

# “EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LOS MATERIALES DE OBTURACION GUTAPERCHA Y RESILON® EN CULTIVOS DE LINEAS CELULARES Y CELULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO”

Paola Truque Rivera<sup>1</sup>, Amaury de Jesús Pozos Guillén<sup>2</sup>, Othir Gidalti Galicia Cruz<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Master en Ciencias con Especialidad en Endodoncia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México; <sup>2</sup>Profesor-Investigador de la Facultad de Estomatología, UASLP; <sup>3</sup>Profesor-Investigador del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina, UASLP.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la citotoxicidad de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® *in vitro* en las líneas celulares HEK-293, 3T3-J y en cultivos primarios de células humanas aisladas de ligamento periodontal.

Los cultivos primarios de células de ligamento periodontal se aislaron a partir de terceros molares de reciente extracción de sujetos sanos, y se cultivaron al igual que las líneas celulares HEK-293 y 3T3-J a 37°C en una atmósfera estéril saturada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El efecto de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® en la viabilidad de las células en cultivo se evaluó utilizando el ensayo de MTT en monocapas de células sembradas a una densidad de 10<sup>5</sup> células/0.32 cm<sup>2</sup>. Los resultados obtenidos se analizaron con las pruebas estadísticas ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnet y t de Student para evaluar diferencias entre tratamientos.

Los resultados demostraron que existe un incremento significativo (P<0.05) en la citotoxicidad de las células estudiadas en condiciones *in vitro* en respuesta al incremento en la exposición de los materiales gutapercha y Resilon® a partir de 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>, así como en respuesta al tiempo de incubación a las 72 h.

El efecto tóxico sobre la viabilidad celular observada en los tres modelos de células en cultivo estudiadas fue similar ante el estímulo de estos materiales de obturación.

**Palabras Clave:** citotoxicidad, biocompatibilidad, Resilon®, gutapercha, fibroblastos de ligamento periodontal humano.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of the obturation materials gutta-percha and Resilon® *in vitro*, in the cell lines HEK-293, 3T3-J and primary culture of human periodontal ligament cells.

The primary cell culture of periodontal ligament cells was isolated from third molars of recent extraction from healthy patients. These were cultivated in the same conditions as the cell lines HEK-293 and 3T3-J at 37°C in a sterile saturated atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. The effect of the obturation materials gutta-percha and Resilon® on the cell viability was evaluated using the MTT assay in cell monolayers at a density of 10<sup>5</sup> cells/0.32 cm<sup>2</sup>. The results were analyzed with one-way ANOVA, Dunnet's test and Student's *t* test to evaluate differences between treatments.

The results obtained demonstrated a significant increase (P<0.05) in the cytotoxicity of the studied cell cultures as a response to the increase in exposure to the obturation material gutta-percha and Resilon® from 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>, as well as a response to the incubation period of 72 hour.

The toxic effect over cell viability observed in the three cell culture models was similar in the response to these obturation materials.

**Key words:** cytotoxicity, biocompatibility, Resilon®, gutta-percha, periodontal ligament fibroblasts.

## **INTRODUCCION**

La endodoncia es un procedimiento clínico que involucra respuestas biológicas, y debido a ello, los materiales utilizados en el proceso deben minimizar la respuesta celular del organismo. El material idóneo utilizado para la obturación del sistema de conductos radiculares debe ser biológicamente compatible con el tejido, es decir, no debe causar irritación en el tejido periapical, ya que estará en contacto con éste por periodos prolongados (Willershausen B et al., 2000).

La gutapercha utilizada convencionalmente en el campo de la endodoncia, ha demostrado ser biocompatible con los tejidos periapicales. El Resilon® de reciente introducción, por otra parte, ha demostrado tener algunas características superiores a la gutapercha en las que se incluyen el sellado y la resistencia a la fractura de los dientes tratados endodónticamente (Shipper G, Orstavik D et al., 2004; Teixeira et al., 2004). Sin embargo, debido su reciente introducción, los estudios de biocompatibilidad del material aún no han sido completamente descritos. De acuerdo a lo que se ha reportado hasta el momento, este material no es mutagénico y posee un potencial alergénico débil (Li X, 2002; Lister L, 2002).

Los materiales de obturación que se colocan dentro del sistema de conductos están en contacto directo con el tejido que rodea a la raíz: el periodonto, mientras la pieza dental permanezca en la cavidad bucal. Debido a esto, es importante que el material utilizado con esta finalidad, no produzca reacciones citotóxicas en el tejido.

Idealmente, la obturación debe realizarse dentro de los límites del conducto radicular, no obstante, existe la posibilidad de errores durante el procedimiento que provoquen que el material se extruya del conducto y entre en contacto directo con el tejido periapical. Es en estos casos, donde la biocompatibilidad del material es un factor fundamental en el proceso de reparación, ya que el material podría desencadenar un proceso inflamatorio y daño celular, modificando el proceso de cicatrización. Debido a lo anterior, es importante determinar el efecto tóxico celular que cualquier material de obturación produce en el tejido con el que está en contacto, principalmente si es de reciente introducción al mercado, como el Resilon®; ya que se ha demostrado que mientras más inocuo sea el material de obturación, se producirán menos efectos citotóxicos adversos en el tejido periapical (Yaltirik M, et.al, 2003).

