



DIVISION DE INVESTIGACIONES

ACTA DE CALIFICACION Y APROBACION DE TRABAJOS DE GRADO

PRUEBA DE CITOXICIDAD IN VITRO DEL DIAMINO FLUORURO DE PLATA SOBRE CULTIVOS DE CELULAS HeLa.

Los suscritos, profesores de la Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, en el marco del Programa de Especialización en Odontología Pediátrica, han evaluado el trabajo de grado presentado para tal efecto y otorgan el concepto de los respectivos evaluadores, el cual sirve para calificar el trabajo de grado.

Prueba de Citoxidad in Vitro del Diamino Fluoruro de Plata sobre Cultivos de Células HeLa

Presentado como requisito parcial por la estudiante:

María Claudia Ramírez

Para calificar el título de:

María Claudia Ramírez González

Especialista en Odontología Pediátrica

Quedando en el concepto de calificación final de:

BENE-PROBATUS

Elaborado en Bogotá de Bogotá, D.C. el 19 de Noviembre de 1998

Erax Bozón Martínez
ERAX BOZÓN MARTINEZ
Director División de Investigaciones

Rafael Sánchez Arteaga
RAFAEL SANCHEZ ARTEAGA
Director División de Postgrados

**Universidad El Bosque
Facultad de Odontología
Postgrado de Odontología Pediátrica
Santa Fé de Bogotá. Octubre 26 de 1998**

María Clara González
MARIA CLARA GONZALEZ
Directora Programa

Rafael Sánchez Arteaga
RAFAEL SANCHEZ ARTEAGA
Jurado

**PRUEBA DE CITOXICIDAD IN VITRO DEL DIAMINO FLUORURO DE PLATA
SOBRE CULTIVOS DE CELULAS HeLa.**

Investigadora:

Dra. María Claudia Ramírez

Director Temático:

Dr. Jaime Castellanos P. M.Sc.

**Universidad El Bosque
Facultad de Odontología
Postgrado de Odontología Pediátrica
Santa Fé de Bogotá, Octubre 26 de 1998.**

Bogotá, Octubre 27 de 1998

UNIVERSIDAD: El Bosque

FACULTAD: Odontología

TITULO: Prueba de citotoxicidad in vitro del diamino fluoruro de plata sobre cultivos de celulas HeLa

LINEA DE INVESTIGACION: Postgrado

INSTITUCIONES PARTICIPANTES: Instituto Nacional de Salud -Laboratorio de Neurociencias y la Universidad El Bosque

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Dra. Maria Claudia Ramírez

DIRECTOR CIENTIFICO: Dr. Jaime Castellanos

ASESOR METODOLOGICO: Dr. Jaime Castellanos

ASESOR ESTADISTICO: Dr. Jaime Castellanos

María Claudia Ramírez


JAIME E. CASTELLANOS P. M.Sc.
Senior Investigator
Facultad de Odontología, U. El Bosque

AGRADECIMIENTOS

Nota de Salvedad de Responsabilidad Institucional

A: *Doctor Eric Bohun Martínez*, Director División de Investigación de la U. El Bosque, por el apoyo brindado para realizar este trabajo y por las gestiones económicas en favor de este trabajo.

" La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo se velara por el rigor científico, metodológico y ético del trabajo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia"

A: *Doctor Jaime Castellanos*, por su apoyo, paciencia y colaboración durante el transcurso de todo el trabajo.

A la *Doctora Laura Hormida*, por su colaboración en la consecución del medicamento.

A la *Doctora María Teresa Uribe*, Docente de Odontología Pediátrica de la Universidad de Antioquia, por su ayuda para la obtención de algunas de las referencias bibliográficas.

A la *Doclora Claudia Lopez*, Odontopediatra Universidad de Nueva York, por su apoyo, consejo y además su ayuda para la obtención de algunas de las referencias bibliográficas.

A todas aquellas personas que en su momento fueron muy importantes para la culminación de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al **Doctor Erix Bozon Martínez**, Director División de Investigación de la U. El Bosque, por el apoyo brindado para realizar este trabajo y por las gestiones económicas en favor de éste trabajo.

Al **Doctor Hernán Hurtado**, Jefe de Laboratorio de Neurociencias del Instituto Nacional de Salud, quien permitió realizar la totalidad de los experimentos en el laboratorio.

Al **Doctor Jaime Castellanos**, por su apoyo, paciencia y dedicación, durante el transcurso de todo el trabajo.

A la **Doctora Laura Hermida**, por su colaboración en la consecución del medicamento.

A la **Doctora María Teresa Uribe**, Docente de Odontología Pediátrica de la Universidad de Antioquía, por su ayuda para la obtención de algunas de las referencias bibliográficas.

A la **Doctora Claudia Lopez**, Odontopediatra Universidad de Nueva York, por su apoyo, consejo y además su ayuda para la obtención de algunas de las referencias bibliográficas.

A todas aquellas personas que en su momento fueron muy importantes para la culminación de esta investigación.

DEDICATORIA

*A mi padre que gracias a su consejo y apoyo,
hizo posible el alcanzar
una de las metas más importantes
en mi vida.*

5.3 Población y Muestra	64
5.4 Escala y Categorización de variables	64
5.5 Plan de Recolección de la Información	64
6. Análisis Estadístico	66
7. Materiales y Métodos	
7.1 Procedimiento	67
TABLA DE CONTENIDO	Pag
7.2 Curva de Calibración - Cytotox 96	69
7.3 Curva de Calibración - Cytotox 96	69
7.4 Curva de toxicidad del Formocresol	69
7.5 Prueba de Toxicidad del Diamino Fluoruro de Plata.	71
Resumen	
Abstract	72
Artículo Científico	73
Lista de Figuras y Tablas	74
Introducción	1
1. Problema de Investigación	3
1.1 Descripción	3
1.2 Formulación	3
1.3 Sistematización	3
2. Justificación	5
3. Propósito y Objetivos	6
3.1 Propósito	
3.2 Objetivos	
3.2.1 Objetivo General	
3.2.2 Objetivos Específicos	
4. Marco de Referencia	
4.1 Marco Teórico	
4.1.1 Pulpa	7
4.1.2 Dentina	9
4.1.3.1 Caries	11
4.1.3.1.1 Etiología de la Caries	11
4.1.3.1.1.1 Teoría Acidogenica	
4.1.3.1.1.2 Teoría Proteolítica	
4.1.3.1.1.3 Teoría de la Proteolisis-Quelación	
4.1.3.1.1.4 Teoría Actual	
4.1.3.2 Desarrollo de la Lesión Inicial de Caries	14
4.1.3.3 Reacciones de la dentina a la progresión de la caries	17
4.1.3.4 Flúor	19
4.1.3.5 Métodos no traumáticos para tratar la caries.	34
4.1.3.5.1 Fluoruro de plata amoniacal	36
4.1.4 Ensayo no Colorimetrico-Cytotox 96	42
4.1.5 Pruebas de Biocompatibilidad	44
4.1.6 Cultivos Celulares	51
4.2 Marco Conceptual	63
4.3 Hipotesis	63
5. Diseño Metodológico	
5.5.1 Tipo de Estudio	64
5.2 Método de Investigación	64

5.3 Población y Muestra	64
5.4 Elección y Categorización de variables.	64
5.5 Plan de Recolección de la Información	64
6. Análisis Estadístico	66
7. Materiales y Métodos	
7.1 Procedimiento	67
7.2 Protocolo de Tripsinización	68
7.3 Curva de Calibración - Cytotox 96	69
7.4 Curva de toxicidad del Formocresol	69
7.5 Prueba de Toxicidad del Diamino Fluoruro de Plata.	70
8. Resultados	
8.1 Aspecto Morfológico de las Células	72
8.2 Curva de Calibración del Cytotox 96	73
8.3 Curva de Calibración del Formocresol	74
8.4 Experimento con el Diamino Fluoruro de Plata.	75
8.5 Análisis Estadístico	81
9. Discusión	84
10. Conclusiones	90
11. Recomendaciones	92
Referencias	93
Bibliografía	99

RESUMEN

PRUEBA DE CITOTOXICIDAD IN VITRO DEL DIAMINO FLUORURO DE PLATA SOBRE CULTIVOS DE CELULAS HeLa.

El Diamino fluoruro de plata (DAFP) es una solución tópica que se utiliza en odontología al 38%, su manejo se ha descrito en países como Brasil, Argentina y Japón. Sus indicaciones son básicamente como agente anticariogenico en niños y para la hipersensibilidad dental en adultos.

El **propósito** de este estudio es el evaluar el comportamiento de toxicidad del DAFP sobre células HeLa.

Se sembraron 12000 células por pozo en cajas de cultivo de 96 pozos, se incubaron en cámara de CO₂ a 37°C por 24 horas. Posteriormente se colocaron las diluciones del DAFP, retirando previamente el medio de cultivo, las diluciones usadas fueron 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 preparadas en medio de cultivo sin suero fetal bovino. El tiempo de exposición fue de 1 minuto, al cabo del cual se retiró el agente, se lavaron las células con buffer de fosfato y se desprendieron por tripsinización para realizar un conteo por medio del método de exclusión con azul trypan usando una cámara de Neubauer, bajo microscopio invertido. El experimento se repitió tres veces cada uno con 4 replicas de cada condición.

Se encontró que las diluciones del DAFP usadas por un tiempo de exposición de 1 minuto, provocaron una severa disrupción de la monocapa celular, causando muerte en la totalidad de las células al usar las diluciones 1:400 y menores. En las diluciones 1:800 y 1:1600 se encontraron al momento del conteo células vitales, pero en baja proporción. El análisis estadístico (ANOVA de una sola vía y un test de comparación de medias, DMS) mostró una diferencia entre los grupos con respecto al control con un valor de $p < 0,001$.

El agente probado probó tener un gran efecto de toxicidad en su aplicación directa sobre una línea celular de origen humano, en concentraciones hasta de 1000 veces menores y a un tiempo menor del que se recomienda para su uso clínico, así pues el resultado del presente trabajo debe servir para alertar sobre el uso del medicamento en cuestión y permitir lanzar nuevos estudios que complementen los que se han realizado en clínica.

Palabras Claves: *Citotoxicidad, Diamino Fluoruro de plata, cultivos*

ABSTRACT

In vitro citotoxicity of silver diammine fluoride over HeLa cell cultures

Silver diammine fluoride (DAFP) is a topical solution used in a 38% dilution in dentistry employed in countries such as Brasil, Argentina and Japan. The indications for use are basically as cariostatic in children and dental hipersensitivity in adults.

The **purpose** of this study is to evaluate the toxicity of DAFP over HeLa cells.

12000 cells were cultured for every well in culture boxes of 96 wells, they were incubated in a CO₂ chamber at 37° C for 24 hour. Then DAFP dilutions of 1:50,1:100,1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600 were poured in the wells previously retiring the culture media. The time of contact was one minute, and at the end DAFP was withdrawn and the cells were washed in a phosphate buffered solution. The method used to yield the cells was trypsinizing, after this they were counted using the exclusion method with trypan blue in a counting Neubauer camera under an inverted microscope. The experiment was repeated three times, every one with four replicas of every condition.

We found that the dilution of DAFP used for a exposition time of one minute, provoques a severe disruption of the single cell layer, causing the death of the totality of cells exposed to dilutions of 1:400 and less. Dilution of 1:800 and 1:1600, yielded a diminution in the vital cell counts. The statical analysis (one way ANOVA and measurent comparation test DMS), proved adiference between groups and controls of $p < 0,001$.

The agent used demonstrated a great toxicity when applied directly over a human cell line, even in concentrations 1000 less and in a fraction of the time that those recommended for clinical use; therefore the results of this work should warn of the use of this medicament and permit that new studies complete those realized in practice.

Key Words: *Citotoxicity. Silver Diammine fluoride, Cultures*

PRUEBA DE CITOTOXICIDAD IN VITRO DE DIAMINO FLUORURO DE PLATA SOBRE CULTIVOS DE CELULAS HeLa.

Ramirez Maria Claudia.* Castellanos Jaime**

El Diamino fluoruro de plata (DAFP) es una solución tópica que se utiliza en odontología al 38%, su manejo se ha descrito en países como Brasil, Argentina y Japón. Sus indicaciones son básicamente como agente anticariogenico en niños y para la hipersensibilidad dental en adultos.

El **propósito** de este estudio es el evaluar el comportamiento de toxicidad del DAFP sobre células HeLa.

Se sembraron 12000 células por pozo en cajas de cultivo de 96 pozos, se incubaron en cámara de CO₂ a 37°C por 24 horas. Posteriormente se colocaron las diluciones del DAFP, retirando previamente el medio de cultivo, las diluciones usadas fueron 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 preparadas en medio de cultivo sin suero fetal bovino. El tiempo de exposición fue de 1 minuto, al cabo del cual se retiró el agente, se lavaron las células con buffer de fosfato y se desprendieron por tripsinización para realizar un conteo por medio del método de exclusión con azul trypan usando una cámara de Neubauer, bajo microscopio invertido. El experimento se repitió tres veces cada uno con 4 replicas de cada condición.

Se encontró que las diluciones del DAFP usadas por un tiempo de exposición de 1 minuto, provocaron una severa disrupción de la monocapa celular, causando muerte en la totalidad de las células al usar las diluciones 1:400 y menores. En las diluciones 1:800 y 1:1600 se encontraron al momento del conteo células vitales, pero en baja proporción. El análisis estadístico (ANOVA de una sola vía y un test de comparación de medias, DMS) mostró una diferencia entre los grupos con respecto al control con un valor de $p < 0,001$.

El agente probado probó tener un gran efecto de toxicidad en su aplicación directa sobre una línea celular de origen humano, en concentraciones hasta de 1000 veces menores y a un tiempo menor del que se recomienda para su uso clínico, así pues el resultado del presente trabajo debe servir para alertar sobre el uso del medicamento en cuestión y permitir lanzar nuevos estudios que complementen los que se han realizado en clínica.

Palabras Claves: *Citotoxicidad, Diamino Fluoruro de plata, Cultivos*

ABSTRACT

Silver diammine fluoride (DAFP) is a topical solution used in a 38% dilution in dentistry employed in countries such as Brasil, Argentina and Japan. The indications for use are basically as cariostatic in children and dental hypersensitivity in adults.

The **purpose** of this study is to evaluate the toxicity of DAFP over HeLa cells.

12000 cells were cultured for every well in culture boxes of 96 wells, they were incubated in a CO₂ chamber at 37° C for 24 hour. Then DAFP dilutions of 1:50,1:100,1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600 were poured in the wells previously retiring the culture media. The time of contact was one minute, and at the end DAFP was withdrawn and the cells were washed in a phosphate buffered solution. The method used to yield the cells was trypsinizing, after this they were counted using the exclusion method with trypan blue in a counting Neubauer camera under an inverted microscope. The experiment was repeated three times, every one with four replicas of every condition.

