

Comparación del efecto citotóxico de tres agentes quelantes sobre fibroblasto del ligamento periodontal humano. Estudio *in vitro*

Comparison of the cytotoxic effect of three chelating agents on human periodontal ligament fibroblast. *In vitro* study

Edwin De la Cruz Rocha¹, Luisa Paola Figueredo², Johana Gómez³,
Idalith Jiménez³, Ilinka Montes³, Sergio Roca³, Gabriela Vergel³

Resumen

Objetivo: Comparar *in vitro* el efecto citotóxico de tres agentes quelantes sobre fibroblastos del ligamento periodontal humano.

Materiales y métodos: Se utilizaron cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal humano, los cuales fueron colocados en contacto con los agentes quelantes a evaluar (RC-Prep, Glyde, EDTA al 17%) a intervalos de 15, 30 y 60 minutos. Se midió la absorbancia para cada uno de los grupos, para determinar el grado de actividad enzimática, que es indicador de muerte celular. Previo a la cuantificación de la absorbancia se corroboró microscópicamente la formación de los cristales de formazán, los cuales se forman alrededor de los fibroblastos, y su presencia es indicador de integridad de la membrana y de la actividad metabólica. Por microscopia se verificó la formación de cristales de formazan, después de agregar azul de tripán.

Resultados: El Glyde mostró mayor grado de citotoxicidad, con una diferencia estadísticamente significativa, al compararlo con EDTA 17% y el RC-PREP. El EDTA presentó mayor citotoxicidad que el RC-PREP a los 15 minutos, evento que cambió a los 30 y 60 minutos.

Conclusiones: Los agentes quelantes RC-Prep, Glyde y EDTA tienen un efecto citotóxico a nivel de los fibroblastos del ligamento periodontal, siendo el EDTA el de menor efecto citotóxico a los 30 y 60 minutos comparado con RC-Prep y Glyde

Palabras clave: Agentes quelantes, fibroblastos, citotoxicidad, ligamento periodontal, MTT.

Fecha de recepción: 11 de junio de 2012
Fecha de aceptación: 26 de agosto de 2012

¹ Odontólogo endodoncista, Coordinador Posgrado de Endodoncia Fundación Universitaria San Martín, Barranquilla (Colombia)

² Ingeniera Biotecnóloga, coordinadora laboratorio ciencias básicas básicas. Universidad San Martín, Barranquilla (Colombia)

³ Odontólogo endodoncista, Universidad San Martín, Barranquilla (Colombia).

Correspondencia: Edwin De la Cruz Rocha, Fundación Universitaria San Martín, Km 8, vía Puerto Colombia, Barranquilla. edwincrr@hotmail.com

Abstract

Objectives: To compare in vitro, the cytotoxic effect of three chelating agents on human periodontal ligament fibroblasts, RC-Prep, Glyde and EDTA.

Methods: Fibroblast cultures of human periodontal ligament were used, which are placed in contact with chelating agents to evaluate (RC-Prep, Glyde, 17% EDTA) at time intervals of 15,30 and 60 minutes. Absorbance was measured for each group to determine the degree of enzyme activity, which is an indicator of cell death. Prior to the measurement of absorbance was confirmed microscopically, the formation of formazan crystals, which are formed around fibroblasts, and its presence is an indicator of membrane integrity and metabolic activity. Microscopy verified the formation of formazan crystals, after adding trypan blue.

Results: Glyde showed greater cytotoxicity with a statistically significant difference when compared with 17% EDTA and RC-PREPchelants. The EDTA showed higher cytotoxicity than the RC-PREP to 15min, and that event changed at 30 and 60 minutes.

Conclusion: It was shown experimentally that the chelating agents RC-Prep, EDTA and Glyde have a cytotoxic effect at the periodontal ligament fibroblasts. EDTA has a lowest cytotoxic effect at 30 and 60 minutes compared to RC-Prep and Glyde.

Keywords: Chelating agents, fibroblasts, cytotoxicity, periodontal ligament, MTT.