## MATERIALES Y METODOS

El tipo de investigación de este estudio es experimental puro *in vitro*. El objetivo general es evaluar la citotoxicidad de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® *in vitro* en las líneas celulares HEK-293, 3T3-J y en cultivos primarios de células humanas aisladas de ligamento periodontal.

Este estudio fue diseñado para evaluar la hipótesis de que la presencia de los materiales de obturación gutapercha o Resilon® en el medio de cultivo de las monocapas de células HEK-293, 3T3-J y de las células humanas de ligamento periodontal, producen un efecto citotóxico manifestado como la disminución en la viabilidad celular.

### Métodos

Se realizó la exodoncia de terceros molares erupcionados de 16 sujetos sanos, extraídos por razones no patológicas, con su debido consentimiento informado. Se confirmó la ausencia de caries mediante la revisión exhaustiva de las piezas dentales previo a la extracción. Las piezas se colocaron inmediatamente después de su extracción, en solución salina amortiguadora de Hank's modificada (NaCl 130 mM, KCl 2.9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.98 mM, Hepes 15 mM, NaHCO<sub>3</sub>, rojo de fenol 0.01%, pH 7.4, glucosa 1 mM) complementada con los antibióticos penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 2.5 µg/ml. Las piezas dentales se conservaron a 4°C durante un tiempo no mayor a 4 h hasta su procesamiento para el cultivo.

### Cultivos primarios de células humanas de ligamento periodontal

Los terceros molares extraídos de sujetos sanos se lavaron en 4 ocasiones con solución de Hank's modificada y complementada como se describió anteriormente. En condiciones de esterilidad proporcionadas por un gabinete de flujo laminar horizontal nivel de bioseguridad I, se colocaron las piezas dentales en una caja de petri de vidrio borosilicato estéril de 5 cm de diámetro, en 2.5 ml de solución de disgregación (SD: NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, Hepes 20 mM, pH 7.4, glucosa 10 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 1 µg/ml y dithreitol 0.4 mg/ml); se eliminaron los restos de encía y cuidadosamente con ayuda de un bisturí se raspó la parte apical del diente. El tejido de ligamento periodontal aislado se colocó en un tubo cónico y se centrifugó a 600 X g, 10 min. Enseguida el tejido se resuspendió en 2 ml de una solución de enzimas digestivas preparada en solución SD (SED: glucosa 10 mM, dithreitol 0.4 mg/ml, albúmina sérica bovina 2 mg/ml, colagenasa F 0.2 mg/ml, papaína 2.5 mg/ml) y 2 ml de tripsina-EDTA (0.125%-0.5 mM). La suspensión celular se incubó a 37° C durante 4 h o toda la noche a 4° C con agitación constante y la disgregación celular se facilitó con ayuda de un agitador vortex. El tejido se centrifugó a 750 X g, 10 min. y las células disgregadas a partir de tejido periodontal se resuspendieron en 4 ml de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta concentración

de glucosa (25 mM) complementado con suero bovino fetal al 15% (SBF), L-glutamina 2 mM, Hepes 15 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina 0.25 mg/ml. 1 ml de la suspensión celular se sembró en 4 frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y los cultivos se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de humedad de 5 a 15 días o hasta observar monocapas de fibroblastos. Después de las primeras 24 h de incubación, los cultivos se revisaron bajo un microscopio de contraste de fases a 20X (Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) para descartar la presencia de contaminación bacteriana o de hongos, y para evaluar el desarrollo de las células en cultivo. Después de 5 días de incubación, los explantes de tejido no disgregado se retiraron de los cultivos para permitir la formación adecuada de la monocapa de células periodontales. En el 7° día de cultivo se retiró la mitad del medio de cultivo con el que se sembraron inicialmente las células y se agregó medio DMEM fresco y complementado como se describió con anterioridad. Los subcultivos de los fibroblastos de ligamento periodontal se realizaron a partir de monocapas confluentes de 21-30 días y el medio de cultivo se modificó a una mezcla 1:1 de DMEM-Ham F12 complementado como se ha descrito, con la finalidad de mejorar las condiciones de crecimiento celular (Freshney RI, 1987).

### **Preparación de las multiplacas para los experimentos de citotoxicidad**

Los conos de gutapercha o Resilon® del N° 35 se cortaron en pequeños fragmentos no mayores a 1 mm. (Pascon EA y Spangberg LSW, 1990; Das S, 1981; Willershausen B et al., 2000). Para establecer las condiciones experimentales, se pesaron en una balanza analítica 0.1, 1 y 10 mg de cada material por triplicado y se colocaron en cada pozo de 0.32 cm<sup>2</sup> de superficie cultivable en multiplacas de 96 pozos. Las multiplacas con ambos materiales se esterilizaron en un gabinete de flujo laminar (Nuair Inc., Plymouth, Minnesota) con luz ultravioleta (254 nm) durante al menos 12 h.

### **Cultivo de las líneas celulares**

Las células HEK-293 y 3T3-J fueron obtenidas a partir de la resiembra oficial # 56 y 120 respectivamente y las células humanas aisladas de ligamento periodontal se utilizaron para los experimentos a partir de la resiembra # 3. Las células se cultivaron en medio DMEM o en la mezcla 1:1 de medios de cultivo DMEM-Ham F12 complementados con 10% (v/v) de suero con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de Hepes, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, pH 7.4, incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> al 95% de humedad. Los subcultivos se realizaron a partir de monocapas confluentes utilizando tripsina-EDTA (0.125% v/v c.f. 0.5 mM), enseguida se sembraron en multiplacas de 96 pozos durante 12, 24, 72 y 162 h, en presencia o ausencia (control) de gutapercha o Resilon® en un intervalo de 0 a 10 mg de cada material en 0.32 cm<sup>2</sup> de área cultivable; o en frascos de 75 cm<sup>2</sup> para continuar la línea celular. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 72 h (Freshney RI, 1987).