We found that the dilution of DAFP used for a exposition time of one minute, provoques a severe disruption of the single cell layer, causing the death of the totality of cells exposed to dilutions of 1:400 and less. Dilution of 1:800 and 1:1600, yielded a diminution in the vital cell counts. The statical analysis (one way ANOVA and measurent comparison test DMS), proved adiference between groups and controls of $p < 0,001$.

The agent used demostrated a great toxicity when applied directly over a human cell line, even in concentrations 1000 less and in a fraction of the time that those recommended for clinical use; therefore the results of this work should warn of the use of this medicament and permit that new studies complete those realized in practice.

Key Words: *Citotoxicity, Silver Diammine fluoride, Cultures*

*Estudiante Odontologia Pediatrica U. El Bosque

** Docente-Investigador. U el Bosque

INTRODUCCION

Desde el siglo XIX el control de la caries ha sido una de las mayores metas en nuestra profesión. Diferentes métodos se han utilizado, ya sean químicos, nutricionales o mecánicos. Pero uno de los materiales más utilizados ha sido el flúor.(1,2)

En el tratamiento de la caries el flúor se ha usado en forma sistémica y tópica. Dentro del primer grupo se utiliza la fluorización del agua, la sal, leche y los suplementos fluorados. Dentro del segundo grupo se utilizan diferentes tipos de productos como geles, pastas profilácticas, dentífricos, enjuagues y barnices.(3)

Además del flúor, diferentes agentes se han estudiado, entre estos se encuentran el nitrato de plata, trimetrofosfato, difosfatos y el zinc.(4,5,6)

El nitrato de plata es un agente que se ha utilizado desde 1891, pero solo hasta 1969 Yamaga desarrolla el fluoruro de plata amoniacal que incorpora la acción del flúor y no contiene el ion nitrato, solución denominada fluoruro de plata amoniacal. Yamaga en 1970 desarrolla el diamino fluoruro de plata. Entre sus indicaciones se encuentra como agente cariostático en niños y para tratamiento de la hipersensibilidad en adultos.(7,8)

Aunque la literatura sobre el tema es escasa; diferentes estudios en el campo clínico se han realizado sobre este agente en Japón, Argentina y Brasil; pero acerca de su toxicidad es muy poco lo que se encuentra; en Colombia este agente no se encuentra disponible comercialmente.(8,9,10,11,12)

En el país se busca iniciar su utilización a nivel masivo, por lo tanto es de gran importancia el realizar estudios de biocompatibilidad; buscando evaluar los efectos biológicos de este material in vitro.

El documento 41 de la ANSI/ADA describe diferentes estados de pruebas de biocompatibilidad, el inicial, secundario y los test preclínicos. Entre las pruebas iniciales se

encuentran los test de citotoxicidad que miden el efecto de productos de desecho de materiales dentales. Estos procedimientos son no tóxicos, estériles, reproducibles, rápidos y no costosos.(13)

El objetivo de este estudio es medir la toxicidad in vitro del diamino fluoruro de plata, sobre monocapas de células HeLa.

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento

El experimento se inicio, descongelando células HeLa las cuales se sembraron en 2 botellas de 25 cm², con medio más antibiótico y suero fetal bovino (DMEM +AB+SFB) al 10%, a los dos días se cambia el medio con SFB al 10%; se observa que no hay crecimiento de estas células, por lo cual se deciden sembrar otras, observándose a los pocos días que su crecimiento es lento; aproximadamente 3 días después se observa un cambio de color en el medio y se decide realizar la tripsinización (tripsina al 0.25%)

Prueba de toxicidad del Diamino Fluoruro de Plata

Se inician las pruebas con el diamino fluoruro de plata (DAFP), inicialmente las cajas de 96 pozos se distribuían de la siguiente forma: En las columnas 1,2,3, y 4 de todas las filas se sembraron 12.000 células por cada pozo. En la columna 5 se colocó solamente DMEM + AB +SFB al 5%. Los pozos de la fila A correspondían al control sin células y sin DAFP:

Para iniciar se sembraron cuatro pozos con 12000 células, en cada fila, se incuban por 24 horas, luego se retira el medio y se aplica 100 µl de diamino fluoruro de plata durante 30 y 60 minutos, sobre las células y también en la columna 5(control).La prueba de toxicidad se realiza con el Kit de Cytotox 96, se sigue su protocolo: Después del tiempo indicado de exposición se toma 50 µl de cada pozo y se coloca en el otro extremo de la caja, a cada pozo se le adicionaba 50 µl de mezcla de substrato, la caja se cubría con papel aluminio y se incubaba durante 30

minutos, a temperatura ambiente, luego se agregaba 50 µl de solución de parada a cada pozo. Posteriormente se realizaba la lectura, en el lector de Elisa. Las concentraciones iniciales que se utilizaron fueron:

1. 1:10 ----- 0.38 %
2. 1: 20 ----- 0.19 %
3. 1: 40 ----- 0.09 %
4. 1: 80 ----- 0.04 %
5. 1: 160 -----0.02 %
6. 1: 320-----0.01 %
7. 1: 640-----0.005 %

En vista de que era imposible leer correctamente las absorbancias, se realiza la evaluación por conteo directo usando azul trypan.

Se realiza el experimento con iguales diluciones y tiempos de exposición de 15 y 30 minutos, se observa gran disrupción sobre la monocapa con todas las diluciones, por o tanto se decide realizar diluciones mayores y disminuir el tiempo de xposición.

Se usaron diluciones mayores de DAFP de 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0,009%), 1/800(0.004), 1/1600 (0.002%). En una caja de 96 pozos, se sembraron 24 pozos, 4 pozos en las seis primeras filas, la caja se dejo incubar 24 horas. Luego el Diamino fluoruro de plata se colocaba sobre las células a un tiempo de exposición de un minuto, se retiraba de cada pozo y se desechaba, las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4, al retirarlo perfectamente se aplicaba 40 µl de tripsina 0.25% hasta que se observara por microscopio desprendimiento, y se agregaba 40 µl de DMEM+ AB+SFB 5% a cada pozo. Posteriormente se realizaba conteo de cada pozo, con azul trypan. El experimento se repitió tres veces.

RESULTADOS

Aspecto Morfológico de las células HeLa.

Las células que fueron obtenidas a partir de botellas de 25cm², y fueron sembradas a una concentración de 12000 células por pozo se observan a las 24 horas con una confluencia del 90%. En la monocapa se observa mayor densidad celular hacia el centro del pozo. El

aspecto morfológico de las células HeLa muestra una forma dendrítica con polos de crecimiento citoplasmático, que se proyectan a los espacios intercelulares. Se evidencia núcleos definidos y presencia de dos nucleolos, predomina la cromatina extendida, relación de núcleo-citoplasma de 1 a 3.(Fig1).

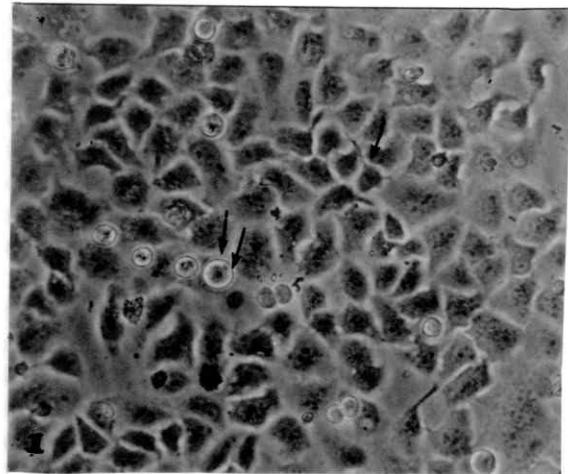


Figura 1. Aspecto morfológico células HeLa (x4): predominan las formas dendríticas. (flecha). Presencia de células no adheridas. (2 flechas)

EXPERIMENTO CON DAFP

En los experimentos iniciales donde se aplicaba el DAFP y se utilizaba el kit del Cytotox 96, se encontró que los resultados no eran coherentes en algunos casos y en otros se observaban cifras por encima del valor máximo de absorbancia.

Para realizar las diluciones del diamino fluoruro de plata se utilizo inicialmente DMEM + AB + SFB 5%, y se observaba en los viales una precipitación la cual iba disminuyendo al disminuir la concentración del diamino fluoruro de plata.

Después de realizar varios experimentos se determino por observación directa y microscopio que en las cajas de 96 pozos, había precipitación del diamino fluoruro de plata.

Analizando cada experimento se llegó a la conclusión de que el diamino fluoruro de plata podría estar reaccionando con el suero fetal bovino (SFB) por lo tanto se decidió utilizar Medio (DMEM) + antibiótico (ab) sin SFB, para preparar las diluciones del diamino; a la vez se realizaron diferentes tiempos de exposición a 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos.

A pesar de esto después de varias pruebas, tanto al preparar las diluciones y en las cajas se continuaba observándose precipitación, lo que seguía impidiendo realizar la lectura espectrofotométrica.

El experimento se decide realizar con las concentraciones iniciales (a 15 y 30 min), el DAFP es colocado durante los tiempos de exposición elegidos, luego se retiraba y se desechara, las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4; al retirarlo se aplicaba 40 µl de tripsina 0.25%, hasta que se observaba por microscopio desprendimiento y se agregaba 40 µl de DMEM + AB + SFB al 5% a cada pozo, luego se realiza conteo en la cámara de Neubauer y se determino la viabilidad encontrándose que no quedaban células vivas en ninguna de las diluciones, a los diferentes tiempos de exposición utilizados.

Por lo cual posteriormente, en una caja de 96 pozos se sembraron 28 pozos con 12.000 células cada uno, la caja se dejó incubar por 24 horas; luego el Diamino fluoruro de plata a diluciones de 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0.009%), 1/800 (0.004), 1/1600 (0.002%), se colocaba sobre las células durante un minuto, cada concentración se aplico en 4 pozos de cada fila, luego se retiraba y se desechara; las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4, al retirarlo se aplicaba 40 µl de tripsina 0.25% hasta que se observara por microscopio desprendimiento, y se agregaba 40 µl de DMEM+ AB+SFB al 5% a cada pozo y se realizaba el conteo de cada pozo en la cámara de Neubauer. El experimento se repitió tres veces, en cada experimento se realizó 4 replicas.

Después de colocar un minuto el DAFP dentro del pozo se observa un desprendimiento de la

monocapa y un cambio de color de esta. El aspecto de los pozos varia según la dilución utilizada, en las diluciones menores, la tinción de la monocapa es mayor. El aspecto de la monocapa celular un minuto después de haber aplicado la dilución 1/100, se observa en la figura 2A. La figura 2B. muestra el conteo celular con azul trypan a las células HeLa a las que se les aplico la dilución 1/100.

Se evidencia que el número de células muertas va disminuyendo a medida disminuye la concentración del DAFP, tanto que a partir de las diluciones 1/400 (0.009%), se presentan pocas células vivas y el número de estas va aumentando a medida aumenta la dilución. El promedio de células muertas es alto.

En las diluciones mayores aunque también se observa un desprendimiento de la monocapa, las células se encuentran más integras. La Figura 3A muestra las células HeLa después de un minuto de haber aplicado una dilución 1/800. La figura 3B. muestra el conteo celular con azul trypan a las células que se les aplico la dilución 1/800.

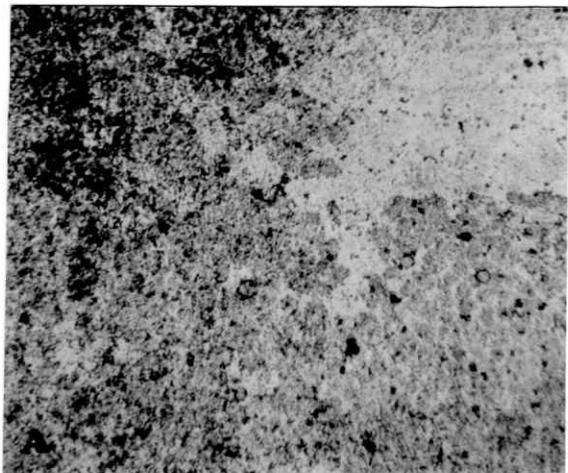


Figura 2A. Vista de las células HeLa dentro del pozo (x10), al haber aplicado el DAFP por un minuto, en una dilución 1/100. Se observa una gran disrupción de la monocapa.

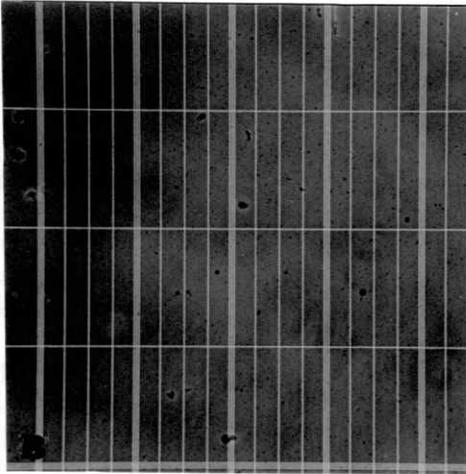


Figura 2B. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución 1/100.

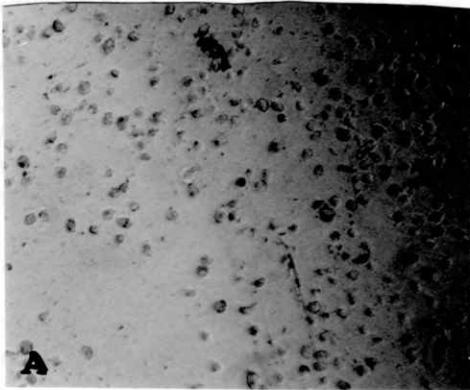


Figura 3A. Vista de las células HeLa dentro del pozo, al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución 1/800. El desintegración de la monocapa no es tan severa como la observada en diluciones mayores.

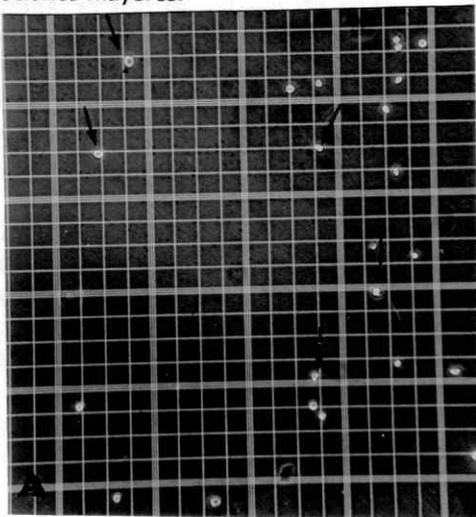


Figura 3B. Conteo celular en microscopio invertido, dilución 1/800. El número de células birefringentes aumenta.

En cada dilución se obtuvo una cifra de célula muertas y vivas (Figura 4 y 5), el numero total se promedió, se obtuvo la desviación standard y error de la media (Tabla 1) Se muestra el promedio de células vivas y muertas, y el error estándar de la media

Tabla 1. Resultado de los Conteos de Células Posterior al Tratamiento con DFAP.