INTRODUCCIÓN

Los materiales usados en endodoncia frecuentemente son colocados en contacto íntimo con el tejido duro y blando del periodonto. Esto es particularmente cierto para las sustancias usadas como material de preparación, desinfección e irrigación de conductos y cementos selladores. Por lo tanto, es esencial que un material sea biocompatible con los tejidos circundantes (1).

Dentro de estos materiales se encuentran los quelantes, sustancias que juegan un papel importante en el debridamiento de conductos, ya que cumplen la función de facilitar la preparación biomecánica, al desintegrar tanto el barrillo dentinal (*smear-layer*) como el componente calcificado y mineralizado de las paredes dentinales. (2,3).

Los agentes quelantes son moléculas que se basan en el ácido etilen-diamino tetracético (EDTA) (4). El mejoramiento de las materiales dentales le ha permitido al ácido

etilendiaminotetracético ser combinado con sustancias como el peróxido de hidrógeno, el cual confiere actividad efervescente al ser mezclado con el hipoclorito de sodio, lo cual facilita la eliminación de detritus remanentes de la instrumentación (4-6).

La sustancia quelante reacciona con los iones metálicos en los cristales de hidroxapatita, para producir un quelato metálico, el cual reacciona con las terminaciones del agente quelante al remover los iones de calcio de la dentina, formando un anillo, la dentina se reblandece, cambiando las características de solubilidad y permeabilidad del tejido, especialmente la dentina peritubular, rica en hidroxapatita, incrementando el diámetro de los túbulos dentinales expuestos. El quelante también tiene una gran afinidad por los álcalis ferrosos de la estructura dental (7,8).

Un material quelante adecuado debe poseer diversas propiedades, entre las cuales se destaca el ser solvente de tejidos y detritus,

tener baja toxicidad, baja tensión superficial y un mecanismo de dosificación simple.

Durante la instrumentación y conformación del conducto radicular, el uso de agentes quelantes es constante, entrando en contacto con el ligamento periodontal, que es un tejido conectivo blando, muy vascularizado, innervado y con alto contenido celular.

Los agentes quelantes como sustancias coadyuvantes en el tratamiento endodóntico son de amplia comercialización; se encuentra el EDTA en solución acuosa al 17%, RC-Prep y Glyde. Sin embargo, una revisión de la literatura científica acerca de los posibles efectos citotóxicos de estos a nivel de los fibroblastos del ligamento periodontal mostró pocos estudios relacionados con los efectos citotóxicos de dichas sustancias.

Este trabajo tiene como objetivo comparar el efecto citotóxico del RC-Prep, Glyde y EDTA sobre cultivos de fibroblastos del ligamento periodontal a 15, 30 y 60 minutos de exposición, con el fin de brindar a la comunidad odontológica la posibilidad de usar estos agentes con fines terapéuticos y la menor citotoxicidad, es decir, mejor seguridad para el paciente.

En atención a lo descrito y teniendo en cuenta la necesidad que asiste a toda la comunidad de endodoncistas por construir conocimientos relacionados con su objeto de trabajo y estudio, el tratamiento endodóntico, y ante los pocos estudios científicos que permitan demostrar el potencial efecto citotóxico de las sustancias EDTA 10%, RC-Prep y Glyde como quelantes, se justificó la realización de esta investigación, cuyos resultados contribuirán a la toma de decisión de los endodoncistas en cuanto a la

selección y tiempo de uso de las sustancias quelantes como EDTA, RC-Prep y Glyde.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de un modelo cuantitativo y cualitativo se realizó un tipo de investigación explicativo, con un diseño experimental *in vitro* desde las ciencias básicas.

Para este estudio se utilizaron fibroblastos de ligamento periodontal humano pertenecientes al grupo de investigación ReGen-tech S.A. (Bogotá, Colombia), los cuales se encontraban criopreservados (tubos de cuello inclinado de poliestireno).

Para su descongelación, los tubos de criopreservación fueron sumergidos al baño María, a 20 grados centígrados, por cinco minutos.

Luego se agregó tripsina al cultivo, para lograr la desagregación y desprendimiento de las células adheridas a la superficie. Los fibroblastos fueron resuspendidos en un medio de cultivo denominado DMEM e incubados a 37°C y 5% de CO₂.