## **Ensayos de citotoxicidad**

Los experimentos se realizaron en dos ocasiones para cada línea celular así como para los cultivos primarios; por triplicado para las células 3T3-J y HEK-293, y por duplicado para las células de ligamento periodontal.

El efecto de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® en la viabilidad de las células en cultivo se evaluó utilizando el ensayo de MTT en monocapas de células sembradas a una densidad de  $10^5$  células/0.32 cm<sup>2</sup>. Durante el experimento, se agregaron 10 µl de reactivo de MTT a cada pozo de la multiplaca y las células se incubaron a 37°C durante 4 h. Enseguida se añadieron 100 µl de una solución de dodecil sulfato de sodio (detergente SDS, TREVIGEN®) a cada pozo para disolver el precipitado púrpura insoluble.

Las multiplacas se incubaron durante 4h a 25°C, en la oscuridad. En este método, las células metabólicamente activas ó viables reducen la sal de tetrazolio MTT al producto formazán cuantificable espectrofotométricamente a 570 nm, y la absorbancia a esta longitud de onda es directamente proporcional a la viabilidad celular. (van de Loosdrecht et al., 1994).

De los resultados obtenidos, se calcularon las medidas de tendencia central y de dispersión. A partir de estos datos, se elaboraron gráficas de exposición de gutapercha o Resilon® (mg/0.32 cm<sup>2</sup>) vs. viabilidad celular con los resultados de los experimentos utilizando el programa EXCEL ver. 3.1, 2003.

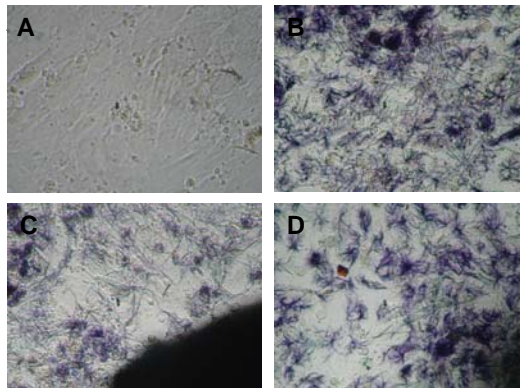
Los resultados obtenidos se analizaron con las pruebas estadísticas ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnet para determinar las posibles diferencias de los datos con respecto al control y se aplicó la prueba de t de Student para determinar las diferencias entre los tratamientos, utilizando el programa estadístico JMPIN ver. 4.0.1. (Copyright© 1989-2000; SAS Institute Inc. Cary. NC. USA.) Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una  $P < 0.05$ . Los datos se expresaron como la medida aritmética  $\pm$  el error estándar.

## RESULTADOS

Se obtuvieron cultivos celulares primarios viables de células humanas aisladas de ligamento periodontal, así como de las líneas celulares de fibroblastos 3T3-J y células HEK-293. Los resultados demostraron que existe un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la citotoxicidad celular de las células estudiadas en condiciones *in vitro* en respuesta al incremento en la exposición de los materiales gutapercha y Resilon® a partir de  $1 \text{ mg}/0.32 \text{ cm}^2$ , así como en respuesta al tiempo de incubación a las 72 h. El efecto tóxico sobre la viabilidad celular observada en los tres modelos de células en cultivo estudiadas fue similar ante el estímulo de estos materiales de obturación.

### Cultivo de células humanas de ligamento periodontal

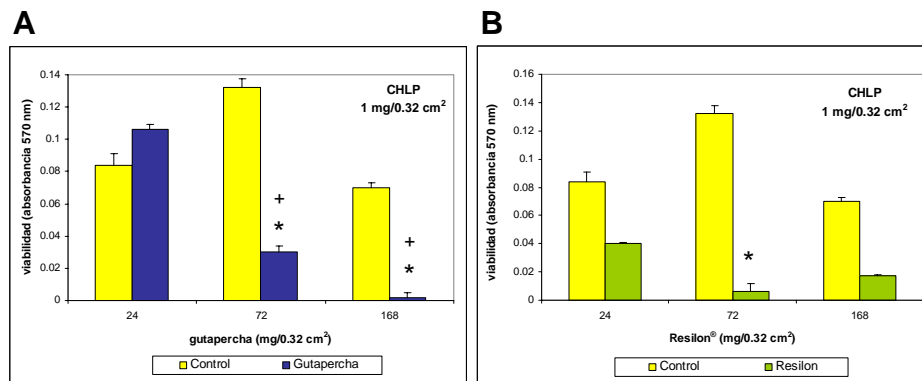
La disminución de la viabilidad se evaluó con el ensayo de reducción de MTT. Las células control sembradas en los pozos se observan en la Figura 1A después de 24 h; la incubación de las células durante 4 h con el reactivo MTT produce un precipitado púrpura intracelular visible al microscopio de contraste de fases, como se muestra en la Figura 1B, el desarrollo de color es proporcional a la viabilidad celular. Las Figuras 1C y 1D, muestran las células incubadas con gutapercha o Resilon® a  $1 \text{ mg}/0.32 \text{ cm}^2$  respectivamente, durante 24 h. La disminución en la formación del precipitado púrpura en estas condiciones se observó claramente.



