

Control del calidad de sistemas adhesivos dentales en un modelo experimental "in vitro" de fibroblastos gingivales humanos

QUALITY CONTROL OF DENTAL ADHESIVE SYSTEM IN AN "IN VITRO" EXPERIMENTAL MODEL OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS

Ismael Ángel Rodríguez (1), Mario Anibal Rodríguez (1), Carlos Alfredo Rozas (2), Ana Celeste Ximenes Oliveira (4), Miguel Ángel Martín Priedra (4), Ingrid Garzón (4), Jorge Uribe Echevarría (3)

1) Cátedra de Histología "B". Facultad Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

2) Cátedra de Operatoria I "A". Facultad Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

3) Secretaría de Ciencia. Facultad Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

4) Departamento de Histología, Facultad de Odontología y Medicina, Universidad de Granada, España.

Resumen

En este trabajo se evaluó la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos en contacto con distintos sistemas adhesivos dentales mediante la utilización del método de cuantificación de LDH libre y de un análisis morfológico. Se utilizaron fibroblastos gingivales humanos cultivados en placas de 24 pocillos a una concentración de 20000 células/500 µl de medio de cultivo DMEM con 10% FBS y antibióticos. Los materiales evaluados fueron: Adper SE Plus (ADSE), Adper Single Bond (SB) y One Coat (OC). A las 24 horas se realizó la cuantificación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en un lector de placas ELX-800. Para el análisis morfológico las células adheridas en los pocillos fueron observadas con un microscopio óptico de luz invertida Nikon Japan Optifhot-2. Las células controles no recibieron tratamiento. Al evaluar LDH los valores fueron: ADSE 42,1%, SB 46,5%, OC 39,6%. A nivel morfológico las células en contacto con los distintos materiales usados en la experiencia mostraron alteraciones caracterizadas por células que toman formas esféricas y que presentan ruptura de sus membranas plasmáticas. En conclusión, los distintos sistemas adhesivos dentales utilizados generarían alteraciones irreversibles en la viabilidad celular de los fibroblastos gingivales humanos por la ruptura de sus membranas plasmáticas.

Palabras Clave: Citotoxicidad, Sistemas Adhesivos Dentales, Fibroblastos Gingivales Humanos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate human gingival fibroblast viability in contact with different dental adhesive systems by means of both free LDH quantification method and morphological analyses. Human gingival fibroblast grow to in 24 wells plates to 20.000cells/500ul concentration DMEM culture medium with 10% and antibiotics were used. Materials assessed were: Adper SE Plus (ADSE), Adper Single Bond (SB), One Coat (OC). After 24 hours deshidrogenasa lactate enzyme releasing quantification was performed. The analysis was carried out through ELX- 800 (Biotek) plates reader. For morphologic analysis cells adhered in the wells were observed by light microscopy Nikon Japan Optifhot-2. Control cells were not treated. When evaluating LDH, results were: ADSE 42,1%, SB 46,5%, OC 39,6%. At morphological level cells in contact to different experimental materials showed some alterations characterized by cells which become spherical and present plasmatic membrane disruption. These results allow us to conclude that different dental adhesive systems used do creat or possibility cellular viability irreversible alterations in human gingival fibroblast due to plasmatic membrane disruption.

Keywords: Citotoxicity, Dental Adhesive System, Human Gingival Fibroblast

1. Introducción

Los sistemas adhesivos dentales son materiales que se utilizan en la clínica odontológica ya que los mismo han mejorado

la adhesión de los materiales de obturación a las preparaciones cavitarias y específicamente a las estructuras dentarias como el esmalte, la dentina y el cemento, adhesión que antes sólo se obtenía utilizando diferentes

Correspondencia: Ismael Ángel Rodríguez

Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Avda. Haya de la Torre S/N, Ala Izquierda, Pabellón Argentina. 5000, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

Email: ismaelrodriguez18@hotmail.com

retenciones mecánicas(1). Pero el uso de los sistemas adhesivos dentales debe buscar no sólo el resultado clínico de las restauraciones, sino también la preservación del complejo dentino pulpar.