Por medio de una técnica de calibración se obtuvieron subcultivos de 30 000 células, en cajas de cultivos Corning, las cuales tienen una capacidad de 96 pozuelos y un área de 25 cm².

Después de 24 horas de establecido el cultivo, el medio fue cambiado para agregar cada agente quelante a evaluar por la sustancia denominada tritón X-100, la cual fue utilizada como control positivo. Se utilizó una réplica sin estímulo considerada como control negativo.

Cada agente quelante (EDTA, RC-Prep y Glyde) fue evaluado a un intervalo de 15-30-60 minutos y una cantidad de 10UL (microlitros).

Una vez cumplido el tiempo para cada agente quelante, estos fueron reemplazados en el cultivo por MTT (tinta de tetrazolium) disuelto en DMEM fresco, a una concentración de 0.5 mg/ml y se incubó a una temperatura de 37°C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por un tiempo de 2 horas. Posteriormente fueron sometidos a la cuantificación de la absorbancia, por espectrofotometría, a temperatura ambiente y a una longitud de 570 nm, sustracción del ruido de fondo a 630 nm en el lector de Elisa (Star Fox 2100, awareness).

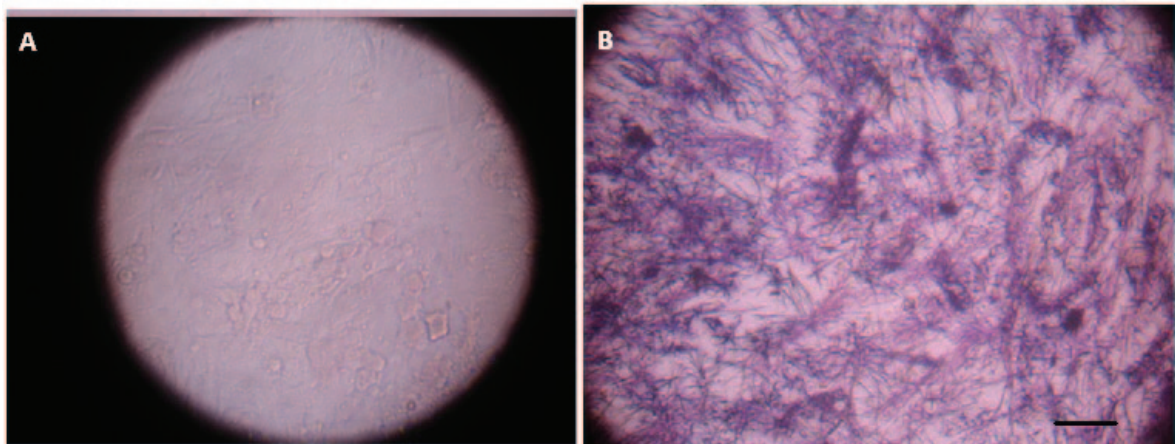
Previo a la cuantificación de la absorbancia se corroboró microscópicamente la formación de los cristales de formazán, los cuales se forman alrededor de los fibroblastos y su presencia es indicador de integridad de la membrana y de la actividad metabólica (ver

figura A). Estos cristales de formazán fueron disueltos por dimetilsulfóxido (DMSO).

Una vez obtenida la absorbancia de cada uno de los grupos estudiados, se procedió a realizar tinciones con azul de tripán y su observación microscópica. Este procedimiento de tinción se realiza aplicando el azul de tripán diluido en DMEM.

Para el caso de la evaluación con azul de tripán, las células que no presentan daño o alteraciones estructurales no se tiñen, mientras que las que presentan daño estructural presentan una tinción a nivel citoplasmático y nuclear, lo cual demuestra la pérdida de integridad (ver figura B).

El análisis estadístico se realizó con el programa STATGRAFIC PLUS utilizando indicadores descriptivos y de asociación. Para comparar nuestros datos y complementarlo con un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia menor o igual a 0.05. (ver tabla 1).



Fuente: Propiedad de los autores.

Figura A

Figura B

Formación de cristales de formazán en fibroblastos tratados con Glyde al 10% durante 15 minutos (figura A) y blanco (figura B).