**Figura 1.** Efecto citotóxico de gutapercha y Resilon® en las células humanas de ligamento periodontal. Las células se incubaron durante 24 h en ausencia (A,B) y en presencia de gutapercha (C) o Resilon® (D) a  $1 \text{ mg}/0.32 \text{ cm}^2$ . La reducción del MTT al precipitado formazán de color púrpura por las células viables, se evaluó en condiciones control (B) y en presencia de los materiales de obturación (C,D) a 570 nm y en microscopía de contraste de fases (40X).

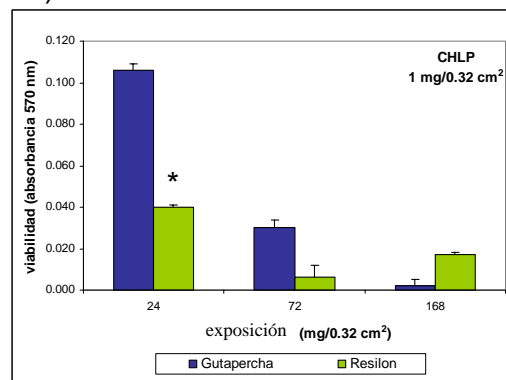
Para evaluar el efecto del tiempo de incubación en las células humanas de ligamento periodontal en presencia o ausencia de gutapercha o Resilon® en el medio de incubación, las monocapas se incubaron con  $1 \text{ mg}/0.32 \text{ cm}^2$  de cada material durante 24, 72 y 168 h, y posteriormente se cuantificó la viabilidad celular con el ensayo MTT a 570 nm. En las células expuestas a gutapercha (Fig. 2A) se observó una disminución en la viabilidad dependiente del tiempo a partir de las 72 h de incubación al compararse con el control. ( $0.106 \pm 0.003$  vs.

0.084 ± 0.007 UA, 0.030 ± 0.004 vs. 0.132 ± 0.006 UA, 0.002 ± 0.003 vs. 0.070 ± 0.003 UA; 24, 72 y 168 h respectivamente; P<0.05). Por otra parte, en las células expuestas a Resilon® (Fig. 2B), la viabilidad celular disminuyó de manera significativa únicamente a las 72 h con respecto al control, y no de la misma manera cuando se analizaron los tres tiempos evaluados en presencia de Resilon® (0.040 ± 0.001, 0.006 ± 0.006, 0.017 ± 0.001); 24, 72 y 168 h respectivamente; P>0.05).



**Figura 2.** Efecto de la gutapercha y Resilon® en la viabilidad de las células humanas de ligamento periodontal dependiente del tiempo. Las monocapas de células se incubaron a 24, 72 y 168 h en presencia y ausencia (control) de los compuestos a 1 mg/0.32 cm². La disminución en la viabilidad se cuantificó con el ensayo MTT a 570 nm. Los resultados se expresan como la media aritmética de absorbancia ± error estándar (e.e) de 2 experimentos independientes por duplicado. \* P<0.05, 24, 72 y 168 h vs control; + P<0.05, 24 vs. 72 y 168, 72 vs 168 h.

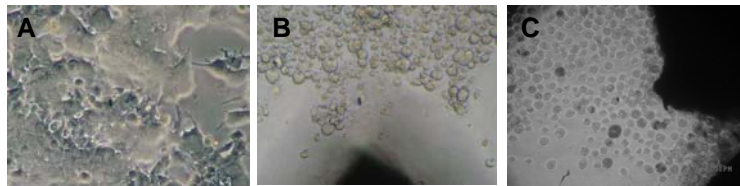
Cuando se comparó el efecto citotóxico producido por gutapercha y Resilon® sobre las células humanas del ligamento periodontal en cultivo a 1 mg/0.32 cm² de exposición, y a tiempos de incubación de 24, 72 y 168 h, se observó (Fig. 3) que a las 24 h existen diferencias significativas entre ambos materiales, (0.106 ± 0.003, 0.040 ± 0.001 vs 0.084 ± 0.007 UA; gutapercha y Resilon® vs control; P<0.05); sin embargo a las 72 y 168 h no se observó diferencia significativa entre ambos materiales (0.030 ± 0.004 vs 0.006 ± 0.006, 0.002 ± 0.003 vs 0.017 ± 0.001 UA, gutapercha vs Resilon®, 72 y 168 h respectivamente; P>0.05).



**Figura 3.** Efecto de la exposición de la gutapercha y el Resilon® en la viabilidad de las células humanas de ligamento periodontal. La disminución en la viabilidad se cuantificó con el ensayo MTT a 570 nm. Los resultados se expresan como la media aritmética de la absorbancia a 570 nm ± error estándar (e.e) de 2 experimentos independientes por duplicado. \* P<0.05, gutapercha vs Resilon®.