DILUCION DAPF	PROMEDIO CEL. MUERTAS	PROMEDIO CELULAS VIVAS
1/50	14.432,8 ± 624.24	0
1/100	11.712 ± 294.83	0
1/200	8.930 ± 241.9	0
1/400	7.296 ± 183.51	2.960 ± 582.4
1/800	4.080 ± 395.4	4.032,5 ± 762.42
1/1600	3.702,8 ± 521.89	9.200 ± 775.62

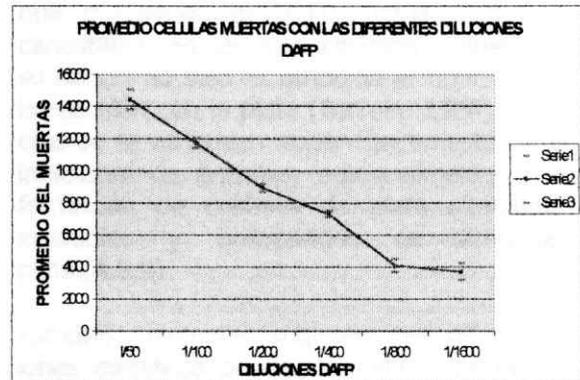


Figura 4 Numero células muertas con las diferentes diluciones de diamino fluoruro de plata. Los datos representan el promedio ± el error estándar de la media.

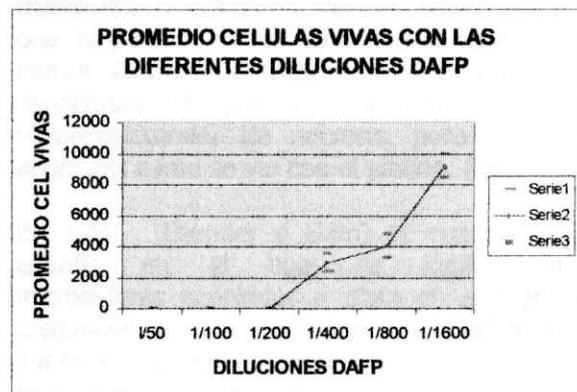


Figura 5 Número célula vivas con las diferentes diluciones de diamino fluoruro de plata. Los datos representan el promedio ± el error estándar de la media.

Análisis estadístico

En vista de que se realizaron diferentes diluciones del DAFP se decidió realizar análisis de ANOVA de una vía; para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre por lo menos dos grupos.

Adicionalmente se realizó un test de comparación múltiple de medias; el DMS (diferencia mínima significativa), el cual se efectúa cuando las pruebas de t múltiples cada una al nivel α , solo si a la prueba F es significativa al nivel α . Esta tenía el fin de detectar entre que grupos existía diferencia significativa. Se determinó que para una significancia de 0.05 con 50 gl se encuentra una diferencia significativa entre la concentración 1/50 y 1/100; 1/100 y 1/200; y 1/400 y 1/800; ya que la diferencia de medias entre los grupos es mayor que el valor de DMS.

DISCUSION

En el área de la odontología pediátrica se investiga permanentemente, uno de los fines es lograr el tratamiento de las lesiones cariosas sin eliminar la totalidad de la dentina afectada, promoviendo actividades que disminuyan los niveles de la intervención profesional. Se ha ensayado por mucho tiempo el uso de nitrato de plata, la adición de flúor a diferentes productos odontológicos, fluoruro de estaño y el diamino fluoruro de plata, con el fin de ofrecer alternativas más económicas y menos traumáticas para los pacientes pediátricos.

El DAFP ha sido usado por varias escuelas de odontología en el mundo para el tratamiento de caries incipientes. En la revisión realizada no se han encontrado datos sobre los efectos tóxicos del compuesto, por lo tanto nuestro trabajo consistió en hacer una primera aproximación al estudio del comportamiento de éste compuesto *in vitro*.

Se han descrito las reacciones químicas que ocurren sobre la dentina al ser aplicado el DAFP y se postula que el grado de

insolubilidad alcanzado por éstos cristales es mucho mayor que con otros compuestos, favoreciendo la detención de los procesos cariosos.

El DAFP ha sido usado por temporadas en varios países, en la actualidad su estudio se ha vuelto de particular interés, por las repercusiones en la salud y en la economía que podría traer su uso generalizado.

La mayoría de referencias se encuentran en el Japón, en Estados Unidos no se encuentra mención sobre el producto. En la información conseguida se considera la aplicación de DAFP como un método "no traumático" para tratar la caries dental. La mayoría de los estudios que se han realizado reportan ensayos de tipo clínico, los cuales muestran que pincelando el DAFP, actúa como un cariostático en lesiones cariosas incipientes, su acción no solo es atribuida al flúor sino a la reacción con la plata (Barreiro 1984), a la cual se le atribuyen acción bacteriostática e inhibidora de enzimas, adicionalmente a la formación de cristales de plata altamente insolubles y precipitados de Proteína-plata.(4,8,9)

Estudios recientes sugieren que diferentes iones metálicos pueden ser liberados desde metales dentales u otros biomateriales, pueden causar efectos tóxicos sobre varias células. Schedle (1998) es este estudio muestra el efecto de 14 metales sobre la liberación de histamina desde basófilos, mastocitos. De los 14 metales se encontró que la plata y el mercurio son capaces de inducir liberación de histamina en basófilos y mastocitos, lo que se asocia con signos ultraestructurales de necrosis, pero no de apoptosis como se vio con el platino. (14)

En 1989 (Ellender y Ham) se reportó un estudio en el cual se implantaron microesferas acopladas a plata en el tejido conjuntivo de rata y detectaron una reacción inmediata que consistió en una necrosis localizada e infiltración celular. Los fibroblastos modificaron severamente su ultraestructura y la matriz extracelular sufrió un proceso de disrupción. Adicionalmente se encontraron fibras colágenas en el interior de

vacuolas citoplasmáticas indicativas de una fuerte interferencia en la biosíntesis del colágeno. (15)

Rungby (1990) muestra que al exponer ratas en periodo fetal y adultas a la plata resulta en depósitos del metal en diferentes estructuras del sistema nervioso central. Además la toxicidad se midió a nivel celular y se encontró que causa necrosis por coagulación, bioquímicamente causa un incremento en la peroxidación de lípidos (16)

Kameta (1979) realizó un estudio donde se hizo tratamiento sobre caries en dientes anteriores y al grupo experimental se le aplicó fluoruro de plata amoniacal y al grupo testigo se le aplicó agua oxigenada; aunque los porcentajes de severidad del avance superficial y en profundidad de las cavidades son menores para el grupo de DAFP, los investigadores no encontraron que hubiera diferencia estadísticamente significativa, argumentando que el número de sujetos fue limitado. (10)

Algunos estudios clínicos nos conducen a pensar que si el DAFP es aplicado sobre caries incipientes, con tubulos dentinales expuestos, este puede difundirse hasta la pulpa produciendo una injuria severa; reconociendo que la permeabilidad dentinal no es uniforme en todo el diente, siendo mucho mayor sobre la dentina oclusal específicamente sobre los cuernos pulpares. La rata por medio de la cual los químicos se difunden a la dentina depende de la interacción entre los mecanismos hidrodinámicos en la dentina y la pulpa, además de la interacción con las fibras nerviosas. Este último componente es importante, pues el mecanismo de defensa pulpar, no solo involucra el selle de tubulos dentinales sino también involucra eventos de defensa intrínsecos, producto de la degeneración de las terminales nerviosas pulpares (Pashley, 1991). (17)

Hosoya (1990) realizó un estudio sobre pulpas expuestas en perros, realizando una cavidad pequeña en los molares. Al grupo experimental (28 dientes), se le aplicó 0.01 ml de diamino fluoruro de plata al 38%

durante 3 minutos, al grupo control no se aplicó ninguna solución. Los especímenes se procesaron histopatológicamente a los 3, 7 y 30 días, a los 3 días, en los dos grupos, se mostraron cambios histopatológicos como necrosis, inflamación supurativa, infiltración celular, sangrado e hiperemia; a los 7 días, en los dos grupos, se encontró necrosis parcial, inflamación supurativa, sangrado e hiperemia pulpar (en porcentajes menores que el grupo anterior); después de 30 días los porcentajes de inflamación supurativa e inflamación disminuyeron en los 2 grupos. Se concluye que el diamino fluoruro de plata al 38% no muestra ningún efecto protector sobre las pulpas dentales. (12)

Rodriguez (1996) realizó un estudio, sobre dientes temporales, en niños entre 2 y 4 años, que presentaban lesiones cariosas que comprometían dentina, revisó 80 pacientes, con antecedentes de aplicación de diamino, en el estudio también se aceptaron pacientes que solo presentaban lesiones cariosas sobre esmalte. Los resultados fueron los siguientes: 74 pacientes con destrucción generalizada, 40 pacientes con abscesos dentoalveolares, 30 pacientes con fistulas, 15 pacientes con edema facial. Concluye que el empleo del diamino debe ser precedido de un buen diagnóstico, teniendo en cuenta la profundidad de la lesión. (11)

Acerca del flúor, Helgeland (1976) muestra que sobre cultivos celulares el flúor exhibe un incremento en el efecto de citotoxicidad dependiendo de la acidificación del medio de incubación. Se sugiere que el flúor y un bajo pH pueden jugar un papel decisivo en la citotoxicidad de materiales que incluyan flúor. Además se observa un incremento en la actividad glicolítica en presencia del flúor cuando hay disminución del pH. (44) Zeiger (1993) describe que altas concentraciones de flúor inhiben el crecimiento a su vez la síntesis de DNA y proteínas en células mamíferos. (18)

En cuanto a su toxicidad algunas casas comerciales consideran la toxicidad del DAFP casi igual a la del fenol o la formalina. (19) Yu-Chang et al, en 1998, evaluó in vitro sobre fibroblastos pulpares humanos la

citotoxicidad (por medio de una prueba de fluorescencia) y genotoxicidad (prueba de precipitación de DNA) de varios medicamentos que se utilizan dentro de canales pulpares, entre ellos evaluó compuestos fenólicos, mostrando que estos reducen el contenido de ácido polinucleico de doble cadena de los fibroblastos en un periodo de 24 horas de cultivo, este fenómeno es dependiente de la concentración administrada, así pues, para el DAFP no es ninguna ventaja tener una toxicidad similar al fenol. (20)

Otras casas comerciales aconsejan diluirlo con agua destilada "para minimizar su acción sobre la pulpa". Desafortunadamente ni los fabricantes ni en la literatura en general, reportan ningún estudio que muestre la toxicidad de este material.(21)

Por medio de la curva de la calibración realizada según el protocolo del kit Cytotox 96 y observación directa se determino que el número celular optimo a sembrar era de 12.000 células por pozo para una caja de cultivo de 96 pozos.(22)

En los ensayos en los que se utilizo formocresol, con el objeto de usarlo como control positivo de Cytotox, se determino que la toxicidad de este no puede ser medida por medio del kit de Cytotox 96, ya que se encuentra datos incoherentes al realizar la lectura, lo que sugiere que hay interferencia con el medio de cada pozo. Además se observa directamente turbidez en cada pozo, al parecer provocada por la reacción entre el sustrato de la LDH y los componentes del formocresol. El porque de la interferencia, es difícil de explicar debido a que se desconocen los componentes de la mezcla de sustrato del kit de Cytotox 96.

En las pruebas iniciales con el kit de cytotox 96 con el DAFP se utilizaron concentraciones de 1:10 (0.38 %), 1: 20 (0.19 %), 1: 40 (0.09 %), 1: 80 (0.04 %), 1: 160 (0.02 %), 1: 320 (0.01 %) y 1: 640 (0.005 %) y se evaluó con el kit de Cytotox 96.

Los tiempos de exposición inicialmente utilizados fueron de 60 minutos, 30 minutos,

15 minutos; después de varias pruebas se encontró que se presentaba una interferencia al realizar la lectura, la cual se atribuyo a una reacción entre el DAFP y las proteínas del SFB. Al observar los pozos se veía un precipitado, la densidad de este variaba según la concentración de DAFP que era utilizada, por lo tanto se decidió disminuir el tiempo de exposición.

Posteriormente se utilizo las mismas concentraciones a tiempos de exposición de 15 y 30 minutos, pero debido a que se siguió presentado la interferencia con el medio, se decidió hacer la evaluación por conteo directo usando azul de trypan. Al realizar el experimento completo y hacer el conteo celular con cada dilución de DAFP se determino que en todas las concentraciones utilizadas se observa muerte celular. Debido a los resultados encontrados se utilizaron diluciones mayores.

Realizando diluciones mayores de DAFP, 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0,009%), 1/800(0.004), 1/1600 (0.002%), se evidencia por conteo directo con azul trypan, que el número de células muertas va disminuyendo a medida aumenta la dilucion del DAFP, y a partir de las dilucion 1/400 (0.009%), se presentan células vivas, además el número de éstas va aumentando a medida que aumenta la dilución del DAFP.

Se observa que en la mayor concentración de DAFP, el promedio de células muertas (14.432 cel /pozo) es mayor que el sembrado (12.000 cel/pozo), esto seguramente es debido a que la disrupción de la monocapa es tan severa que lo que se puede estar contando son desechos celulares más que células.

En vista de la dificultad de encontrar información sobre el agente y los resultados encontrados en este estudio, se plantea la necesidad de realizar otros estudios de biocompatibilidad , antes de iniciar su uso en forma masiva.

CONCLUSIONES

1. La toxicidad del DAFP es imposible de determinar con el kit de Cytotox 96 (prueba colorimétrica)
2. El efecto del DAFP sobre la monocapa celular es similar a los diferentes tiempos de exposición utilizados (60 min, 30min, 15 min y 1 min) por lo tanto el procedimiento se realizo a un minuto de exposición.
3. Al aplicar las diferentes diluciones de DAFP sobre los pozos con las células HeLa se evidenció una grave disrupción de la monocapa celular.
4. El uso del método de exclusión de azul trypan, aunque simple fue de gran utilidad para la evaluación de la toxicidad del DAFP.
5. En los grupos experimentales, el número de células muertas va disminuyendo a medida que aumenta la dilución del DAFP.
6. A partir de la dilución 1/400 se observa la presencia de algunas células vivas y el número de estas aumenta a medida que aumenta la dilución de DAFP utilizada.
7. El test de comparación de medias, DMS (minima diferencia significativa) encontró diferencia significativa entre la concentración 1/50 y 1/100; 1/100 y 1/200; y 1/400 y 1/800.

RECOMENDACIONES

1. Continuar específicamente con más estudios de biocompatibilidad, antes de iniciar el uso del DAFP en forma masiva.
2. Plantear un estudio de citotoxicidad sobre cultivos primarios de fibroblastos de pulpa.
3. Investigar la penetración del DAFP en dentina desmineralizada y su reacción dentina cariada.