Tabla 1. Quelantes vs. absorbancia y viabilidad celular

QUELANTES VS TIEMPO DE ABSORBANCIA Y VIABILIDAD CELULAR					
QUELANTES	TRATAMIENTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	VIABILIDAD CELULAR
Glyde	1	0,047	0,0355	0,036	0,0395
EDTA	2	0,123	0,0765	0,067	0,088833333
Rc-prep	3	0,1885	0,049	0,056	0,097833333
triton	4	0,036	0,0305	0,032	0,032833333
blanco	5	0,7133	0,695	0,7365	0,714933333

Fuente: Datos tabulados por autores.

RESULTADOS

Glyde

Lo observado durante la exposición de los fibroblastos al Glyde es que es un agente nocivo a una concentración de 10% y de manera diferencial durante tiempos distintos (15, 30 y 60 min). Con este agente se observó una muerte celular rápida desde los primeros tiempos de evaluación, siendo respaldado tanto por azul de tripán como por la prueba de MTT.

En la prueba de viabilidad de MTT, todos los valores de evaluación resultaron muy similares a los valores del control con TritonX100, de lo cual se deduce que la viabilidad fue muy baja para este tratamiento. Estos datos fueron corroborados con las fotografías de formación de cristales de formazán antes de ser disueltos por DMSO, donde no se observó ninguna clase de cristal en el tratamiento en comparación con el control blanco, donde fue totalmente evidente la formación de los mismos.

La evaluación por azul de tripán presentó los mismos resultados, donde existe tinción

masiva de células en todos los tiempos evaluados, mostrando así que el quelante indujo daños severos en la membrana de las células, produciendo baja viabilidad celular.

EDTA

Con esta sustancia se observó un incremento de muerte a través del tiempo, pero con bajas tasas de viabilidad desde el principio, siendo respaldado tanto por azul de tripán como por la prueba de MTT.

En la prueba de viabilidad de MTT, todos los valores de evaluación son parecidos a los del control con TritonX100, pero con una tendencia a acercarse más a este a través del tiempo, de lo cual se deduce, para este tratamiento, que supera a lo obtenido por Glyde; pero aun así son muy bajos los valores de viabilidad para determinar que es el más efectivo. Estos datos fueron corroborados con las fotografías de formación de cristales de formazán antes de ser disueltos por DMSO, donde se observó una baja formación de cristales en el tratamiento en comparación con el control blanco, donde fue abundante la formación de los mismos.

La evaluación por azul tripán reflejó los mismos resultados, donde existe tinción masiva de células en todos los tiempos evaluados, mostrando así que el quelante indujo daños severos en la membrana de las células, produciendo baja viabilidad celular.

RC – Prep

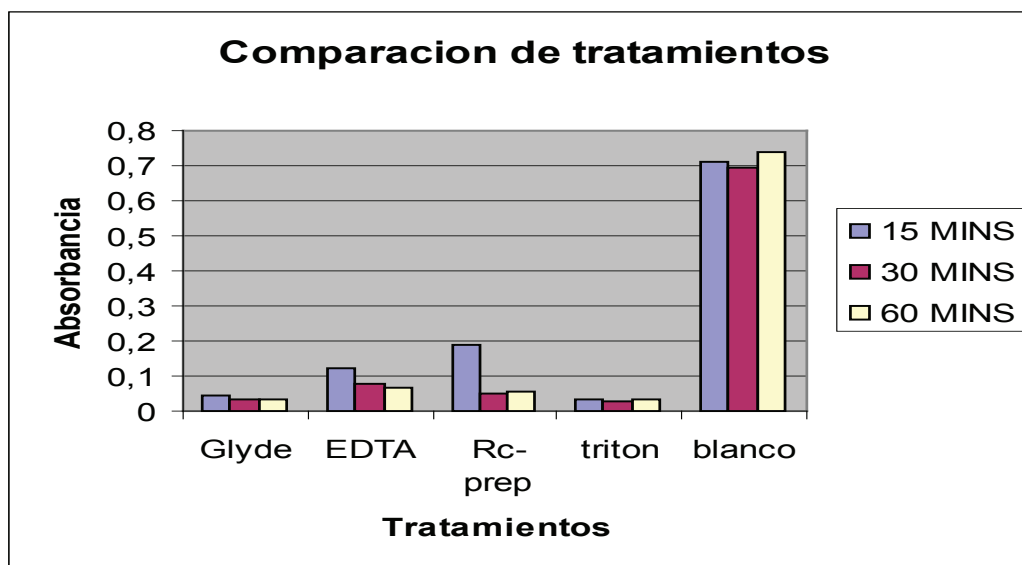
El tercer y último tratamiento por analizar fue RC-Prep. Con este agente se observó la menor mortalidad de los tres materiales en el primer tiempo de evaluación, sugiriendo que es el quelante menos dañino en un periodo de tiempo corto (15min), siendo respaldado tanto por azul de tripán como por la prueba de MTT.