## Cultivo de células humanas HEK-293

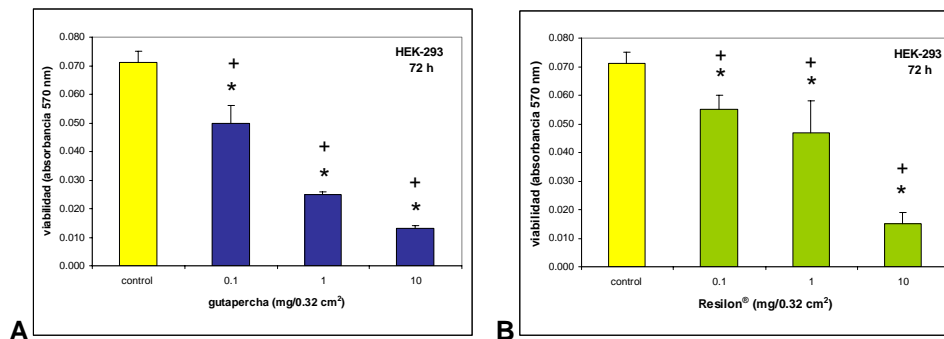
En la Figura 4 se muestra el efecto de gutapercha y Resilon® sobre células HEK-293 cultivadas durante 72 h en pozos de 0.32 cm<sup>2</sup> en ausencia (Fig. 4A) o en presencia de gutapercha (Fig. 4B) y Resilon® (Fig. 4C) a 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>. La Figura 4B, muestra como la presencia de gutapercha modificó el fenotipo de las células HEK-293 comparadas con las células control (Fig. 4A), cuando se evaluaron bajo el microscopio de contraste de fases 40X. Las células normalmente estrelladas cambiaron su estructura y se observan redondeadas y además éstas no proliferaron en la periferia del material. Cuando las células se incubaron en presencia de Resilon® (Fig. 4C), el efecto fue muy similar, las células no formaron una monocapa confluyente y por el contrario se observaron redondeadas y dispersas.



**Figura 4.** Efecto citotóxico de gutapercha y Resilon® en las células de riñón de embrión humano de tipo fibroblasto HEK-293. Las células se incubaron durante 72 h en ausencia (A) y en presencia de gutapercha (B) o Resilon® (C) a 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>. El efecto tóxico se evaluó por microscopía de contraste de fases (40X).

Para evaluar el efecto en las células HEK-293 en presencia o ausencia (control) de gutapercha o Resilon®, las monocapas se incubaron en un intervalo de exposiciones de 0 a 10 mg/0.32 cm<sup>2</sup> de área cultivable durante 12, 24, 72 y 168 h y posteriormente se cuantificó la viabilidad celular con el ensayo de MTT.

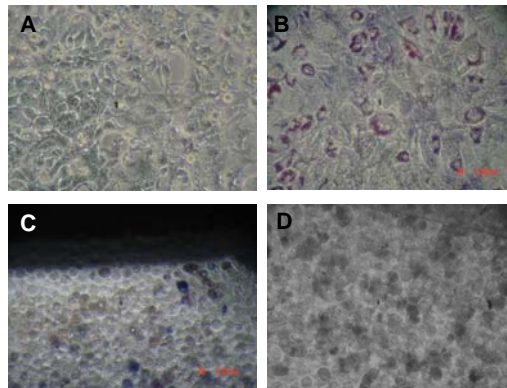
El comportamiento de estas células ante los materiales de obturación fue muy similar a los obtenidos en las células humanas de ligamento periodontal. En la Figura 5A y 5B se observa como después de 72 h de incubación, el efecto citotóxico del material (gutapercha y Resilon®, respectivamente) fue dependiente de la exposición al material.



**Figura 5.** Efecto de la exposición de la gutapercha (A) y Resilon (B) en la viabilidad de las células HEK-293. La disminución en la viabilidad se cuantificó con el ensayo MTT a 570 nm. Los resultados se expresan como la media aritmética de la absorbancia a 570 nm  $\pm$  error estándar (e.e) de 2 experimentos independientes por triplicado. \*  $P < 0.05$ , gutapercha/Resilon vs. control; +  $P < 0.05$ , 0.1 vs. 1 y 10; 10 vs. 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup> (B).

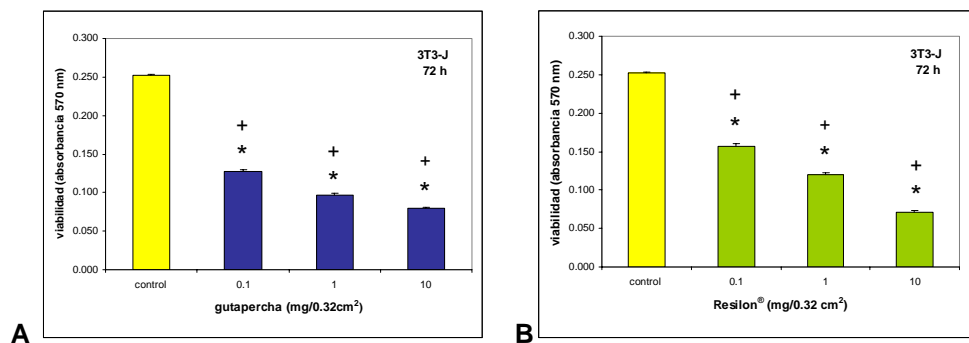
## Cultivo celular de fibroblastos de ratón 3T3-J

La reducción del MTT al precipitado color púrpura se evaluó en las células control (Fig. 7B) durante 4h, así como en presencia de gutapercha (Fig. 7C) y Resilon® (Fig. 7D). La presencia de los materiales de obturación disminuye microscópicamente la formación de formazán (púrpura), la cual es directamente proporcional a la viabilidad celular; por otra parte las células incubadas con estos materiales modificaron su morfología observándose más redondeadas



**Figura 7.** Efecto citotóxico de gutapercha y Resilon® en los fibroblastos de ratón 3T3-J. Las células se incubaron durante 24 h en ausencia (A,B) y en presencia de gutapercha (C) o Resilon® (D) a 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>. La reducción del MTT al precipitado formazán de color púrpura por las células viables, se evaluó en condiciones control (B) y en presencia de los materiales de obturación (C,D) a 570 nm y en microscopía de contraste de fases (40X).