En este sentido Costa y Hebling (2) destacan que todavía son escasas las investigaciones desarrolladas en el área de la biología pulpar, y la literatura odontológica, actualmente, no ofrece datos significativos en cuanto a la compatibilidad biológica de los distintos materiales que se utilizan en la práctica clínica. Se ha demostrado que componentes de los sistemas adhesivos dentales como los monómeros resinosos HEMA (2-hidroxietilmetacrilato), BISGMA (bis-glicidil-metacrilato), TEGDMA (trietilenglicoldimetacrilato), y UDMA (uretan-dimetacrilato), son citotóxicos, al analizarlos por separado o bien en forma combinada, en dosis y tiempos diferentes sobre distintas líneas celulares (3, 4, 5, 6).

Existe por tanto hoy, la necesidad de continuar en el estudio de estos materiales con la finalidad de profundizar en el conocimiento de sus mecanismos de acción y así poder aportar al desarrollo de nuevos biomateriales que guarden mayor equilibrio entre sus propiedades físicas y biológicas.

En la actualidad distintos métodos están siendo utilizados para el control de calidad de los biomateriales utilizados en odontología, entre ellos destacan los modelos experimentales "in vitro" a través de los cuales se valora la viabilidad celular teniendo en cuenta criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos (5, 6).

En este trabajo nuestro objetivo ha sido analizar la toxicidad de distintos sistemas adhesivos dentales en un modelo experimental "in vitro" de fibroblastos gingivales humanos utilizando criterios morfológicos y bioquímicos.

2. Materiales y métodos

Cultivo celular y tratamiento.

Fibroblastos gingivales humanos fueron cultivados en un medio de cultivo DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos-antimicóticos

(100 U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomycin y 0.25 mg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. Las células luego fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a una concentración de 20000 células/500 μ l de medio de cultivo DMEM, con 10% SBF y antibióticos y se incubaron a 37° Celsius con un 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Cumplido este tiempo y obtenida la adhesión de las células a la base de cada uno de los pocillos, fueron lavados con PBS y recibieron 500 μ l de medio de cultivo DMEM (suplementado con glutamina) sin rojo fenol y en ausencia de antibióticos.

Los sistemas adhesivos Adper SE Plus (ADSE) (3M-ESPE, St Paul, MN, USA), Adper Single Bond (SB) (3M-ESPE, St Paul, MN, USA), One Coat (OC) (Coltène/Whaledent, Suiza) se manipularon según las indicaciones del fabricante y se colocaron dosis de 10 μ l sobre insertos de membrana Transwell (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) y se fotopolimerizaron con lámpara Coltolux LED (Coltène/Whaledent, Suiza) durante 20 segundos después de cada aplicación.

Para la realización de los ensayos experimentales se procedió a la colocación de los insertos, con los sistemas adhesivos ya fotopolimerizados, en cada pocillo. Para que los mismos tomarán contacto con los fibroblastos en la base de los pocillos se añadió 1500 μ l de medio. Las células sometidas a la acción de los distintos sistemas adhesivos fueron analizadas a las 24 horas. Como control positivo (100% citotóxico) se utilizó Control Tritón X al 2 % (Sigma-Aldrich) (CT) y como control negativo (no citotóxico) se utilizó medio de cultivo DMEM (CM).

Estudio de la citotoxicidad mediante la Cuantificación de LDH libre.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediante la liberación de la enzima citosólica Lactato Deshidrogenasa (LDH), utilizamos un Kit de la casa Roche Cat. No. 1 644 793. Para ello tomamos 100 μ l de sobrenadante de cada grupo experimental y le añadimos 100 μ l de la solución Kit en una placa de 96 pocillos. La medición de la enzima LDH liberada al medio, se realizó en un aparato lector de placas ELX – 800 (Biotek, Winooski, VT, USA)(6). Como controles realizamos mediciones de liberación de LDH, de fibroblastos cultivados con medio de

cultivo DMEM (CM) y de fibroblastos con solución de Tritón X-100 (2% en medio de cultivo DMEM) (CT).