En la prueba de viabilidad de MTT para este tratamiento, el valor inicial (15 minutos) fue el mejor resultado entre los diferentes tiempos de tratamiento; estos datos fueron corroborados con las fotografías de formación de cristales de formazán antes de ser disuel-

tos por DMSO, donde se observó una baja formación de cristales en el tratamiento en comparación con el control blanco, donde fue abundante la formación de los mismos, mientras que los dos tiempos restantes presentan, así como en el EDTA, una tendencia a decrecer conforme el tiempo avanza.

La evaluación por azul de tripán refleja los mismos resultados, y se observó tinción masiva de células en los tiempos de 30 y 60 minutos. A diferencia de lo observado en el primer tiempo de evaluación, el cual mostró una baja tinción de células, mostrando así que el quelante indujo daños severos en la membrana en periodos de tiempos posteriores a los de 15 minutos.

En este estudio se demostró de manera experimental que los agentes quelantes más comunes en el mercado, el RC-Prep, Glyde y EDTA, tienen un efecto citotóxico a nivel de los fibroblastos del ligamento periodontal (ver gráfica 1).



Fuente: Elaborado por los autores.

Gráfica 1. Comparación de materiales vs. absorbanza y tiempo

DISCUSIÓN

Variadas investigaciones han estudiado citotoxicidad de los diferentes materiales que se usan en los tratamientos odontológicos.

Vasudev y cols. (9), utilizando la prueba de MTT, demostraron los efectos citotóxicos del EDTA sobre una línea celular de fibroblastos (V79) al ser comparado con ácido maleico. Este estudio corrobora la citotoxicidad del ácido etilendiamino tetracético como componente fundamental de todos los agentes quelantes.

Existen diversos métodos empleados en estudios de evaluación de la citotoxicidad, entre los cuales hay muchos que no ofrecen respuestas satisfactorias, ya sea porque no son análogos con la clínica o por limitaciones intrínsecas de la prueba (10-11).

El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

La prueba de MTT es una técnica muy utilizada para medir la citotoxicidad de algunos materiales dentales, por poseer ventajas como simplicidad, rapidez y repetitividad; además es una técnica que permite evaluar el efecto de determinada molécula sobre el número de células y sobre su actividad metabólica (12). En este estudio, para evaluar la efectividad de la técnica de MTT se tomó un cultivo como control positivo, al cual se le agregó tritón, que es un agente citotóxico comprobado. De igual forma, se corrobora-

ron los hallazgos espectrofotométricos con los microscópicos, evidenciados con la tinción a base de azul de tripán(13).

Diversas líneas de fibroblastos de ligamento periodontal humano han sido utilizadas para evaluar la citotoxicidad de diversos materiales endodónticos (14,15).

La permanencia de residuos de agentes quelantes tendría un efecto citotóxico prolongado sobre las células del ligamento periodontal.

El Glyde como agente quelante presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el EDTA al 17% y el RC-Prep, mostrando mayor citotoxicidad, independientemente del intervalo de tiempo, y no se encontró referencia literaria de estos hallazgos con respecto a la composición química de cada uno de los agentes estudiados.

No se encontró reporte literario sobre la cantidad de agente quelante utilizado y su relación con la citotoxicidad.

Se encontró que a los 15 minutos, el RC-PREP resultó ser el quelante con mejor comportamiento, comparado con el EDTA y Glyde, sin embargo, el EDTA tiene menor efecto citotóxico a los 30 y 60 minutos comparado con RC-Prep y Glyde.