El efecto citotóxico de la gutapercha y Resilon® presente en el medio de cultivo de las células 3T3-J se determinó de 0.1 a 10 mg/0.32 cm<sup>2</sup>, durante 12, 24, 72 y 168 h cuantificado como la disminución de la viabilidad celular con el ensayo de MTT. El comportamiento de estas células ante los materiales de obturación fue muy similar a los obtenidos en las células HEK-293. En la Figura 8A y 8B se observa como después de 72 h de incubación, el efecto citotóxico del material (gutapercha y Resilon, respectivamente) fue dependiente de la exposición al material.



**Figura 8.** Efecto de la exposición de gutapercha o Resilon en la viabilidad de las células 3T3-J. La disminución en la viabilidad se cuantificó con el ensayo MTT a 570 nm. Los resultados se expresan como la media aritmética de absorbancia  $\pm$  error estándar (e.e) de 2 experimentos independientes por triplicado. \*P<0.05 gutapercha vs. control; + P<0.05, 0.1 vs. 1 y 10; 10 vs. 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>.

## DISCUSION

Las líneas celulares utilizadas en este estudio, proporcionaron resultados consistentes. Las células 3T3-J de fibroblasto de ratón, ya habían sido reportadas en la literatura como un modelo *in vitro* para ensayos de citotoxicidad de materiales odontológicos (Ratanasathien S et al., 1995; Bouillaguet S, et al., 1996) al igual que los fibroblastos de ligamento periodontal (Al-Nazhan S y Spangberg L, 1990; Hanks CT et al., 1981; Keiser K et al., 2000; Kinomoto Y et al., 2001; Al-Shaher A et al., 2004). Por otra parte, las células de riñón de embrión humano HEK-293 no se han reportado en la literatura como un modelo para estudios con materiales odontológicos, sin embargo son comúnmente utilizadas para la expresión de proteínas en sistemas *in vitro* y para el estudio de mecanismos intracelulares de señalización (Zheng XH, 2003). En un estudio previo realizado en el laboratorio, se analizó la citotoxicidad del irrigante clorhexidina 2% como gel acuoso utilizando células de ligamento periodontal y células HEK-293; los resultados demostraron que las células HEK-293 fueron más resistentes a desarrollar daño celular comparadas con las células de ligamento periodontal (Truque, 2004).

El efecto citotóxico de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® estudiados en este trabajo, fue evaluado en función de la disminución de la viabilidad de las células en cultivo de riñón de embrión humano de tipo fibroblasto HEK-293, de los fibroblastos de ratón 3T3-J y de los cultivos primarios de células humanas aisladas de ligamento periodontal (CHLP).

De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos materiales de obturación producen alteraciones en la viabilidad de las células utilizadas como modelo *in vitro* de manera dependiente de la exposición y del tiempo de exposición, pero en diferente medida. De esta manera, la presencia de los compuestos disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) la viabilidad celular a partir de las 72 h de incubación en todas las condiciones (0.1, 1, 10 mg/0.32 cm<sup>2</sup>) utilizadas, para las líneas celulares HEK-293 y 3T3.

La gutapercha, un material de obturación por excelencia ha demostrado tener las propiedades de biocompatibilidad adecuadas para su uso en la endodoncia *in vivo*; sin embargo, diversos estudios han demostrado que este material produce cierto efecto tóxico en modelos de cultivos celulares *in vitro* (Munaco FS, 1978; Das S, 1981; Pascon EA y Spangberg LS, 1990; Willershausen B, 2000; Szep S, 2003). En este estudio se demostró que la gutapercha produce una disminución en la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la exposición al igual que en el estudio de Munaco FS (1978) y de Pascon EA y Spangberg LS (1990) donde se observó un aumento en la citotoxicidad con respecto al tiempo.

Por otra parte, el Resilon®, un nuevo material de obturación de reciente introducción en el mercado endodóntico como una alternativa a los materiales

existentes, demostró producir citotoxicidad en los tres modelos de células en cultivo de tipo fibroblasto *in vitro*, de manera dependiente del tiempo y de la concentración; estos hallazgos no habían sido reportados previamente en la literatura, a pesar de su uso comercial. Sin embargo, el efecto tóxico observado en presencia de Resilon® al ser comparado bajo las mismas circunstancias con la gutapercha, demostró ser menor.