Análisis Morfológico.

Con el objetivo de analizar las posibles alteraciones morfológicas de los fibroblastos gingivales humanos tras la exposición a los diferentes sistemas adhesivos dentales las células adheridas a la superficie de los pocillos fueron observadas con un microscopio óptico de luz invertida Nikon Japan Optifhot-2.

3. Resultados

Cuantificación de LDH libre.

Los resultados obtenidos muestran a las 24 horas de exponer los fibroblastos gingivales humanos a los distintos sistemas adhesivos dentales, un aumento de la liberación de LDH de ADSE: 42,1%, SB: 46,5%, OC: 39,6% con respecto a su control negativo (CM) (Figura 1).

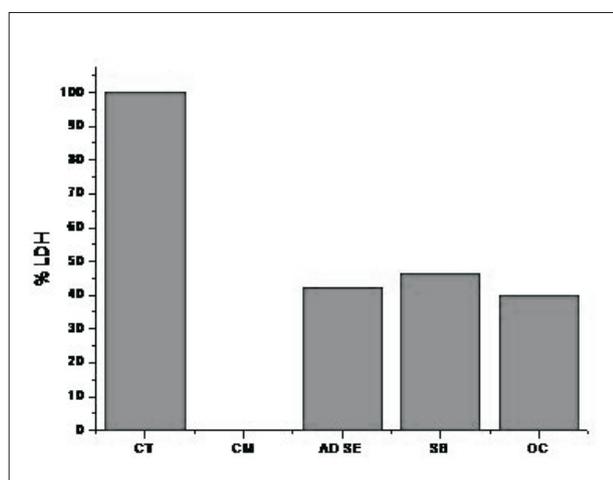


Figura 1. Se expresa el porcentaje de liberación de LDH de fibroblastos gingivales humanos a las 24 horas de expuestos a los sistemas adhesivos dentales, Adper SE Plus (ADSE), Adper Single Bond (SB), One Coat (OC), con respecto a su control negativo (CM) y positivo (CT).

Análisis morfológico.

Nuestros resultados permiten describir que los fibroblastos gingivales humanos pertenecientes al control negativo (CM) poseen una morfología ortotípica que se caracteriza como finas prolongaciones alargadas y en ocasiones ligeramente estrelladas (Figura 2a). Sin embargo cuando estas células toman contacto con los distintos sistemas adhesivos dentales, se observa un menor número de células con respecto a su control negativo (CM)

y alteraciones morfológicas que muestran a células con formas esféricas y con ruptura de sus membranas celulares en todos los casos evaluados (Figuras 2b, 2c, 2d) similar a lo que ocurre con el control positivo (Figura 2e).