4. Comparar la toxicidad del DAFP con otros materiales que han demostrado mejor comportamiento como es el caso de los barnices fluorados.

BIBLIOGRAFIA

1. SHELLIS, R.P; DUCKWORTH, R.M. Studies on the Cariostatic Mechanism of Fluoride. *International Dental Journal*, (1994) 44, 263 - 27
2. OGAARD, B. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression In vivo. *J Dent Res* 69 (Spec Iss): 813 - 819, February, 1990
3. RAWLS, H.R. Preventive Dental Materials: Sustained Delivery of Fluoride and Other Therapeutic Agents. *Adv Dent Res* 5:50 - 55, December, 1991
4. MC DONALDS,S.P; SHEIHAM, A. A Clinical Comparison of Non-Traumatic Methods of Treating Dental Caries. *International Dental Journal* (1994) 44, 465 - 470.
5. KLEIN, H. Y COL. Study of Dental Caries. *J.A.D.A.* Vol 29 (11). August 1, 1942.
6. INGRAM, G.S: y Col. Interaction of Zinc with Dental Minerals. *Caries Res.* 1992; 26: 248-253.
7. MILLER, W.D. Y COL. Preventive Treatment of the Teeth, with Special Reference to Silver Nitrate. *The Dental Cosmos.* Vol XLVII. 64. August 1905.
8. BARREIRO, A; ALVAREZ, C. Remineralización Dentinaria. *Rev- Actual-Estomato-Esp.* 1984, May: 44(337).
9. CRAIG, G.G. Y COL. Caries Progression in Primary Molars: 24 Months Results from a Minimal Treatment Programme. *Oral Epidemiol.* :9(6) 260-265. Diciembre 1981.
10. KAMETA, FERNANDEZ. Acción del fluoruro de plata a moniacal en dientes anteriores de la primera dentición con lesiones cariosa. *Revista Científica, Técnica y cultural.* Organó oficial de la Facultad de Odontología Universidad Nacional Autónoma de México. # 25 Vol. VII, Septiembre-Octubre 1979.
11. RODRIGUEZ DE PADILLA, Ludy. Complicaciones por uso Inadecuado de Fluoruro Amino Plata en Odontopediatría.

- Acta Odontologica, Octubre 1997. (La Paz-Bolivia).
12. HOSOYA Y, ARITOMI K, GOTO G. Pulpal response to diammine silver fluoride. (2). Application on exposed pulps. Shoni Shikagaku Zasshi 1990 28:2, 327-37.
 13. CRAIG.Robert,G.Restorative.Dental Materials.Ninth Edition. Mosby 1993
 14. SCHEDULE et al. Metal ion induced toxic histamine release from human basophils and mast cells .J Biomed Mater Res,1998.mar 15 39:4,560-7
 15. ELLENDER G, HAM KN, Connective tissue response to some heavy metals III. Silver and dietary supplements of ascorbic acid. Histology and Ultrastructure.Br. J Exp. Pathol 1989,feb 70:1,21-39
 16. RUNGBY J.An Experimental Study on silver in the Nervous system and on aspects of its general cellular toxicity.Dan Med Bull 1990,Oct 37:5, 442-9
 17. PASHLEY.Correlaciones Clínicas de Estructura y Función Dentinales.Journal of Prosthetic dentistry,1991.
 18. HELGELAND K, LEIRSKAR J. PH and the cytotoxicity of fluoride in on animal cell aulture system. Scand. J. Dent. Res. 1976: 84: 37-45.
 19. BOLETÍN FAGAMIN. Argentina.
 20. YU-CHAO CHANG et al. In vitro Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Medicines on Human Pulp Fobroblasts. J. Of De. Vol 24 # 9. Sep 1998.
 21. BOLETÍN LABORATORIO NAF. Argentina.
 22. PROMEGA. Technical Bulletin. CytoTox 96 Non radioactive Cytotoxicity Assay. Promega Corporation 1997.

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 A. Vista panorámica de un pozo (x 10), a las 24 horas después de haber sido sembrado con 12.000 células HeLa. Mayor confluencia hacia el centro.	72
Figura 1 B. Aspecto morfológico células HeLa (x 4): predominan las formas dendríticas. (flecha). Presencia de artificios. (2 flechas)	72
Figura 2. Curva de calibración entre el número celular y la de absorbancia obtenida para cada una de ellas.	73
Figura 3 A. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución 1/50. A mayor aumento(x20)Se observan células teñidas con azul trypan (flechas)y gran cantidad de desechos celulares en el fondo.	77
Figura 3 B. A menor aumento. (x10)	77
Figura 4.A. Vista de las células HeLa dentro del pozo (x10), al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución1/100.Se observa una gran disrupción de la monocapa.	78
Figura 4.B. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución 1/100.	78
Figura 5.A Vista de las células HeLa dentro del pozo, al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución1/400. No hay integridad de la monocapa.	78
Figura 5.B. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución 1/400. Se empieza a observar células birefringentes (flechas).	78
Figura 6. A. Vista de las células HeLa dentro del pozo, al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución 1/800. El desintegración de la monocapa no es tan severa como la observada en diluciones mayores.	79
Figura 6. B. Conteo celular en microscopio invertido, dilución 1/800. El número de células birefringentes aumenta.	79

Figura 7	Numero células muertas con las diferentes diluciones de fluoruro de plata. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media.	80
Figura 8.	Número célula vivas con las diferentes diluciones de diamino fluoruro de plata. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media.	80
Figura 9	Relación entre el porcentaje de células muertas en cada dilución utilizada, teniendo como referencia el promedio de células vivas en el control.	81

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Promedio de absorbancia para cada concentración celular.	73
Tabla 2. Resultado de los Conteos de Células Posterior al Tratamiento con DFAP.	79
Tabla 3. Grupos experimentales y promedio de celulas muertas	81
Tabla 4. Valores de la prueba F para los grupos experimentales	82
Tabla 5. Datos de estadística descriptiva para los datos de celulas muertas en cada grupo experimental	82

INTRODUCCION

Desde el siglo XIX el control de la caries ha sido una de las mayores metas en nuestra profesión. Diferentes métodos se han utilizado, ya sean químicos, nutricionales o mecánicos. Pero uno de los materiales más utilizado ha sido el flúor. Investigaciones desde principio de siglo se han realizado gracias al hallazgo clínico de su actividad anticaries en trabajadores que tomaban agua fluorada. (Volker 1939)

En el tratamiento de la caries el flúor se ha usado en forma sistémica y topica. Dentro del primer grupo se utiliza la fluorización del agua, la sal, leche y los suplementos fluorados. Dentro del segundo grupo se utilizan diferentes tipos de productos como geles, pastas profilacticas, dentífricos, enjuagues y barnices.

Por muchos años se ha tratado de explicar la acción del flúor; diferentes estudios Guggenheim, 1984; Leach 1986; Ten Cate, 1989; mostraban que la acción del flúor se basa primordialmente en la inhibición de la desmineralización en la superficie de los cristales y en la remineralización de la subsuperficies de las lesiones. Conceptos modernos, Thylstrup, Fejerskov, 1994; enfatizan la importancia de establecer y mantener una concentración significativa de flúor en saliva y placa fluida para controlar la disolución del esmalte

Además del fluor, diferentes agentes se han estudiado, entre estos se encuentran el nitrato de plata. trimetrofosfato, difosfatos y el zinc.

El nitrato de plata es un agente que se ha utilizado desde 1891, pero solo hasta 1969 Yamaga desarrolla el fluoruro de plata amoniacoal que incorpora la acción del

flúor y no contiene el ion nitrato, solución denominada fluoruro de plata amoniacal. Yamaga en 1970 desarrolla el diamino fluoruro de plata. Entre sus indicaciones se encuentra como agente cariostático en niños y para tratamiento de la hipersensibilidad en adultos.

Aunque la literatura sobre el tema es escasa; diferentes estudios en el campo clínico se han realizado sobre esta agente en Japón, Argentina y Brasil; pero acerca de su toxicidad es muy poco lo que se encuentra; en Colombia este agente no se encuentra disponible comercialmente.

En el país se busca iniciar su utilización a nivel masivo, por lo tanto es de gran importancia el realizar estudios de biocompatibilidad; buscando evaluar los efectos biológicos de este material in vitro.

El documento 41 de la ANSI/ADA describe diferentes estados de pruebas de biocompatibilidad, el inicial, secundario y los test preclínicos. Entre las pruebas iniciales se encuentran los test de citotoxicidad que miden el efecto de productos de desecho de materiales dentales. Estos procedimientos son no tóxicos, estériles, reproducibles, rápidos y no costosos.

El objetivo de este estudio es medir la toxicidad in vitro del diamino fluoruro de plata, sobre monocapas de células HeLa, detectando su capacidad de producir efectos deletéreos sobre material biológico.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION:

Determinar el efecto del diamino fluoruro de plata sobre la viabilidad de células HeLa en cultivo

1.1 DESCRIPCION:

El diamino fluoruro de plata al 38 % es una solución tópica de uso odontológico, al que se le atribuyen propiedades remineralizantes y desensibilizantes en dientes con lesiones cariosas.

El diamino fluoruro de plata es un material, que se ha utilizado en países como Japón, Argentina y Brasil, con fines preventivos. La literatura sobre el tema es muy escasa y estudios de citotoxicidad no se encuentran. En Colombia se quiere implementar su uso en forma masiva, por lo cual se busca realizar un estudio del comportamiento de éste agente usando como sustrato biológico líneas celulares cultivadas, para evaluar su toxicidad in vitro.

1.2 FORMULACION

Cuál sera el efecto de diferentes diluciones del DIAMINO FLUORURO DE PLATA sobre la viabilidad de células HeLa en cultivo?

1.3 SISTEMATIZACION

Será que las diferentes concentraciones del diamino fluoruro de plata sobre los cultivos celulares mostraran diferencia en la respuesta de toxicidad celular?

Será que los diferentes tiempos de exposición del diamino fluoruro de plata sobre los cultivos celulares presentaran diferencia en la respuesta de toxicidad celular?

Será que el comportamiento del diamino fluoruro de plata es diferente al formocresol sobre los cultivos de células HeLa ?

2. JUSTIFICACION:

El diamino fluoruro de plata es un agente que actualmente se utiliza en diferentes paises, de forma tópica, en niños pequeños para la detención de la caries y para la hipersensibilidad dentinal en paciente adultos.

Diferentes investigaciones en el campo clínico se han realizado sobre este material, pero estudios de compatibilidad inicial no se encuentran dentro de la literatura disponible sobre este. Por lo tanto se cree de importancia iniciar una línea de investigación sobre el diamino fluoruro de plata, este trabajo tiene el propósito de realizar un estudio de toxicidad sobre células HeLa, utilizando una prueba no radiactiva que mide la cantidad de lactato deshidrogenasa que es liberada durante la lisis celular y la prueba de exclusión de azul trypan para la evaluación de la presencia de células vivas y células muertas.

3. PROPOSITO Y OBJETIVOS:

3.1. PROPOSITO

El propósito de este estudio es conocer el efecto del diamino fluoruro de plata la viabilidad de células HeLa cultivadas.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1 GENERAL:

- Evaluar el efecto del diamino fluoruro de plata in vitro sobre la viabilidad de células HeLa cultivadas.

3.2.2 ESPECIFICOS:

- Estandarizar una prueba no radiactiva de citotoxicidad in vitro.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del diamino fluoruro de plata sobre la proliferación o supervivencia de células HeLa.
- Describir el efecto de diferentes tiempos de exposición del diamino fluoruro de plata sobre la proliferación o supervivencia de células HeLa.
- Evaluar el comportamiento del formocresol como control positivo.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 MARCO TEORICO

4.1.1 PULPA

El componente de tejido conectivo no mineralizado que mantiene a la dentina es la pulpa, la cual ocupa la porción central del diente y presenta comunicación con el ligamento periodontal por el foramen apical, por el cual penetra y sale el sistema vasculonervioso de la pulpa. La comunicación entre la pulpa y el periodonto también ocurre por los conductos laterales que se ubican a lo largo de la superficie lateral de la raíz.

ZONAS MORFOLOGICAS DE LA PULPA

En el tejido pulpar se distinguen histológicamente varias zonas:

1. Zona odontoblástica en la periferia pulpar.
2. Zona libre de células (Capa de Weil).
3. Zona rica en células.
4. Centro pulpar, donde hay gran cantidad de vasos sanguíneos y nervios pulpares.

Las principales células de la pulpa son odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas y macrófagos.

Odontoblastos. ubicados en la periferia pulpar. Son las células más distintivas de la pulpa, forman una sola capa que recubre la periferia y poseen una prolongación que se extiende dentro del túbulo dentinal.

La prolongación celular del odontoblasto comienza en su mismo cuello, donde empieza a estrechar gradualmente su diámetro a medida que pasa desde la preentina a la dentina mineralizada.

Fibroblastos. Son células especialmente numerosas en la parte coronaria de la pulpa donde forman la zona rica en células. La función de los fibroblastos es formar y mantener la matriz, la cual consiste de colágeno y sustancia fundamental. Los fibroblastos también tiene la capacidad de ingerir y degradar colágeno cuando se les estimula adecuadamente.

Células Mesenquimales Indiferenciadas. Representan la "pool" celular a partir de la cual se derivan otras células conectivas de la pulpa. Dependiendo del estímulo, estas células pueden originar fibroblastos u odontoblastos. Estos son encontrados a través de la zona rica en células y en el núcleo pulpar y frecuentemente están relacionadas a los vasos sanguíneos.

Otras células inmunocompetentes. A parte de las células asociadas con los elementos neural y vascular, existen tres tipos de células, que se consideran residentes normales de la pulpa dental: Los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos.

Fibras. Son principalmente tipo I y tipo III. En pulpas jóvenes las fibras de colágeno son encontradas esparcidas entre las células pulpares.

Sustancia fundamental. Esta compuesta principalmente de glicosaminoglicanos, glicoproteínas y agua; los cuales soportan las células y actúan como el medio de transporte de nutrientes desde los vasos sanguíneos hasta las células y metabolitos desde las células hasta los vasos sanguíneos (1,2)

4.1.2 DENTINA

La dentina es un tejido mineralizado que se origina del epitelio dental interno y es parte constituyente de los dientes; actúa como cubierta protectora y sensorial del órgano pulpar y provee soporte mecánico al esmalte que lo cubre.

En cuanto a su composición el 68% corresponde a la porción inorgánica formada principalmente por un complejo de hidroxiapatita que lo hace el segundo tejido del cuerpo humano más mineralizado después del esmalte. La porción orgánica es aproximadamente el 22% de la dentina y esta constituida en su mayor parte por colágeno tipo I que es producido por el núcleo de las células odontoblasticas. Este colágeno forma una matriz fibrilar, sobre la cual se van a depositar los cristales de hidroxiapatita.

Otras proteínas no colágenas de la matriz son las fosfoproteínas como las fosforina, que interactúa en el control de la rata y lugar de mineralización de la dentina. El 10% restante de la composición de la dentina es agua.