El Glyde tuvo un comportamiento agresivo, comparado con el TRITON, desde el inicio del experimento, con un detrimento de la absorbancia comparado con los quelantes EDTA y RC-PREP.

La viscosidad de cada uno de los agentes quelantes podría ser una variable incidente en los resultados del estudio, teniendo en cuenta que de los tres agentes quelantes uti-

lizados el que menor viscosidad presenta es el EDTA al 17% en solución acuosa. Siendo este el primer agente en entrar en alcanzar el tercio apical comparado con los otros dos agentes quelantes estudiados. Variable que también incide en la eliminación del mismo, haciéndose más difícil de eliminar el Glyde y el RC-PREP, presentándose una mayor adhesión de estos agentes quelantes a las paredes del conducto radicular, manteniendo una actividad prolongada, como también el efecto citotóxico sostenido.

La importancia de conservar una longitud de trabajo constante durante la instrumentación endodóntica como la integridad de la constricción apical es un factor determinante para disminuir el contacto de los agentes quelantes con los tejidos periapicales.

CONCLUSIÓN

El uso de agentes quelantes es indispensable para eliminación del Smear Layer durante la terapia endodóntica. Los tres agentes quelantes evaluados en este estudio presentaron cierto grado de citotoxicidad, siendo el más citotóxico el Glyde, en los diferentes intervalos de tiempo. El EDTA, por su baja viscosidad, puede ser utilizado al final de la preparación químico-mecánica, debido a que su eliminación del conducto radicular es más fácil que los otros dos agentes quelantes utilizados, logrando el efecto de eliminación de Smear Layer y un daño mínimo a los tejidos periapicales.

RECOMENDACIONES

Esta investigación fue realizada en condiciones de laboratorio, sin tener en cuenta las condiciones clínicas como tensión superficial, viscosidad y pH, por lo que se sugiere continuar con esta investigación realizando

un mayor número de pruebas, teniendo en cuenta las variables anteriormente mencionadas. Principio del formulario.

Financiación: Universidad San Martín (Colombia).

Conflicto de interés: Ninguno.

REFERENCIAS

- (1) Masillamoni CRM, Kettering JD, Torabinejad M. The Biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants. *Int Endod J* 1981; 14: 115-20.
- (2) Torabinejad M, Handysides R, Khademi A, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontic: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 658-66.
- (3) Carson L, Mader J. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J of endodontic* 1984; 10: 477- 83.
- (4) Drake D, Wiemann A. Bacterial Retention in Canal Walls in vitro: Effect of Smear Layer. *J of endodontic* 1994, 20: 78-82
- (5) Steinberg D, Raizq A, Heling I. in vitro antibacterial effect of Rc prep components on streptococcus sobrinus. *Endod Dent Traumat* 1999; 15: 171- 4.
- (6) Rome W, Doran J, Walker W. The effectiveness of GLY_OXIDE and sodium hypochlorite preventing smear layer formation. *J of Endod* 1985; 11: 281-8.
- (7) STEWART G. Gaining Access to calcified Canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79: 764-8.
- (8) Cohen S. *Pathways of the pulp*. 8ª ed. Mosby; 2002.
- (9) VasuvetBallal N, Kundabala M, Seetharama B, Nageshwar R, SatishRao BS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: Root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2009; 108: 633-638.

- (10) Wennberg A, Hasselgren G. Cytotoxicity evaluation of temporary filling materials. *Int Endod J* 1981; 14: 121-4.
- (12) Meryon S. The influence of dentine on in-vitro Cytotoxicity testing of dental restorative materials. *J Biom Mat* 1984; 18: 771.
- (12) Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
- (13) Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental Materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 1973; 36: 856-7.
- (14) Kuo-weitai, Fu-meihuang. Cytotoxic Evaluation of Root Canal Filling Materials on Primary Human Oral Fibroblast Cultures and a Permanent Hamster Cell Line. *J of endodontic* 2001; Vol 27:571-3.
- (15) Zhang W, Torabinejad M, LI Y. Evaluation of cytotoxicity of mtad using the mtt-tetrazolium methods. *J of endodontic* 2003; 29:654-7.