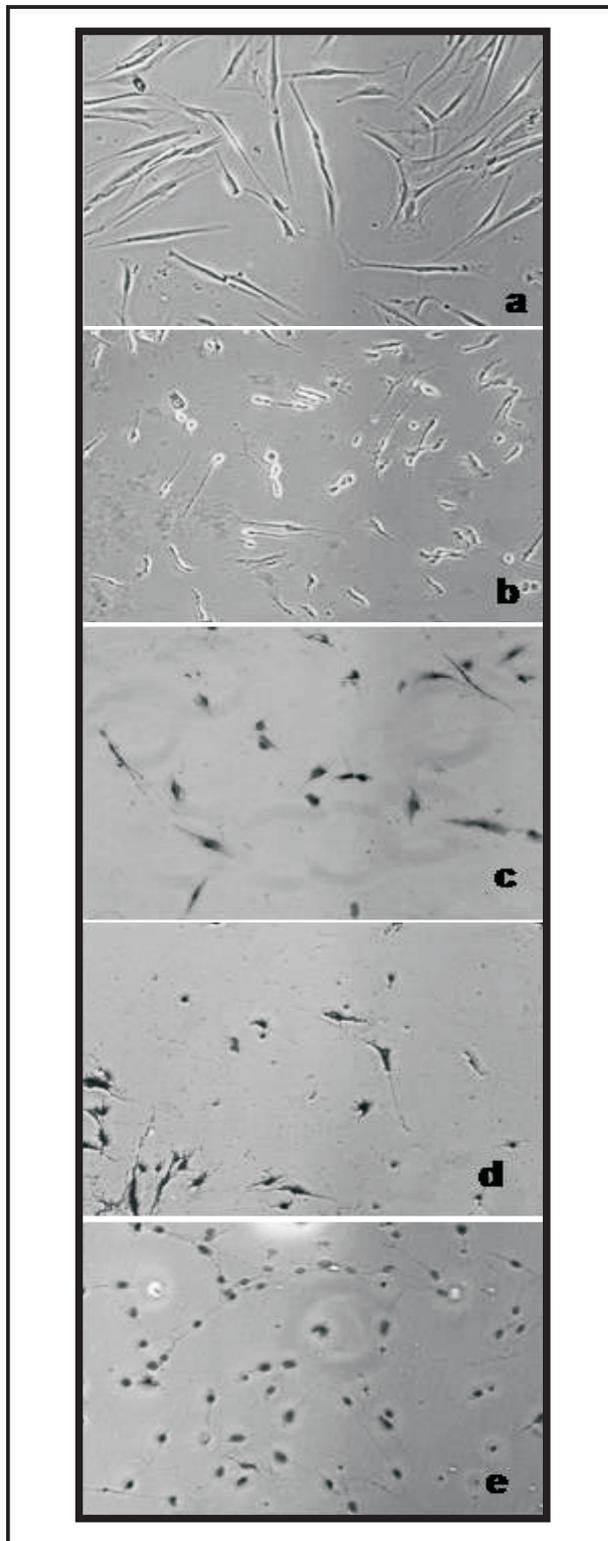


Figura 2. Se observa con microscopía óptica (10X) las características morfológicas de los fibroblastos gingivales humanos expuestos a los sistemas adhesivos dentales Adper SE Plus (2.b), Adper Single Bond (2.c), One Coat (2.d), durante 24 horas, y de los controles negativos (2.a) y positivos (2.e).

4. Discusión

Los resultados de nuestro trabajo han permitido corroborar, en un modelo experimental "in vitro" de fibroblastos gingivales humanos, que los sistemas adhesivos dentales provocan alteraciones morfológicas y bioquímicas sobre las mismas. Si bien los efectos citotóxicos "in vitro" no son extrapolables a la clínica (7, 8), Craig (9) informa que estos test iniciales son recomendados por ANSI/ADA para evaluar los efectos causados sobre los cultivos celulares por biomateriales experimentales.

Las líneas celulares que se han utilizado en estudios experimentales de citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales han sido de distinta naturaleza y origen, destacando entre ellos los fibroblastos de ratón 3T3 (3) las células odontoblastoides MDPC-23 (7), los monocitos-macrófagos humano THP-1 (4), las células de pulpa humana (10) y los fibroblastos humanos (11). En nuestro trabajo seleccionamos a los fibroblastos gingivales humanos porque constituyen un modelo experimental idóneo para evaluar citotoxicidad de distintos sistemas adhesivos dentales ya que permite, tal como lo ha demostrado Issa (12) y Rodríguez et al. (6), realizar determinaciones morfológicas y bioquímicas con un importante grado de fiabilidad. Uno de los indicadores para evaluar citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales en nuestro trabajo de investigación ha sido la liberación de LDH en el medio de cultivo. La Lactato Deshidrogenasa es una enzima citoplasmática estable que se almacena en células viables. Un aumento en los niveles de LDH en el medio de cultivo indica que la estabilidad de las membranas se ha visto se ha visto dañada posiblemente por alteraciones oxidativas (13). En nuestro trabajo observamos que la liberación de LDH a las 24 horas de expuestos los fibroblastos gingivales humanos a los distintos sistemas adhesivos dentales, mostraron una liberación de LDH entre el 39% y el 46% con respecto a su control negativo (CM). En este sentido, Rodríguez et al. (6) valoraron la liberación de LDH al medio de cultivo cuando fibroblastos gingivales humanos eran sometidos a la acción de HEMA y demostraron que existe una liberación progresiva de esta enzima que estaría vinculada significativamente al incremento en las concentraciones de HEMA. Los autores mostraron que al utilizar una concentración de 10 µl de HEMA en las primeras 24 horas se observaba una liberación de LDH que no superaba el 10%. En nuestro trabajo, si bien utilizamos la misma dosis, el mayor porcentaje de liberación de LDH a las 24 horas se fundamenta en que los sistemas adhesivos dentales están constituidos por una combinación de monómeros resinosos y