Según la localización de la dentina dentro del diente, se pueden clasificar en dentina del manto, dentina interglobular, dentina circumpulpar y predentina .

La dentina del manto es la primera dentina que se forma, es la mas periférica de la corona del diente y esta constituida por fibras colágenas largas. Su espesor es de aproximadamente 20 μm y esta delimitada por la unión amelodentinaria y la dentina interglobular. Esta ultima corresponde a una zona hipomineralizada por encima de la dentina circumpulpar. Las fibras de la dentina del manto hacen husos dentro del esmalte uniendose en esa zona los dos tejidos por retención mecánica y sensibilidad.La dentina circumpulpar es aquella depositada sobre toda la interfase

pulpo-dentinal interna de manera circumpulpar, cuyo depósito rítmico dejando unas líneas de incremento

Entre la capa odontoblástica y el frente de mineralización de la dentina circumpulpar se encuentra la pre dentina cuyo espesor es de 5 - 10 μm y es tejido sin mineralizar (2,3).

En la dentina radicular se diferencia la capa granular de Tomes que se encuentra a lo largo de la unión cemento dentinal constituyendo una capa hipomineralizada que se une orgánicamente con el cemento (4)

Según la etapa de formación de la dentina, se puede diferenciar la dentina primaria, secundaria, terciaria y esclerótica. La dentina primaria forma la mayor parte del diente y delimita la cámara pulpar. La secundaria es la dentina que se forma después de completarse la formación radicular. Con respecto a la anterior, la formación de la dentina secundaria es continua y más lenta. La dentina terciaria es aquella dentina que se forma como reacción a estímulos nocivos. Presenta un patrón circunferencial en anillos, es amorfa y no tiene túbulos dentinarios. Se debe tener en cuenta, que esta es una dentina no odontoblástica

La dentina esclerótica está asociada al envejecimiento del diente, como mecanismo de protección contra la atrición y el trauma

Según su relación con los túbulos dentinarios se habla de dentina peri e inter tubular. La dentina peritubular es la que circunda a cada túbulo. Esta ausente en los dientes recién erupcionados y no está bien diferenciada en dientes jóvenes.

La intertubular es el mayor componente de la dentina y presenta comunicaciones y anastomosis entre los túbulos. (2,3).

Cada túbulo dentinal es un cono invertido con un diámetro pequeño (0.5 - 0.9 μm) hacia la UDE y grande (2 - 3 μm) hacia la pulpa. La combinación entre la

4.1.3.1 ETIOLOGIA DE LA CARIES DENTAL

Por lo general se acepta que la etiología de la caries dental es un problema complejo, complicado por muchos factores indirectos que oscurecen la causa o causas directas. No existe una opinión universalmente aceptada acerca de la etiología de la caries dental. Sin embargo, tres teorías importantes han evolucionado a través de años de investigación y observación: la teoría acidógena (teoría química-parasitaria de Miller), la teoría proteolítica y la de proteólisis-quelación. (5,7,8)

Thylstrup,1993, ilustra la relación entre la placa dental y multiples determinantes biológicos que influyen en el desarrollo de la lesión cariosa.(6)

4.1.3.1.1 LA TEORIA ACIDOGENA

Varios investigadores anteriores a Miller hicieron importantes contribuciones al problema de la etiología de la caries. Una de las primeras observaciones fue la de Leber y Rotenstein, quienes en 1867, informaron el descubrimiento de microorganismos en las lesiones cariosas y sugirieron que la caries dental se debía a la actividad de las bacterias productoras de ácido. Clark (1871, 1879), Tome (1873) y Magitot (1878) coincidieron al creer que las bacterias eran esenciales para la caries, la cual era producida por ácidos, aunque sugirieron una fuente exógena de estos últimos.

W.D.Miller, probablemente el más conocido de los primeros investigadores de la caries dental, publicó en forma extensa los resultados de dichos estudios, que empezaron en 1882. Culminaron en la siguiente hipótesis en la cual se estableció: "La caries dental es un proceso químico-parasitario que consiste de dos etapas, la descalcificación del esmalte, la cual da como resultado su total destrucción, y la

descalcificación de la dentina, como una etapa preliminar, seguida por la disolución de los residuos reblandecidos. El ácido que afecta a esta descalcificación primaria se deriva de la fermentación de los almidones y de los azúcares que se almacenan en los centros retentivos de los dientes". (5,7,8)

4.1.3.1.2 LA TEORIA PROTEOLITICA

Baumgartner (1911) y Fleischmann (1914. 1921) demostraron que los microorganismos podían invadir a las láminas del esmalte y creyeron que los ácidos producidos por estas bacterias podían destruir la porción inorgánica del esmalte. Gottlieb (1944) y Gottlieb, Diamond y Applebaum (1946) postularon que la caries esencialmente es un proceso proteolítico: los microorganismos invaden las vías orgánicas y las destruyen en su avance. Admitieron que la formación del ácido acompaña la proteólisis: entre menor cantidad de láminas estén afectadas, mayor número de vainas de los bastones del esmalte están lesionadas. La base de esta teoría ha sido el aislamiento de la cavidad bucal de bacilos gramnegativos capaces de producir la enzima sulfatasa, que libera al ácido sulfúrico combinado a partir de la mucoproteína. Supuestamente, el ácido liberado disuelve el esmalte, combinándose con el calcio para formar sulfato de calcio. Es interesante que este compuesto se ha encontrado en el esmalte cariado pero no en el sano. (5,7,8)

4.1.3.1.3 TEORIA DE LA PROTEOLISIS-QUELACION

La teoría proteólisis-quelación de la caries dental, como fue propuesta por Schatz, establece que el ataque bacteriano al esmalte, iniciado por los microorganismos queratinolíticos, consiste en un trastorno de las proteínas y otros componentes orgánicos del esmalte, principalmente de la queratina. Esto produce sustancias que pueden formar quelatos solubles con el componente mineralizado del diente y por tanto descalcifica el esmalte en un pH neutro e incluso alcalino. El esmalte también contiene otros compuestos orgánicos junto con la queratina, como los

mucopolisacáridos, los lípidos y el citrato, que pueden ser susceptibles al ataque bacteriano y actuar como quelantes.

La teoría proteólisis-quelación resuelve los argumentos en cuanto a que si el ataque inicial de la caries dental es en la porción orgánica o inorgánica del esmalte, estableciendo que ambos pueden ser atacados en forma simultánea. Pero se deben hacer diversos ajustes si se acepta la teoría de proteólisis-quelación. Estos incluyen: 1) la observación del aumento en la frecuencia de caries con el incremento en el consumo de azúcar; 2) la observación de una elevación del número de lactobacilos con un alza en la actividad de la caries, y 3) la observación de la disminución en la frecuencia de caries seguida por la administración tópica o sistémica de fluoruro.(5,7,8)

4.1.3.1.1.4 TEORIA ACTUAL

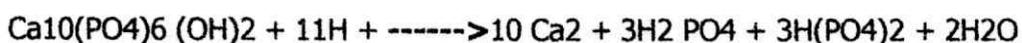
Fejerskov1986, citado por Thylstrup, ilustran un modelo que muestra la relación entre el factor etiologico, la placa dental,; los factores determinantes biológicos (saliva, composición de la dieta, microorganismos) que son aquellos que por si solos no causan perdida de mineral (si la placa dental no esta presente), pero influyen en el desarrollo y progresión de la perdida de mineral. Es importante considerar que una variación extrema en cualquiera de estos determinantes, influiria fuertemente en el desarrollo de la lesión cariosa. Además añade a este modelo los factores de confusión como son factores de comportamiento y socioeconómicos; los cuales no son siempre iguales en todas las sociedades. Se hace aparente que solo cuando se trata de remover los depositos microbianos es posible ignorar el rol de los factores determinantes.

4.1.3.2 **DESARROLLO DE LA LESIÓN INICIAL EN LA CARIES.**

Mientras exista equilibrio entre diferentes factores del medio ambiente oral y los tejidos duros del diente, éste se mantiene intacto, desde el punto de vista químico se trata de mantener en equilibrio los iones de calcio, fosfato, grupos hidróxilos. Si

las fases líquida (saliva, fluidos gingivales) y sólida (esmalte) se encuentran en igual saturación, ni el esmalte se disuelve ni la saliva se mineraliza.

El proceso de la caries dental se inicia con la fermentación bacteriana de los carbohidratos y consiguiente producción de ácidos orgánicos. Como resultado de ello el pH baja. La caída inicial del pH puede ser contrarrestada por la capacidad neutralizadora, "buffer", de la saliva mediante su sistema de bicarbonatos, fosfatos y proteínas; por la capacidad neutralizadora de la porción orgánica de la placa dento-bacteriana (10 veces mayor que la de la saliva por ml); y cuando están presentes por la capacidad neutralizadora de pequeños cálculos dentales (100 veces mayor que la de la saliva). Su capacidad neutralizadora es el resultado del alto consumo de hidrógeno requerido para la disolución de fosfatos de calcio (apatitas).



Cuando hay disolución de cálculos, la concentración de calcio y fosfato en solución aumenta, por lo tanto la fase acuosa permanece saturada con respecto a las apatitas del esmalte a un pH crítico (5.4) Esto explica por qué no se forman lesiones de caries dental por debajo de cálculos dentales.

Cuando el pH está por debajo del nivel crítico la fase acuosa se encuentra subsaturada con relación a las apatitas del esmalte y supersaturada en relación con las fluorapatitas, situación que con el tiempo puede conducir a la aparición de la lesión clínica. A medida que el pH de la fase acuosa aumenta después del ataque inicial, la solución queda de nuevo supersaturada con relación a la apatita del esmalte y el mineral recientemente disuelto tiende a reprecipitarse. Sin embargo, como existe la posibilidad de que algunos minerales se hayan difundido del esmalte subsuperficial y de la parte interna de la placa dento-bacteriana no estén disponibles para su reprecipitación y en consecuencia haya pérdida de minerales del esmalte. Si estos cambios ultraestructurales, no visibles, continúan en el tiempo, el resultado es la lesión visible de la caries dental. Períodos de disolución a bajo pH alternan con

períodos de reprecipitación parcial cuando aumenta el pH, si los primeros son mayores el resultado neto es la lesión clínica, "la mancha blanca", como ya se indicó. Resulta de la difusión de ácidos hacia el interior y de calcio y fosfato hacia el exterior. (El esmalte intacto es permeable a iones pequeños). Antes de la aparición de la mancha blanca la zona más externa del esmalte muestra a nivel ultraestructural señas de disolución. Esta disolución se manifiesta como la lesión de caries dental y como erosión del esmalte. (Ambos fenómenos sólo se observan después de la aparición de los dientes en la boca). Caries dental se define como "la disolución química de los tejidos duros del diente por la acción de ácidos orgánicos resultantes del metabolismo bacteriano de azúcares de bajo peso molecular". La lesión erosiva es "el resultado de la disolución química de la sustancia dental por otros agentes químicos".

La apariencia clínica es diferente. En caries dental siempre se observa una lesión subsuperficial, zona de pérdida de minerales, con una zona superficial externa bien mineralizada. En la lesión erosiva se observa la pérdida de las capas del esmalte del exterior hacia el interior. La disolución del esmalte puede ser el resultado de dos situaciones químicas diferentes. En una, la fase acuosa que rodea al diente se encuentra subsaturada en relación hidroxapatita y supersaturada en relación fluorapatita. En consecuencia, la hidroxapatita subsuperficial se disuelve y se forma fluorapatita en la zona externa del esmalte. A mayor supersaturación con relación a la fluorapatita mayor incorporación de flúor en la superficie externa del esmalte, mejor mineralizada esta zona y menor pérdida de minerales de la lesión subsuperficial. Cuando el pH se encuentra por encima de 6, todos los fluidos orales se encuentran supersaturados en relación con la hidroxapatita y la fluorapatita, es de esperar que bajo estas circunstancias haya formación de cálculos y reprecipitación de minerales sobre la superficie del esmalte.

Cuando el pH se encuentra en el rango crítico de 5.5 - 4.5, la saliva se encuentra subsaturada con relación a hidroxapatita y supersaturada con relación a la fluorapatita, consecuentemente ocurre caries dental por desmineralización.

Concentraciones de flúor tan bajas como 0.1 ppm en los fluidos orales produce esta supersaturación en relación con la fluorapatita. Esta es la concentración fisiológica del flúor presente en saliva.

La saliva a bajo pH permanece supersaturada en relación con fluorapatita y subsaturada en relación hidroxapatita. Caídas del pH entre 5.5 y 4.5 implican disolución de la hidroxapatita subsuperficial y formación de fluorapatita en la zona desmineralizada disminuyendo en consecuencia la pérdida total de minerales del diente.

Este tipo de remineralización es parte del proceso de la caries dental y explica en consecuencia la mayor concentración de flúor en la zona externa, en la lesión inicial de la caries dental, este efecto es mayor si se aumenta la concentración del flúor en el medio ambiente.

La otra circunstancia está caracterizada por subsaturación de hidroxapatita y fluorapatita, en consecuencia se disuelven ambas. Clínicamente se manifiesta como una erosión. Los jugos de frutas ácidas (naranja, limón, toronja), bebidas gaseosas son subsaturadas en relación con ambas apatitas y por lo tanto pueden causar lesiones erosivas.(6,9,10)

Reacciones de la dentina a la progresión de la caries

Los cambios en la dentina durante la progresión de la caries no pueden ser entendidos, sin tener en cuenta la extensión de la lesión de esmalte. La reacción más común de defensa del órgano dentino-pulpar es la esclerosis tubular, lo que requiere la presencia de odontoblastos vitales. La esclerosis observada en conjunto con la caries se ha descrito ya sea como el resultado de mineralización inicial del espacio peritubular seguido de la calcificación de los procesos odontoblastico; o del inicio de calcificación intracitoplasmática seguida de una mineralización periodontoblastica secundaria. En la literatura se denota con el nombre de dentina translúcida o zona translúcida. Los cambios iniciales de la dentina, al aumentar la desmineralización del esmalte son a nivel bioquímico e histoquímico. La esclerosis

tubular es vista antes de que la lesión de esmalte alcance la unión amelo-dentinal, cuando alcanza este límite se observa el primer signo de desmineralización de la dentina, la coloración pardusca (café). La esclerosis dentinal se observa lateral a la desmineralización como una reacción que se estimula en la dirección de las varillas del esmalte desde las áreas de menor compromiso de la lesión en esmalte acercándose a la unión amelo-dentinal. Cuando la desmineralización de la dentina se acerca a la pulpa en una distancia entre 0.5- 1mm, se pueden observar reacciones inflamatorias en la región subodontoblastica, que son el resultado de los diferentes productos bacterianos. Se asume que cuando cuando la producción de ácido termina en la superficie debido a un disturbio regular o a la remoción de la biomasa cariogénica, entonces no ocurre más desmineralización, produciendo un detenimiento de la progresión de la caries. (6)

METODOS DE CONTROL DE CARIES

No ha faltado investigación en odontología, en particular la que ayuda a una mejor comprensión del proceso carioso. Aunque no se ha alcanzado o aproximado al ideal, existen logros definitivos en el campo del control de la caries. Hay métodos para producir una reducción sustancial en la caries dental, teniendo en cuenta que el paciente puede ser educado en forma apropiada.