En los cultivos de células HEK-293, la exposición a Resilon® y gutapercha no generó diferencias significativas en la viabilidad celular durante las primeras 24 horas, sin embargo a partir de las 72 horas estas diferencias fueron evidentes y se mantuvieron hasta las 168 h de incubación; siendo más citotóxica la gutapercha para estas células comparada con el Resilon® a las mismas condiciones. Una explicación para este comportamiento puede atribuirse en parte al efecto tóxico de la gutapercha, ya que la composición química del material comercial, tiene un alto contenido de óxido de zinc, el cual ya se ha demostrado pueden producir daño celular a altas concentraciones (Moorer WR y Genet JM, 1982; Pascon EA y Spangberg LS, 1990; Podbielski A et al., 2000). Es posible que en el transcurso del tiempo, este material de obturación aumente su disolución en medio acuoso dejando libres a estos y otros componentes que incrementen la toxicidad de la gutapercha en el cultivo celular y modifique o inhiban mecanismos intracelulares relacionados con la proliferación celular o activen señales de muerte celular.

En las células 3T3-J al igual que en las células HEK-293, la diferencia significativa entre la citotoxicidad observada con gutapercha y Resilon® se presentó hasta las 72 h. De manera similar, la gutapercha fue más citotóxica que el Resilon®; sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió en las células HEK-293, donde la gutapercha a la máxima exposición (10 mg/0.32 cm<sup>2</sup>) y 168 h de incubación eliminó por completo la totalidad de estas células; en las células 3T3-J este efecto no fue tan marcado. Estos hallazgos pueden atribuirse a que las células HEK-293 al ser derivadas de embrión no expresen en su totalidad algunos mecanismos de adaptación o madurez, comparadas con las células 3T3-J que son derivadas de un organismo adulto, lo cual les confieran mayor resistencia.

Los estudios de citotoxicidad de la gutapercha en cultivos celulares no concuerdan en su totalidad, pero estas diferencias pueden atribuirse a la variedad de metodologías utilizadas, a la preparación del material así como al modelo de cultivo celular. En este estudio, se utilizaron tres líneas de células de diferente especie pero con características de fibroblastos; la finalidad de lo anterior fue establecer si existían diferencias en el origen de las células y la respuesta de las mismas a la presencia de los materiales de obturación así como las posibles diferencias de susceptibilidad a los mismos.

En este trabajo se observó que la citotoxicidad de la gutapercha y el Resilon® es dependiente del tiempo y que durante periodos de incubación cortos

(12 y 24 h, 1 mg/0.32 cm<sup>2</sup>) la viabilidad celular no se modifica. Lo anterior se explica debido a que el efecto tóxico de los materiales es leve y puede ser superado por la proliferación celular, incluso alguno de los componentes de la formulación de estos pudiera actuar en un principio y a baja concentración como un estímulo para la proliferación celular.

Como se describió en los *Resultados*, los materiales de obturación gutapercha y Resilon® produjeron citotoxicidad en los cultivos primarios de células humanas aisladas ligamento periodontal, de manera dependiente del tiempo a partir de las 72 h de incubación en presencia de los materiales. Además, estos resultados indicaron que el efecto tóxico de Resilon® es mayor comparado con el de gutapercha en las mismas condiciones en las primeras 24 h de incubación pero no a tiempos mayores, en los que la respuesta fue similar para ambos compuestos.

En estudios *in vitro* realizados con materiales de obturación se ha observado que la presencia de cementos a base de resinas y metacrilato en cultivos celulares (Miletic I et al., 2005; Willershausen B et al., 2000; Gerosa R et al., 1995) y en condiciones *in vivo* en tejido conectivo subcutáneo de ratas (Zmener O, 2004) causan cierta citotoxicidad. De acuerdo a lo anterior, es probable que la citotoxicidad producida por el Resilon® en las células de ligamento periodontal sea debida en parte a la solubilización de algunos componentes presentes en el compuesto como 1) vidrio biológicamente activo, 2) relleno radioopaco y 3) principalmente la resina de metacrilato.

Después de 12 h, en las células 3T3-J así como en las células HEK-293 únicamente a la concentración máxima utilizada (10 mg/0.32cm<sup>2</sup>), se observó un cambio en la viabilidad celular. Las células HEK-293 expuestas a Resilon®, mostraron un cambio en la viabilidad significativo hasta las 168 h, lo que podría indicar que el Resilon® es menos citotóxico que la gutapercha en las mismas condiciones, tal vez por ser menos soluble en medio acuoso o porque sus componentes tardan más en disolverse.

Los estudios realizados con este nuevo material de obturación proporcionados por el fabricante (SybronEndo, Orange, CA; Pentron Clinical Technologies, LLC. Wallingford, CT) están enfocados a pruebas de biocompatibilidad inmunológica *in vivo* que determinaron que este material presenta un potencial alergénico débil (Lister L, 2002); y a la producción de mutaciones *in vitro* en los microorganismos *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* expuestos al material, lo que reveló la ausencia de cambios en los genes que codifican los aminoácidos histidina y triptofano respectivamente, demostrando que este material no es mutagénico (Li X, 2002).

A la fecha no se han publicado estudios acerca del efecto de Resilon® en la viabilidad celular, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación serán de gran utilidad para establecer con mayor detalle la biocompatibilidad de

este material de obturación. En este estudio se demostró que el efecto citotóxico de Resilon® disminuye la viabilidad de las células HEK-293 y 3T3-J a partir de las 72 h a las concentraciones utilizadas, como se describió en *Resultados*. Sin embargo, la magnitud del efecto tóxico evaluado como la disminución en la viabilidad en presencia de Resilon® es menor comparada con gutapercha.

