencias significativas (Figura 4). Debe enfatizarse el hecho de que el número de fibroblastos muertos no excede del 15% en ambos grupos experimentales.

El conteo de fibroblastos muertos en aquellos cultivos expuestos AH-Plus™ y Roth-Root no se pudo realizar ya que estos selladores destruyen a las células.

DISCUSIÓN

En el presente estudio fueron evaluados tres selladores de conductos radiculares *in vitro*. Los materia-

Cuadro I. Incremento en el número de fibroblastos, con respecto a la hora 0, cultivados en condiciones control o expuestos a RSA, AH-Plus™ o Roth-Root.

	Control	RSA	AH-Plus™	Roth-Root
6 horas	28%	28%	6.0%	20.6%
12 horas	40%	30%	2.6%	6.0%
24 horas	140%	82%	0.8%	9.0%
36 horas	100%	66%	0.0%	3.0%
48 horas	260%	160%	0.0%	0.3%
72 horas	316%	134%	0.0%	0.0%

les usados fueron selladores a base de óxido de zinc y eugenol (Roth-Root), resina epóxica (AH-Plus) y sílica (RSA).

Existen numerosos estudios *in vitro* que reportan la citotoxicidad de materiales a base de óxido de zinc y eugenol. Rappaport HM y cols, así como Nakamura H y cols.^{12,13} reportaron que la citotoxicidad de estos selladores puede ser causada principalmente por el eu-

genol. Con respecto a la citotoxicidad AH-Plus™ se ha demostrado que la muerte es causada por la liberación de formaldehído.¹⁴ En todos estos estudios se han utilizado los cementos ya endurecidos. En concordancia con lo reportado previamente^{12,14} nuestros resultados muestran que los selladores AH-Plus™ y Roth Root son citotóxicos para los fibroblastos.

El grado de citotoxicidad observado en nuestro estudio es mayor que el reportado en las investigaciones previas. Esto pudiera deberse a la diferente forma utilizada para condicionar el medio con los selladores.¹⁵ En algunos casos se emplean factores de dilución de los selladores para lograr concentraciones parecidas a las usadas en clínica, pero también usan selladores ya endurecidos. En otros casos se utilizan medios condicionados de los selladores y se prueba su citotoxicidad sobre las células.^{16,17} En nuestro caso, se usó un sistema que permite evaluar los efectos de los selladores desde que se mezclan y a lo largo de su endurecimiento. El tiempo de endurecimiento es un factor muy importante para evaluar la citotoxicidad, ya que los componentes que se pueden liberar al medio durante este proceso parecen ser los más tóxicos [Roth-Roth (8 días) AH-Plus™ (8 horas) RSA (30 minutos)]. En el caso del RSA el tiempo de endurecimiento es muy rápido y probablemente esto ayude a que no se liberen componentes tóxicos por largo tiempo.

El RSA ha sido ampliamente estudiado en cuanto a sus características físicas pero no en cuanto a su citotoxicidad. Se sugiere que debido a su rápida polimerización las sustancias de liberación secundarias son mínimas y que su excelente sellado se debe a la expansión que sufre y no una contracción como otros y por ello no es diluido.^{18,19} Gencoglu N, Turkmen C y Ahiskali R²⁰ lo compararon con el cemento de Grossman, en obturaciones con condensación lateral, y hallaron que el RSA sella significativamente mejor que el Grossman. Genera una buena adhesión a la dentina y a la gutapercha, y en conectivo de rata genera tejido granulomatoso. En nuestro estudio el RSA no muestra características tóxicas dado que el grado de muerte celular observado no es diferente al del grupo control. En cuanto al crecimiento celular sí existen diferencias con respecto al control. Este hecho puede explicarse por un efecto sobre el ciclo celular, haciendo más largo el periodo de división celular de los fibroblastos o porque los fibroblastos presentan un envejecimiento prematuro. En cualquiera de los casos se necesitarían hacer estudios que lo comprobaran.

En conclusión debido a que el RSA no mostró citotoxicidad, parece que los selladores con base de sílica constituyen la primera elección para el tratamiento de conductos.

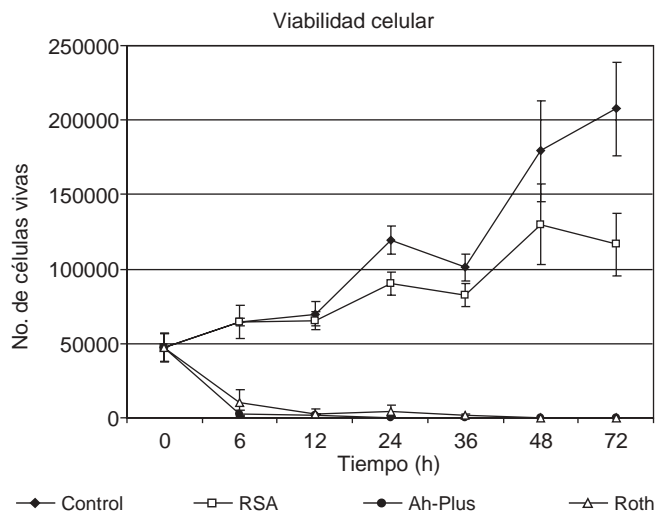


Figura 3. Gráfica que muestra el número de fibroblastos vivos en los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.