Los métodos más prometedores del control de la caries se pueden clasificar en tres tipos generales: 1) medidas químicas, 2) medidas nutricionales, y 3) medidas mecánicas.

MEDIDAS QUIMICAS DE CONTROL DE CARIES

Se han propuesto un gran número de sustancias químicas con el propósito de controlar la caries dental. El uso de algunas de éstas se ha basado en las pruebas experimentales sanas; el uso de otros ha sido puramente empírico y sin que exista un fundamento científico. Estas sustancias químicas incluyen: 1) las que alteran la superficie o la estructura del diente; 2) sustancias que interfieren con la degradación

de los carbohidratos mediante alteraciones enzimáticas, y 3) sustancias que interfieren con el crecimiento bacteriano y el metabolismo.

Sustancias que alteran la superficie o la estructura dental.

De las sustancias químicas que caen dentro de esta categoría, el flúor parece ser el más prometedor y de allí que se haya probado con más amplitud.

4.1.3.4 FLUOR

Generalidades.

El fluoruro es la forma iónica del flúor (fluorina). Pertenece al grupo de los halógenos con un peso atómico de 19 y número atómico de 9. Es el más electronegativo de los elementos de la tabla periódica.

El interés de la odontología por el flúor se inició hace 80 años cuando se empezó a investigar la causa del esmalte moteado, condición endémica en el sur oeste de los Estados Unidos. Hace 40 años se identificó el flúor en el agua como la sustancia responsable... pero al mismo tiempo se encontró que si la cantidad de flúor presente en el agua de consumo diario oscilaba entre 0.7 y 1.2 ppm, la incidencia de la caries dental disminuía. Las investigaciones que demostraron la eficacia del flúor sistémico, dieron origen a la utilización de este elemento sobre la superficie del esmalte de manera tópica, en forma de pastas dentales, enjuagatorios, gelatinas, barnices, elementos de liberación lenta e impregnado en hilo dental.

Hoy se acepta en general que la acción cariostática del flúor se debe a su capacidad remineralizadora del esmalte e inhibitoria de la producción de ácido por los microorganismos de la placa dento-bacteriana. (6,11)

Metabolismo del flúor.

La mayor cantidad de flúor absorbido es incorporado en los tejidos mineralizados del cuerpo humano y la mayor excreción es por la orina. El 99% del flúor en el

cuerpo humano esta asociado con los tejidos calcificados. No siempre su unión es irreversible, puede reaccionar con otros iones presentes en los fluidos corporales, la principal ruta de eliminación es la orina. Se cree que el flúor eliminado por las materias fecales no es flúor absorbido. La principal fuente de flúor para los humanos es la dieta o la ingestión inadvertida de productos que la contengan.(6)

Toxicidad aguda del Flúor

Cuando grandes cantidades de flúor son consumidas en una única dosis, los primeros efectos que se manifiestan incluyen náusea, vómito, ardor o cólicos. Puede haber excesiva salivación y llanto, debilidad generalizada, parálisis de los músculos de la masticación, espasmos de las extremidades, tetania y convulsiones generalizadas. El pulso puede ser ligero o no detectable. La presión sanguínea frecuentemente cae hacia niveles muy bajos. A medida la respiración disminuye ; se desarrolla una acidosis respiratoria. Los niveles de potasio en el plasma son elevados, indicando un efecto tóxico generalizado en la función de las membranas celulares, arritmias cardíacas pueden desarrollarse en asociación con hipercalcemia. Los niveles de Ca en el plasma disminuyen (5 mg % ó menos) extrema desorientación o coma usualmente precede a la muerte, que puede ocurrir dentro de las primeras horas después de la dosis de flúor. El rango más frecuente citado para "dosis letal" de fluoruro de Na fue dado por *Hodge y Smith* ,1965 (citado por *Cardenas*,1996) que concluyen por medio de un estudio que el rango se encuentra entre 5-10 gr de fluoruro de Na para un hombre de aproximadamente 70 kg corresponde a una ingesta entre 32-64 mg F/kg de peso. (11,12,13)

Fluorosis

Es la mayor preocupación asociada con el uso de dentífricos fluorados y enjuagues, debido a la ingestión excesiva de flúor por niños con la dentición en desarrollo. Problema que fue documentado tempranamente por *Dean* (1942), quien notó que a medida que la concentración de flúor fue incrementada desde niveles muy bajos hacia una ppm; habrá una disminución de cerca 60% en la experiencia de caries por

niño. Las edades críticas en la fluorosis son: del nacimiento a los 5 años de edad para los dientes anteriores y hasta los 8 años para los incisivos y otros dientes permanentes.

Mediante análisis modernos *Ophavg*,1985 (citado por Newburn,1987)ha determinado que la ingesta de flúor en la dieta de niños pequeños en comunidades fluoradas es aproximadamente 0,5 mg. Se concluyó que las comunidades pueden alcanzar el umbral de problema público si el rango de ingesta diaria de flúor en niños pequeños se encuentra entre 0,75-1 mg, lo que es sustentado por el estudio de *Aasonder-Peebler* ,1974 (citado por Newburn,1987).

Se han reportado gran cantidad de estudios acerca de la ingesta de dentífricos o enjuagues en niños pequeños (*Dowell* 81, *Hargreaves* 72, *Hellstrom* 60, *Wei* 1983, *Bell* 85, citado por Newburn,1987) la fracción de flúor introducido en la boca que no es expectorada oscila entre el 0-100%. Un rango de 25% de ingestión puede ser predecido. La cantidad de flúor introducido puede estar en un rango entre 0,1 - 2 mg ; por lo tanto el rango para la ingestión de flúor desde estos productos es desde prácticamente 0-2 mg con un promedio de 0,25 mg

Estas cantidades de flúor no ingerido en la dieta contribuye substancialmente al total de ingesta total diaria. Usando el promedio de retención de 25%, se puede calcular que al cepillarse los dientes 2 veces/día (1 gr de dentífrico ó 1 mg de flúor por cepillado) puede proveer suficiente flúor para igualar se puede predecir por un cepillado o por el uso de un enjuague por día. Cualquiera de estas condiciones juntas con 0,5 mg de flúor provenientes de la dieta puede proveer 1 mg del ion por día, una cantidad que puede causar fluorosis en algunos niños. Problema que se incrementa en áreas fluoradas de altas concentraciones o cuando se utiliza suplementos (tabletas). (13)

El flúor se ha administrado principalmente en dos formas: por medio de suplemento del agua comunitaria y por aplicaciones tópicas.

Mecanismo de acción del flúor tópico.

Se ha especulado mucho al respecto; sin embargo, los conceptos más frecuentes son los siguientes: a) El flúor le confiere mayor resistencia al esmalte, y en consecuencia disminuye la solubilidad del esmalte. Gráficamente se puede representar este concepto de la siguiente manera: Aplicación de flúor > flúor incorporado en el esmalte > resistencia a la caries dental. Esta teoría, que es la más corriente, se basa en el hecho de que niños que viven en áreas con flúor en el agua de consumo exhiben una menor prevalencia a la caries dental que niños que no tienen este privilegio. Por lo tanto, es necesario aumentar la incorporación de flúor en el esmalte durante su formación, esta teoría implica que una vez obtenida la resistencia a la caries dental ésta dura de por vida y que el flúor incorporado durante la fase de mineralización es más efectivo que el aplicado después de la salida de los dientes en la boca. Olvidan los proponentes de esta teoría que el efecto del flúor administrado de esta manera desaparece cuando el paciente abandona el área con flúor en el agua de consumo diario.

b) El flúor interfiere con la disolución del esmalte, para ello debe estar presente en la fase acuosa que rodea el diente, en la saliva y en los fluidos bucales, como consecuencia de ello la solubilidad del esmalte es baja. Gráficamente se puede representar de la siguiente manera: Aplicación de flúor > inhibición de la caries dental > incorporación de flúor en el esmalte. Esto último es el resultado de la inhibición, no el factor inhibitorio. Asume que la cantidad de esmalte que se disuelve es menor cuando la cantidad de flúor en la fase acuosa del diente es menos de 1 ppm. Como el flúor disuelto en los fluidos orales es ingerido al ser absorbido en la mucosa gástrica, reaparece constantemente en los fluidos orales. Esta teoría implica un aporte continuo de flúor, toda la vida y en concentraciones bajas.

La correlación entre estos dos enfoques se puede ilustrar con la siguiente ecuación.

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}(\text{E})_{10}$ $\text{Ca}^{++} + 6\text{PO}_4^{3-} + \text{OH} + \text{F}(\text{E})$ esmalte sólido.

Una teoría no excluye a la otra. Sin embargo, las evidencias epidemiológica, clínica y química muestran que interferir con la disolución del esmalte (efecto tópico) es más importante en la prevención de la caries dental que la cantidad de flúor en el esmalte.

c) El flúor interfiere con el metabolismo de la placa dento-bacteriana, su presencia en ella, de acuerdo con los proponentes del concepto, perturba la capacidad colonizadora de los microorganismos, su crecimiento, multiplicación y actividad metabólica (producción de ácidos a partir de azúcares de bajo peso molecular. In vitro, es posible demostrar la capacidad inhibitoria del metabolismo bacteriano con concentraciones de 100 ppm, pero in vivo la concentración de flúor en saliva y fluidos orales, como ya se indicó, es de pocas ppm, en consecuencia no es de esperar efecto notorio en el metabolismo de la biomasa bacteriana. (10) (11)

Reacciones del Flúor con el esmalte

El ión en solución acuosa tiene alta afinidad por el esmalte. Depende de factores como: concentración del flúor en solución, pH, tiempo exposición y la naturaleza de la superficie del esmalte (sana, grabada o cariada). El flúor se puede incorporar dentro de la estructura de apatita por intercambio de iones o por medio de un proceso de disolución/precipitación. Se ha sugerido que a pH neutro el flúor reacciona con el carbonato y fosfatos ácidos en el esmalte para formar un material al calcio-flúor (CaF_2). Éste no se forma en soluciones que contienen menos de 75-100 ppm de flúor.

CaF_2 se observa al microscopio electrónico como glóbulos esféricos en el esmalte; su tamaño y cantidad depende del pH y concentración del flúor en solución y del tiempo de exposición. El diámetro de los glóbulos varía entre 4- 15 nm a 3 μm ; y se forman preferiblemente en depresiones de prismas y hoyos sobre las periquematis

que son más solubles que otras partes del esmalte CaF_2 en pH entre 6,5-8,5 ; el fosfato en forma de HPO_4 interviene con su formación.

In vivo, sitios susceptibles a caries (fisuras, áreas proximales y márgenes gingivales) están cubiertos con placa la mayoría del tiempo ; por lo tanto la superficie no es accesible inmediatamente a una reacción con el ion flúor. La concentración de flúor en la placa varía entre 5-10 ppm en áreas poco fluoradas; las concentraciones en placa fluida son menores. *Gould* 1976 (citado por *Cardenas*.1996) mostró que la placa fluida contiene cerca de 6,5 m mol/L de Ca. La solubilidad del producto de CaF_2 puede ser excedida cuando la placa es expuesta a altas concentraciones de agentes como flúor de pastas o enjuagues. Por lo tanto es más un reservorio de CaF_2 en toda la placa dental cuando los dentífricos se usan regularmente. Además se han identificado depósitos de apatita en la placa dental.

La placa que cubre las lesiones de esmalte puede incrementar la retención de flúor, reduciendo la filtración desde la superficie. La porosidad de las lesiones a su vez pueden aumentar la toma de flúor y hacer del gradiente de flúor en las capas subsecuentes menos pronunciado que en esmalte sano. Otros estudios confirman los reportes de más alto contenido de flúor en esmalte cariado (*Myers* 1952, *Hallkworkts, Larsa* 1981, citado por *Shellis*,(1994). (6,11,16)

La remineralización ocurre no sólo en períodos de pH neutro, sino también durante el desarrollo de la caries. Como resultado de flujos opuestos de iones; los minerales se precipitan a profundidades particulares a diferentes profundidades, mientras son disueltos por otros durante el desarrollo o remineralización de la lesión cariada; esto puede resultar en la formación de una capa de superficie, a su vez incrementa los diámetros de los cristales en la zona oscura y en la capa superficial de la lesión. (17,18)

El efecto del flúor en la remineralización del esmalte muestra generalmente que el flúor acelera la rata inicial de mineral en la lesión en cualquier tipo de esmalte

(Koulourides, 1964 ; Silverstone, 1981). Si la deposición mineral ocurre a una profundidad dada en la lesión es determinada por la disponibilidad de los cristales y del grado de supersaturación local (depende de los flujos iónicos, incluyendo el gradiente de pH). Cuando el pH incrementa en el frente de la lesión ("zona interna" o "zona translúcida") esta región es más favorable para remineralización y el intercambio de iones minerales desde la solución en los poros acelera el transporte de iones a través del cuerpo de la lesión. Con flúor presente en solución, la precipitación se incrementa en todas las locaciones y la remineralización puede ser mayor en la capa superficial ; esto se ha observado *in vitro*. (Ten Cate, 1977) cuando las lesiones se remineralizan en presencia continua de flúor o después de una corta aplicación en soluciones con elevadas concentraciones de iones minerales en ausencia de flúor. (11,14,17)

Para distinguir los procesos de desmineralización de los de remineralización, se debe estar en la posibilidad de valorar los cambios minerales dentro de los tejidos. Esto es muy complicado en el ambiente oral, donde episodios periodicos de desmineralización y remineralización ocurren diariamente y el detenimiento de la progresión de la lesión puede ser debido a la inhibición de desmineralización o aumento de remineralización; cualquier remineralización puede ocurrir después de una desmineralización inicial. , por lo tanto el tiempo de exposición es muy importante en los modelos *in vivo*.

Tipos de Productos tópicos

Los productos tópicos de flúor se dividen en dos grandes categorías: productos profesionales y de auto-aplicación. Productos *profesionales* son los utilizados sólo por el odontólogo, involucran el uso de altas concentraciones de flúor (entre 5000-19.000 ppm de flúor) equivalente a 5-19 mg flúor/ml del producto). Los de *autoaplicación* son productos como dentífricos y enjuagatorios, con baja concentración de flúor (entre 200-1000ppm ó 0,2-1 mg flúor por ml del producto).