## Conclusiones

1) La presencia de los materiales de obturación gutapercha y Resilon® en el medio de cultivo de las células HEK-293, 3T3-J, y en las células humanas aisladas de ligamento periodontal produce citotoxicidad dependiente del tiempo y de la exposición. Sin embargo las condiciones *in vitro* no reflejan lo que podría llegar a ocurrir *in vivo*, ya que el tejido en un organismo completo tiene la capacidad de regeneración frente a un agente tóxico, en cambio, en un cultivo celular en monocapa es posible que las células no tengan la misma capacidad que un tejido completo para activar mecanismos intracelulares específicos que ayuden a renovar las células dañadas o a incrementar la viabilidad celular.

2) La respuesta celular de los tres cultivos a la presencia de los materiales de obturación estudiados fue similar; sin embargo se observó una tendencia del Resilon® a ser menos citotóxico comparado con la gutapercha. No obstante, se necesitan estudios *in vitro* más específicos que permitan demostrar detalladamente los mecanismos celulares que participan en el daño tóxico observado en presencia de ambos materiales.

## Referencias

- **Al-Nazhan S, Spangberg L** (1990) Morphological cell changes due to chemical toxicity of dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 16 (3): 129-134.
- **Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D** (2004) Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod* 30 (5): 359-361.
- **Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J** (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 22 (5): 244-248.
- **Das S** (1981) Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 52 (1): 76-84.
- **Freshney RI** (1987) Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2a. edición. New York: Alan R Liss. Inc.: 25-134.
- **Gerosa R, Menegazzi G, Borin M, Cavalleri G** (1995) Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J Endod* 21 (9): 446-448.
- **Hanks CT, Anderson M, Craig RG** (1981) Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol* 10 (2): 101-112.
- **Keiser K, Johnson CC, Tipton DA** (2000) Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 26 (5): 288-291.
- **Kinomoto Y, Carnes DL, Ebisu S** (2001) Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *J Endod* 27 (9): 574-577.
- **Li X** (2002) Salmonella typhimurium and Escherichia coli reverse mutation assay – ISO. Final Report. Bedford (MA): Toxikon Corporation, Pentron Clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT. Report No.: 02-5111-G3.

- **Lister L** (2002) Kligman maximization test (17 animals) – ISO. Final Report. Bedford (MA): Toxikon Corporation. Pentron Clinical Technologies, LLC, Wallington, CT. Report No.: 02-5111-G2.
- **Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M** (2005) The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod* 31 (4): 307-309.
- **Moorer WR, Genet JM** (1982) Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to zinc oxide component. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53 (5): 508-517.
- **Moorer WR, Genet JM** (1982) Evidence for antibacterial activity of endodontic gutta-percha cones. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53 (5): 503-507.
- **Mounce R, Glassman G** (2004) Bonded endodontic obturation another quantum leap forward for endodontics. *Oral Health* (Revista en línea), July 2004. ([www.oralhealthjournal.com/issues/ISarticle.asp?id=152890&story\\_id=23669151352&issue=07012004&PC=](http://www.oralhealthjournal.com/issues/ISarticle.asp?id=152890&story_id=23669151352&issue=07012004&PC=))
- **Munaco FS, Miller WA, Everett MM** (1978) A study of long-term toxicity of endodontic materials with use of an in vitro model. *J Endod* 4 (5): 151-157.
- **Pascon EA, Spangberg LS** (1990) In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *J Endod* 16 (9): 429-433.
- **Podbielski A, Boeckh C, Haller B** (2000) Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized quantitative in vitro assay. *J Endod* 26 (7): 398-403.
- **Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB** (1995) Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74 (9): 1602-1606.
- **Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M** (2004) An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). *J Endod* 30 (5): 342-347.
- **Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M** (2005) Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 31 (2): 91-96.
- **Shipper G, Trope M** (2004) In vitro microbial leakage of endodontically treated teeth using new and standard obturation techniques. *J Endod* 30 (3): 154-158.
- **Szep S, Gruman L, Ronge K, Schriever A, Schultze M, Heidemann D** (2003) In vitro cytotoxicity of medicated and nonmedicated gutta-percha points in cultures of gingival fibroblasts. *J Endod* 29 (1): 36-40.
- **Teixeira FB, Teixeira EC, Thompson JY, Trope M** (2004) Fracture resistance of roots endodontically treated with a new resin filling material. *J Am Dent Assoc* 135 (5): 646-652. Erratum in: *J Am Dent Assoc* 135 (7): 868.
- **Truque P, Cerda BI, Abrego MC, Andrade LM, Galicia OG** (2004) Evaluación de viscosidad, pH y citotoxicidad de un gel hidrosoluble de clorhexidina. Investigación de Bioquímica. Maestría en Endodoncia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- **Van de Loosdrecht, AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Brockhoven MG, and Langenhuijsen MM** (1994) A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immuno Methods* 174 (1-2): 311-320.
- **Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R** (2000) Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod.* 26 (12): 703-707.
- **Yaltirik M, Kocak Berberoglu H, Koray M, Dulger O, Yildirim S, Aydil BA** (2003) Orbital pain and headache secondary to overfilling of a root canal. *J Endod* 29 (11): 771-772.
- **Zheng XH, Watts GS, Vaught S, Gandolfi AJ** (2003) Low-level arsenite induced gene expression in HEK293 cells. *Toxicology.* 1;187 (1):39-48.
- **Zmener O** (2004) Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 30 (5): 348-51.