agentes ácidos que hacen que estos materiales posean un bajo pH. En este sentido Costa et al. (7) en estudios "in vitro" de citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales sobre células odontoblastoides MDPC-23, mostraron como estos materiales a las 2 horas generan mayores niveles de citotoxicidad en estado fluido que cuando están polimerizados. Los autores destacan que la responsabilidad de los efectos citotóxicos tempranos se deben a los agentes ácidos incorporados en estos materiales y que dicha acidez disminuye cuando estos productos son polimerizados.

Cuando analizamos las alteraciones morfológicas mediante la microscopía óptica observamos que en las células expuestas a los distintos sistemas adhesivos dentales se producían alteraciones que se caracterizaban por una disminución en el número como así también en sus formas ya que las mismas tomaban formas esféricas. Por otra parte, Costa et al.(7) describen mediante la microscopía electrónica de barrido en células odontoblastoides expuestas durante 2 horas a distintos sistemas adhesivos dentales, una disminución del número de células que quedan adheridas al soporte y de alteraciones morfológicas que se caracterizan por mostrar células con formas esféricas y con una pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas de las mismas.

Los resultados de nuestro trabajo corroboran el efecto citotóxico de los sistemas adhesivos dentales, que es generado tanto por sus componentes ácidos y no ácidos, y contribuyen a seguir advirtiendo sobre las limitaciones biológicas que significa utilizar estos materiales en zonas como la pulpa expuesta o en cavidades profundas con alta permeabilidad. Además se expone un modelo "in vitro" de valoración de viabilidad celular que profundiza en el conocimiento de los mecanismos de acción de estos biomateriales y contribuye al control de calidad de los mismos.

Referencias

1. Van Merbeck B. Enamel and Dentin Adhesion. In: Summitt JB, Robins WJ, Schwartz RS, 2th eds. *Fundamentals of Operative Dentistry: A contemporary approach*. Chicago. Quintessence 2001; 8: 178-235.
2. Costa CAS, Hebling J. Biología del Complejo Dentino Pulpar en relación a su protección mediante adhesivos. En: Gilberto Henostroza H Editor. *Adhesión en Odontología*. Editora MAIO 2003; 7: 163-193.
3. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995;

74:1602-1606.

4. Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer JM. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 2000; 16:213-217.

5. Rodriguez IA, Fernandez-Segura E, Ceballos G, Arrebola F, Sanchez-Quevedo MC, Campos A. Hybrid cell death induced by exposure to 2-Hydroxyethyl- methacrylate (HEMA): An ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent* 2008; 10(2): 105-111.

6. Rodriguez IA, Gonzalez López G, Rodriguez MA, Campos Sanchez F, Alaminos M. Biological evaluation of the 2-Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblast. *J Adhes Dent* 2011; 13: (pre-print).

7. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999; 15:434-441.

8. Costa CA. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000; 13:81-87.

9. Craig RG. *Restorative Dental Materials*. 10 Edition, C V Mosby, St. Louis 1997; 137-171.

10. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 2004; 83:703-704.

11. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, Awedimento EV, Rengo S. NF- B protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 2004; 83:837-842.

12. Issa Y, Watts DC, Bruton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro. *Dent Mater* 2004; 20:12-20.

13. Yildiz D, Llu YS, Ercal N, Armstrong DW. Comparison of pure nicotine – and smokeless tobacco extract–induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 37:434–439.