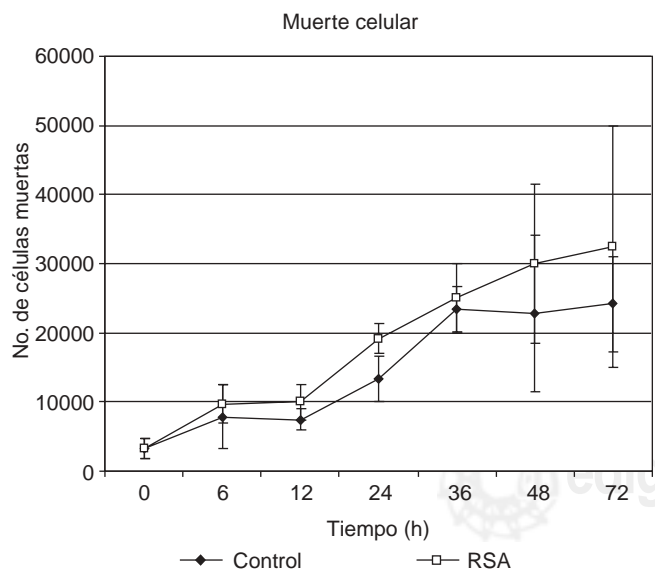


Figura 4. Gráfica que muestra la muerte de los fibroblastos control y el grupo experimental del RSA a lo largo del tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Higinio Arzate y a Eduardo Martínez por su apoyo académico y técnico. El proyecto se realizó con apoyo financiero obtenido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (38615N) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM, PAPIIT IN203702).

REFERENCIAS

- Schwarze T, Leeyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endodon* 2002; 28 (11): 749-753.
- Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C, Proust JP. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super EBA. *J Endodon* 1997; 23: 315-9.
- Nyguen TN. Obturation of root canal system. In *Pathways of the pulp*. 5th ed. (eds. S. Cohen and Burns) C.V. Mosby Co. St. Louis, MO. USA. 1991: 193.
- Sjogren U, Sundqvist G, Nair PN. Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcutaneously in guinea pigs. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 313-321.
- Kamran E, Safavi DMD, Larz SW, Spangberg DDS, Ney S, Costa George Sapounas DDS. *An in vitro Method for Longitudinal Evaluation of Toxicity of Endodontic Sealers*. 1989; 15: 484-6.
- ANSI/ADA Specification 41 for biological evaluation of dental materials. Approved January 4, 1982.
- Osario RM, Fet A, Vertucci F, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endodon* 1998; 24: 91.
- Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int Endod J* 1997; 30: 141-4.
- Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide- based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002; 35: 153-168.
- Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an *in vitro* evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 182-185.
- Current Protocols in Cell Biology. *Chapter 2: Assessment of Cell Toxicity. Basic Protocol 1: Tripin Blue Uptake to Assess Viability*.
- Rappaport HM, Lilly GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1964; 8: 785-802.
- Nakamura H, Matsumoto Y, Hirano S et al. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endodon* 1986; 12: 156-160.
- Cohen B, Pagnillo MK et al. An *in vitro* Study of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers. *J Endodon* 2000; 26(4): 228-229.
- Molina-Guarneros JA, García-Cuéllar G, Martínez-Valenzuela A, García-Mondragón MJ, Llamas-Hernández E, García-Aranda RL, Arzate H. Effects of six endodontic cements on the cells of the murine immune system *in vitro*. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 47-50.
- Nasim GA, Mahnaz H, Zahra SB, Fazel S. *In vitro* cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endodon* 2000; 26(8): 462-465.
- Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-Term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endodon* 2002; 28(11): 749-753.
- Dartar MO, Yilmaz, Kalayci A, Zaimoglu L. A comparison of the *in vitro* cytotoxicity of two root canal sealers. *J Oral Rehab* 2003; 30: 426-429.
- Min-Kai W, Tigos E, Wesselink PR. An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: A leakage study *in vitro*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 2002; 94: 499-502.
- Gencoglu N, Turkmen C, Ahiskali R. A new silicon-based root canal sealer (Roekoseal-Automix). *J Oral Rehabil* 2003; 30(70): 753-7.

Dirección para correspondencia:

Raúl Luis García Aranda

Coordinador del Área Clínica del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM
Tel: 5523-0115

Correo electrónico: rlg@servidor.unam.mx