En la mayoría de países desarrollados se ha visto la disminución de la prevalencia de la caries; la cual se relaciona a diferentes factores pero principalmente al uso de fluoruros, particularmente al uso del flúor tópico lo cual se refiere a proveer flúor para reacciones químicas locales de superficies expuestas de dientes en erupción; esto incluye diferentes sistemas como pastas profilácticas, soluciones, geles y barnices, que contienen una alta concentración de flúor.(19)

El flúor se ha añadido con el fin de cambiar el ambiente intraoral y reducir la susceptibilidad a la caries por medio de la boca o cambiando el ambiente local intraoral y haciendo superficies dentales menos susceptibles a la caries, para esto se han utilizado sistemas de control de liberación de flúor que descargan dosis continuas pero bajas de flúor en la saliva, se cree que los mecanismos de tales sistemas participan en la remineralización de lesiones cariosas incipientes.(20)

La búsqueda de materiales restaurativos y protésicos que alteren el ambiente oral, buscando beneficiar el desarrollo de lesiones como una fuente local. Las ventajas de materiales que contienen y liberan flúor que van a ser colocados en la boca son:

1. El agente puede ser liberado directamente o cerca del sitio afectado.
2. La dosis sintética puede ser minimizada mientras la terapéutica local alcance un nivel optimo.
3. El agente puede estar presente continuamente sobre un periodo de tiempo extendido.
4. La dosis puede ser mantenido a un nivel uniforme dentro del rango terapéutico.
5. Involucramiento directo de los profesionales de la salud es minimizado
6. La necesidad de la cooperación del paciente es eliminada o reducida.

Obviamente hay desventajas, por ejemplo los requerimientos estructurales para materiales reconstructivos frecuentemente se chocan con las necesidades de liberación.(21)

Principios generales:

Generalmente hay dos métodos por medio del cual los agentes terapéuticos liberan flúor desde los biomateriales dentales:

1. Aquellos que proveen una rata de liberación que disminuye gradualmente con el tiempo. (dependiente del tiempo)
2. Aquellos que proveen una rata regular, liberación linear. (la rata es independiente del tiempo) (21)

Pastas profilácticas con flúor

Algunos estudios muestran que la reducción de la incidencia de caries, no es estadísticamente significativa (*Heifetz, 1978*) por lo cual no se debe considerar como agentes terapéuticos para la prevención de caries.

Debido a que la mayoría de las pastas tópicamente remueven varios micrómetros del esmalte florado. Estas se han preparado con el propósito de reemplazar la perdida de flúor e incrementar los niveles de flúor en el esmalte.

Estudios clínicos de pastas profilácticas con flúor se han realizado en vista de la probable incompatibilidad de algunas de las formulaciones, del efecto inhibidor de toma de flúor por los humectantes, la alta viscosidad y la probable poca difusión del flúor desde pastas muy viscosas a áreas de fisuras y próximas, no es de sorprendieres que su efecto anticuarias, sea menos que el de las soluciones o geles (*Ripa 1982*). Aunque las pastas fluoradas ofrecen menos beneficios que las soluciones o geles, es prudente usar pastas reconocidas fluoradas que pastas no fluoradas para obtener cualquier beneficio que puedan proveer. La pasta no debe utilizarse como sustituto de una aplicación tópica regular. Basados en evidencia de toma de flúor, una pasta de baja viscosidad, con silica-APF, alto contenido de flúor debe ser la elegida.(21)

Barnices fluorados

Se introdujeron desde 1968, se encuentran con preparados que contienen difluorosilano de Na en una base de barniz que es diseñada para liberar flúor en el esmalte adyacente, con un período de retención oral entre 48-72 h. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado la habilidad de éstos para aumentar el contenido de flúor (Clark, 1982). Pero sus beneficios cariostáticos se asocian con aplicaciones frecuentes (cada 3-6 m) En el mercado se consiguen dos materiales el dura phat que contiene 2.2% de fluoruro y el flúor protector que contiene 0.7% de flúor.(21)

El Duraphat se ha usado en jóvenes y ha demostrado su efectividad en la prevención de la caries tanto en dentición temporal como permanente. Wegner 1976, reportado por Weinstein 1994, reporta que la reducción de caries se encuentra entre 11 18 y 54%. Algunos estudios han mostrado que el uso de barnices es mas seguro que el uso de geles con APF debido a que pequeñas cantidades de material son necesarias para cada tratamiento. La concentración del Duraphat es de 50 mg de fluoruro de sodio por mililitro. Weinstein , 1994, en un estudio no controlado sugiere que el barniz fluorado tiene un efecto en la prevención de caries y que contribuye a la remineralización dental. (22)

El flúor protector es un barniz que contiene 0.1% en la forma de flúor silano.

La acción de los barnices se le atribuye a una reserva de fluoruro de calcio, que en zona de baja mineralización libera flúor, formando fluorapatita.

Estudios de caries en ratas mostraron que la solución de fluoruro de amino es equivalente al duraphat y que el fluoruro de fosfato acidulado APF fue igual o mejor que el flúor protector y el duraphat.(23)

Geles y enjuagues de flúor

Los rinses se han desarrollado desde los 60's y 70's cuando se utilizaron en programas escolares; los diferentes sistemas son: fluoruro de Na 0,2% una vez por

semana, fluoruro de Na 0,05% diario y fluoruro de fosfato acidulado 0,2% diario; algunos estudios mostraron su eficacia (Laswell, 1975 ; Driscoll /92)

Geles tópicos, Debido a su viscosidad la difusión de flúor en el esmalte, particularmente en áreas proximales y fisuras pueden estar reducidas. Diferentes estudios han mostrado que no hay diferencias significativas entre las geles y las soluciones y entre lo que son geles convencionales y ticsotròpicos.(21)

Dentífricos fluorados

El primer dentífrico fluorado fue aceptado en 1964; desde entonces diferentes esfuerzos se han hecho para mejorar su efecto como elevar la concentración de flúor, lo cual aumenta el problema de ingestión por niños pre-escolares y un posible aumento en el desarrollo de fluorosis. (19)

Ionomeros de vidrio

Durante 1940 se observó que la caries secundaria raramente se desarrollaba adyacente a las restauraciones de silicato. Relacionando este fenómeno a la filtración de flúor desde la fase vidriosa del material, en 1960 se introdujeron las resinas adhesivas para sellar las fosas y fisuras contra el ambiente oral cariogénico. Durante 1970 y 1980 se ha aumentado el uso de materiales dentales con propósitos preventivos. Los ionómeros de vidrio son la versión moderna de los silicatos que además contiene flúor. Barnices especiales liberan flúor. Además se han desarrollado sellante y resinas compuestas que también contienen flúor. (21)

Estrategias actuales, nuevas direcciones

Acorde con la Organización de Salud Mundial, la caries se está incrementando en varios países del Sur y Centroamérica, Asia, Africa y Medio Oriente.

Las estrategias actuales esencialmente son las mismas que originalmente se promulgaron en el Programa Nacional de Caries (1971 a 1983). Han desarrollado estrategias de tres partes:

1. Combatir la inducción de caries
2. Modificar la caries, promoviendo ciertos ingredientes de la dieta
3. Incrementar la resistencia de los dientes a la caries

1. En la práctica, el combate contra la microflora cariogénica continúa relacionada con la higiene oral ; la remoción mecánica de depósitos no calcificados. Énfasis en el control de placa; instrucción de cepillado y uso de seda dental ayudada por dentífricos y diseños mejorados de cepillos dentales.

Algunos estudios han mostrado que algunos agentes antibacterianos son usados contra la caries como la clorhexidina. En Estados Unidos el único vehículo aceptable de clorhexidina es un rinse de 0.12% y es recomendado en pacientes de alto riesgo por el término corto (30d días o menos). Los datos muestran que el uso más apropiado es la aplicación profesional de barniz de clorhexidina o de un gel de auto-aplicación. (24)

Modificación de la dieta

El acercamiento más promisorio en la dieta es el uso de endulzantes no acidogénicos como el *Xylitol* ; principalmente en la goma de mascar. Estudios han mostrado que masticar goma con *Xylitol* muestra que reduce los niveles de *streptococo mutans* alterando sus vías metabólicas; además aumenta la remineralización y detiene la caries dentinal. (16) Otro estudio muestra que tabletas para mascar que contienen xylitol, flúor, calcio, fosfato, zinc y componentes buffer, donde se observa liberación de flúor, calcio y fosfato in vivo, pueden ser útiles como agentes de remineralización en pacientes con un flujo salival reducido. (25)

Nuevas direcciones

Agentes antibacterianos / antiplaca; Vacunas; se han estudiado desde hace 50 años, basadas en estimular IgA ó IgG. En las vacunas se ha utilizado:

- Uso de péptidos sintéticos de *S. mutans*
- Unión de antígenos *S. mutans* con subunidades de toxina de cólera
- Unión de genes *S. mutans* con *salmonella* no virulenta
- Sistemas de liberación de liposomas

Una de las limitaciones de la inmigración oral es el rápido rompimiento de las proteínas o péptidos por las enzimas digestivas intestinales.

Inmunización pasiva

Consiste en la introducción de anticuerpos específicos dentro de la boca; para esto se están usando las plantas transgénicas que generan los anticuerpos necesarios.

Bloqueo de la acumulación de la placa

Esto se puede obtener de diferentes formas :

- Inhibiendo la enzima glucosiltransferasa y por lo tanto reducir la formación del pegajoso glucón.
- Interfiriendo con moléculas específicas involucradas en adhesión bacterial y co-agregación
- Uso de sistemas antibacteriales

Modificación de la dieta y alimentos protectores

Incluye el uso de preservativos que aumentan la actividad antibacterial; incremento del uso de inhibidores naturales de demineralización como fosfatos, el uso de elementos protectores, por ejemplo componentes encontrados en el chocolate como los polifenoles; cereal, queso y otros productos derivados de la leche.

Agentes remineralizadores

La remineralización de las lesiones tempranas de caries ha sido una meta por muchas décadas.

Dos sistemas de remineralización se han desarrollado en la ADA: un sistema, el agente activo es un fosfato de calcio amorfo o ACP que tiene el potencial de transformarse a hidroxiapatita; el mayor mineral del diente; estudios iniciales *in vitro* *in vivo* soportan tal conversión y precipitación cuando el ACP es introducido en gomas de mascar. El segundo sistema emplea otra formulación de fosfato calcio en un vehículo de goma de mascar. Una efectiva remineralización es una mezcla de fosfato tricálcico y fosfato dicálcico anhidroso. Los dos sistemas se encuentran en estudio.

Recubrimientos poliméricos

La fabricación de una cubierta delgada polimérica sobre la corona de los dientes y superficies radiculares accequibles. El proceso involucra dos pasos: el estado inicial es la aplicación de un monómero con un grado controlado de solubilidad en agua que permite una penetración dentro del material orgánico hidratado y se adhiere a la sustancia dental por medio de uniones químicas. Una cubierta polimérica aumenta la durabilidad y estética de la cubierta adhesiva. El prototipo original ha sido mejorado y el segundo polímero está bajo desarrollo.

Luz láser

Estudios recientes han mostrado que el láser de luz CO₂ es eficientemente absorbido por minerales dentales; éste es transformado rápidamente en calor y forma una superficie parecida a cerámica que es altamente resistente a los ataques ácidos, al mismo tiempo al inicio de la caries. El tratamiento con láser parece particularmente útil para tratamiento de fosas y fisuras.

Aumentar la resistencia del huésped

Importante la función de las proteínas salivales especialmente la involucrada en la defensa de los tejidos orales, proveen un excelente oportunidad para aumentar las defensas del diente. La saliva contiene numerosas proteínas que son antibacteriales: Como la lisozima, lactoferrina, peroxidasas. Otras afectan la agregación e interfieren con su habilidad para adherirse al diente como la mucina; glicoproteína de la parótida, fibronectina (24).

Estudio del zinc en dientes humanos (1963)

El zinc es un elemento esencial como cofactor en metabolismo de enzimas como la anhidrasa carbónica y la alcohol deshidrogenasa. Los niveles sanguíneos en adultos normales se encuentran entre 8.8 ± 2 ppm y en el plasma entre 3 ± 1.6 ppm.

La determinación del Zn en dientes humanos se encuentra en un rango entre 130-280 ppm (siendo similares las concentraciones en esmalte y dentina). Tanto zinc como flúor reaccionan rápidamente con hidroxiapatita, el zinc también forma complejos con proteínas y aminoácidos. Por lo tanto es probable que una porción del zinc en los dientes se una orgánicamente, y la cantidad de zinc inorgánica depositado en esmalte y dentina es dependiente de la capacidad de unión del zinc a las proteínas y de disponibilidad del zinc iónico durante su formación (26).

Estudios clínicos revelan que las pastas de dientes que contienen 0,5% de trihidrato citrato de Zn (ZCT) reduce la prevalencia de cálculos sin afectar la incidencia de caries. Los resultados de este estudio muestran que el intercambio zinc/Ca es reversible y que el Zinc preabsorbido puede ser desplazado por el Ca en solución. Esto sugiere que *in vivo* por medio de la inhibición de la mineralización de la placa sin afectar adversamente los efectos anticariogénicos del flúor (27).

Tratamiento no operativo

Algunos estudios como el de *Thylstrip, Ekstrad*, muestran la detención de la caries en tratamientos basados en educación intensiva al paciente y limpieza profesional; lo cual se convierte en un tratamiento de bajo costo. Demuestran el mantenimiento de superficies oclusales libres de caries; cuando la prevención se inicia desde el inicio de erupción dental. La aplicación de fluor tópico es para ello la forma más importante en el uso del flúor en la prevención de caries. Lo cual atribuyen principalmente al uso de dentríficos que contienen fluor, además evidencian que el flúor ejerce su efecto anticaries en la interfase diente-placa-saliva durante los periodos de disolución de caries.(6).

4.1.3.5 METODOS NO-TRAUMATICOS PARA TRATAR LA CARIES

Desde 1905 autores como Miller hacían referencia a tratamientos preventivos utilizando especialmente el nitrato de plata; aunque no dejaban de un lado una profilaxis y pulido profesional realizado al menos una vez al mes utilizando piedra pomez. El uso del nitrato de plata fue recomendado por Stebbins desde 1891 en el *International Dental Journal*, recomendándolo en casos donde la caries ha comenzado. En márgenes de cavidades, en áreas con abrasión y/o erosión. Para ellos la acción del nitrato de plata es que hay una precipitación de plata en las capas superficiales de la dentina formando una barrera que es más impermeable a los ácidos. Otra explicación posible sugiere que la acción protectora del nitrato de plata es debida a la coagulación de los contenidos de los tubulos dentinales (28) (24) Howe (1917), recomienda el uso de nitrato de plata adicionándole amonio combinándolo con otra solución al 20% de formalina en agua, la cual utilizan para desintegrar restos pulpares, en casos de periodontitis apicales agudas y crónicas (29)

Prime, 1937, en cuanto al uso del nitrato de plata muestra que produce detenimiento en caries interproximales incipientes y en primeros molares

permanentes, que debe utilizarse aproximadamente 4 veces al año. Pero se determinó que no produce inmunización de fosas y fisuras. (30)

Klein y Knutson 1942, realizaron un estudio controlado sobre una población de niños escolares, para valorar el efecto del nitrato de plata amoniacal sobre caries en los primeros molares, llegaron a la conclusión de que la aplicación de este sobre superficies coronales de primeros molares una vez al año, no tiene ningún grado de significancia en la prevención o detenimiento de la caries (31)

En 1971, *Howe*, citado por Barreiro (1984) demostró el éxito de su método llamado "impregnación con plata", el cual con soluciones concentradas de nitrato de plata: (AgNO_3), lograba una resistencia contra la caries dental.(18)

La principal acción de este método se consigue por la Ag^+ . Este ion de metal pesado se une con la proteína causando su coagulación, como proteína, argéntica. Los efectos inhibitorios de la Ag^+ sobre una variedad de enzimas se atribuye, principalmente, a la acción proteína-coagulación. Además, Ag^+ tiene una acción bactericida muy potente, que es atribuible por su acción oligodinámica contra los microorganismos. Esto es la base de la potente acción antiséptica del ion argéntico, y se piensa que incluso su efecto antiséptico sobre los tejidos es mayor que el del ion mercurio. El mercurio, tras unirse a un compuesto orgánico, pierde su actividad, mientras que el ion plata mantiene su actividad incluso tras haberse unido a un compuesto orgánico. Además, es aceptado que el ion plata tiene una acción antiséptica y astringente, siendo usado para el tratamiento de la estomatitis, gingivitis y periodontitis.(31) La casa comercial saforide describe su acción antienzimática y la oclusión de tubulos dentinales.

Estudios cristalográficos en los rayos X, de la reacción entre el diente y el nitrato de plata, demostraron que ocurría lo siguiente (Yamaga 1976)



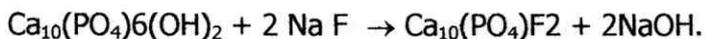
El fosfato de plata (Ag_3PO_4) formado es un cristal amarillo, difícilmente soluble, y toma un color negrozco por la luz del sol o agentes reductores y, de esta manera, se precipita el fosfato de plata en la superficie del diente.

El nitrato de calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$], formado en esta reacción, es muy soluble en agua, siendo fácilmente eliminado tras disolverse el calcio. Esto es muy importante, ya que lleva a una descalcificación. El flúor actúa con los componentes inorgánicos y el nitrato de plata actúa con las proteínas ambos iones aumentan la resistencia del esmalte a la caries.(18)

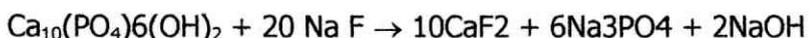
4.1.3.5.1 Fluoruro de plata amoniacal

Reuchi Yamaga, 1969, desarrolló el "fluoruro de plata amoniacal" que incorpora la acción protectora del ion fluoruro y no contiene el ion cáustico del nitrato. El PO_4 es liberado del diente cuando altas concentraciones de flúor es aplicado y Ca^{++} cuando se aplica el nitrato de plata. Cuando la solución del diamino de fluoruro de plata es aplicada, CaF_2 , Ag_3PO_4 y Ag-proteínas son formadas en la superficie del diente y no hay pérdida de Ca^{++} y PO_4 .

Cuando es aplicada concentraciones de flúor con menos de 100 ppm, en la reacción simplemente se sustituye un OH^- en la superficie del cristal para formar fluorapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ que es más estable y menos soluble que la hidroxiapatita, la reacción es la siguiente:

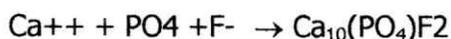
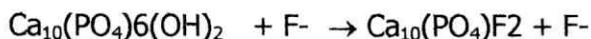


Cuando se aplican concentraciones mayores de F de más de 300 ppm, como cuando se utiliza aplicaciones tópicas de flúor o enjuagatorios. La hidroxiapatita se descompone para formar CaF_2 en la superficie del diente y al mismo tiempo el fosfato de Na se forma y se libera; la reacción es la siguiente:



El fluoruro de Ca formado en la superficie del diente es inestable, solo una pequeña porción es retenida por los dientes.

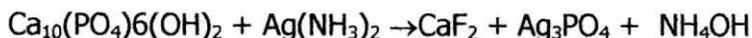
El fluoruro de calcio retenido es gradualmente convertido en fluorapatita insoluble $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)\text{F}_2$, de la siguiente forma:



El fluoruro de calcio se disuelve y el flúor se une con la hidroxiapatita formando fluorapatita por último el Calcio, el flúor del fluoruro de calcio disuelto y el PO_4 de la saliva, forman también fluorapatita.

La fluorapatita es un compuesto altamente estable y resistente a la descalcificación por ácidos.

Al reaccionar con la hidroxiapatita forma fosfato de plata y fluoruro cálcico según la siguiente reacción:



El esmalte o dentina de dientes humanos a los que se aplique una solución de fluoruro de plata amoniacal durante cinco minutos, sufrirán menos descalcificación por ácido o agente quelante, que el esmalte o dentina al que no se le haya aplicado la solución. (31)

Nishimo M, 1969, citado por Barreiro (1984), aplica el diamino fluoruro de plata a cavidades de molares inferiores susceptibles a caries y muestra el índice de caries había disminuido, además se inhibía el progreso de las mismas, comparado con el control.

Yoshida, S., 1969 y *Yoshida, S.*, y *Yamaga, R.*, 1970, citado por Barreiro (1984), obtenían idénticos resultados, pero realizaban antes un corte en el esmalte, para evitar que se depositara restos alimenticios (cuando el niño fuere más cooperativo ya le podían hacer la reconstrucción del molar). *Shimizu*, 1974, citado por Barreiro

(1984), demostró los efectos del diamino fluoruro de plata para evitar la caries recurrente.

Murase y cols., 1969, Kimura y cols., 1971, Murase y cols., 1970, citado por Barreiro (1984), demostraron asimismo la acción de este producto sobre la hipersensibilidad dentinal.

Nishino, M, y Yoshida, 1969, y Moritani y cols., 1970, citado por Barreiro (1984), hicieron estudios sobre dientes temporales después de la aplicación de fluoruro de plata amoniacal, viendo que se detenía el proceso de la caries, y que eran muy raros los casos en que podía haber molestias al calor, frío o fricción.

Sato y cols., 1970, citado por Barreiro (1984), demostraron la acción del fluoruro de plata amoniacal para la prevención de la aparición de caries en fosas y fisuras del primer molar permanente.

Nishino, M y Massler, M, 1971, citado por Barreiro (1984), hicieron un estudio comparativo en ratas entre el fluoruro estañoso F_2Sn y el diamino fluoruro de plata $Ag(NH_3)_2F$, según su acción como inmunizantes de las caries de fosas y fisuras. El resultado indicaba que mientras el fluoruro de plata amoniacal tenía la acción de prevención y parar la evolución de la caries, el F_2Sn prevenía pero no detenía la caries, y el nitrato de plata ni prevenía, ni detenía la caries.

Mizuho Nishino y Massler, M., 1972, citado por Barreiro (1984), demostraron asimismo su poder de inmunización a la caries en fosas y fisuras al utilizarse junto con resina.

Shimooka (1972), citado por Barreiro (1984), demuestra que el fluoruro de plata amoniacal penetra aproximadamente 20 micras en el esmalte humano sano y la profundidad de la penetración del flúor F^- en la dentina es de 50-100 micras, pero la penetración de Ag^+ es mucho más profunda, próxima a cámara pulpar. Estudios

afirman que en la dentina descalcificada tratada con el diamino fluoruro de plata muestran inhibición de la degradación enzimática proteolítica como la colagenasa y la tripsina.

Nishimo, Ono, Kita, Tsuchitani 1974 creen que la aplicación de diamino fluoruro de plata antes de un sellante hacen las fisuras más resistentes a las caries. . Encontraron que la aplicación después del grabado ácido y antes de la aplicación de la resina disminuye la adhesión del bisfenol al esmalte, mientras que no interfiere con la adhesión del poliuretano. (18)

Craig(1981) sugiere que el AgF y SnF₂ usados en combinación pueden detener la caries en dientes deciduos. Los tratamientos con AgF muestran inhibición en el crecimiento de los S. mutans, a su vez reducen la actividad metabólica de la placa dental (25)

Barreiro, 1984 realizó un estudio sobre 20 primeros premolares, libres de caries que iban a ser extraídos por razones ortodónticas; se preparaban cavidades tipo I donde se aplicaba fluoruro de plata amoniacal. Se obtenían radiografías antes y después del tratamiento y se realizó test de microdureza. Se concluyó que

1. En dientes permanentes jóvenes, no cariados, en los que tras realizar una obturación convencional su dentina se recubre con fluoruro de plata amoniacal, se presenta un estadísticamente significativo incremento de la dureza dentinaria en las zonas subyacentes a la base cavitaria comparados con los dientes de control, en los que realizándose el mismo tipo de obturación no se recubren con esta sustancia remineralizante.
2. La acción de este producto sobre la dentina no es apreciable radiográficamente en los tratamientos de cincuenta y noventa días.
3. A partir del tiempo mínimo de control del producto investigado, a los cincuenta días, no se encontró relación entre el poder remineralizante y el aumento del tiempo de tratamiento.

4. El efecto de la preparación de la cavidad, así como la composición del material obturado o el estímulo mecánico de la obturación no parecen tener influencia en la remineralización dentinaria.
 5. La profundidad de las diferentes cavidades no mostró una tendencia significativa en los valores de microdureza obtenidos.
 6. La sustancia remineralizante *in vitro* no produjo aumento en la dureza dentinaria.
 7. No se observó diferencia de dureza por variación de la dirección de series de indentaciones en una sección de un diente.
 8. El hecho de que no se hayan presentado cambios en el tratamiento *in vitro* de dentina sana está de acuerdo con la idea de *Kato y Fusayama*, en las que se indica la necesidad de la pulpa viva para estimular la remineralización dental.
- (18)

Hosoya, Aritami, Goto , 1990. Realizaron un estudio histopatológico para observar la respuesta pulpar del diamino fluoruro de plata que se aplicaba sobre pulpas expuesta en perros, utilizaron diamino fluoruro de plata al 38% (0,01 ml). Se realizaban exodoncias y los dientes se procesaban histopatologicamente a 3,7 y 30 días. Se observaron cambios histopatologicamente severos, como necrosis, inflamación supurativa, infiltración celular, sangrado e hiperemia. Después de 30 días, el porcentaje de inflamación supurativa e infiltración celular disminuye, mientras el porcentaje de inflamación supurativa e infiltración celular disminuye mientras el porcentaje de necrosis pulpar incrementa. Se concluye que la aplicación de 38% de diamino fluoruro de plata al 38% no presenta ningún efecto protector sobre pulpas expuestas. (33)

Algunos estudios han utilizado el diamino fluoruro de plata como base para la colocación de resinas; la aplicación de nitrato de plata, fluoruro estañoso, diamino fluoruro de plata, sellantes de fisura mínima preparación cavitaria y resina, han sido probados por su potencial de detención de la caries. Estos diferentes procedimientos fueron evaluados sobre dientes deciduos por Mc.Donald, 1994, en este estudio se mostró que la caries progresa solamente 5% en los grupos que

combinaban el uso de diamino fluoruro de plata y fluoruro estañoso cuando se utiliza junto con resina y 11% en los grupos que solo utilizaron resina, comparado con 46% en el grupo de fluoruro estañoso y 27% en el grupo que combinó diamino y fluoruro de estaño. Lo que indica que es posible tratar lesiones cariosas con diamino fluoruro de plata y fluoruro acompañado de una mínima preparación de cavidades y resina. (24)

Kameta, Fernandez (1979), realizaron un estudio sobre la acción de fluoruro de plata amoniacal en dientes anteriores temporales donde se utilizó un grupo testigo donde se realizó aplicaciones de agua oxigenada y en el otro grupo se realizaban aplicaciones tópicas de fluoruro de plata amoniacal (saforide), se tomaron modelos de estudio y fotografías. Se realizó un seguimiento durante un periodo de 3 años, se encontró que aunque había detenimiento de la caries, no hubo diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, debido a que el número de sujetos era limitado. (34)

Rodriguez (1996) en un estudio sobre 30 pacientes de edades entre 2-4 años durante 3 años, en el que utilizó diamino fluoruro de plata en lesiones cariosas que comprometían dentina, muestra que este acelera la destrucción de la sustancia inorgánica, provocando lesiones pulpares. (35)

Indicaciones

Caries incipientes de fosas y fisuras en dientes temporales

Prevención de caries recurrentes

Desensibilización de la dentina.

Preparaciones para coronas.

Caries rampantes (36)

Efectos sobre pulpa- encia

Estudios de la casa comercial *saforide* muestran que el diamnino fluoruro de plata no produce ningún cambio cuando se aplica sobre la dentina.

Sobre la encia muestran que tiene una acción irritante. (37)

Toxicidad

Según la casa *saforide* se puede considerar que la toxicidad es casi igual a la del fenol o a la de la formalina. (37)

4.1.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD NO-RADIOACTIVA CYTOTOX 96

La prueba de citotoxicidad no radioactiva (CytoTox 96) es una alternativa a las pruebas de liberación de Cr. La prueba Cytotox 96 mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH) una enzima que es liberada durante la lisis celular, muy parecida a las pruebas radioactivas de liberación de cromo. La liberación de LDH en los supernadantes de los cultivos es medida con una prueba enzimática en 30 minutos lo que resulta en la conversión de la sal de tetrazolium en rojo formazan. La cantidad e color formado es proporcional al número de células muertas. Los datos de longitud de onda son recolectados usando un plato de lectura de 96 pozos. Diferentes métodos para la determinación de la LDH usando sales de tetrazolium se han usado en unión con diaforesis o aceptores de electrones. Variaciones en esta tecnología se han reportado para medir citotoxicidad natural y han demostrado ser idénticas (dentro del error experimental) a valores determinados en paralelo con pruebas de liberación de Cr.

Indicaciones:

- Citotoxicidad mediada por células
- Citotoxicidad mediada por químicos u otros agentes
- Numero celular total

La prueba de tiene varias ventajas sobre la prueba de liberación de Cr.

1. Nivelación de las células blanco antes de que el experimento sea eliminado.
2. Carga de isotopos, costos de desecho, a la vez que el peligro de radiación es eliminado
3. Los datos son leídos en un formato de 96 pozos con un lector de Elisa standard a una longitud de onda visible. Además el ensayo se puede revelar tempranamente, a un nivel de daño celular mínimo lo que no se puede conseguir con otras metodológicas.

La reacción química general del Cytotox 96 es la siguiente:

LDH



Diaforesis



El kit consta de :

- 5 viales de mezcla de sustrato
- 60ml de ensayo buffer
- 25ul de LDH control positivo
- 3ml de solución lisis (10x)
- 65ml de solución de parada
- 1 protocolo
- Condiciones de conservación

Mantener la mezcla de sustrato y el ensayo buffer congelado a -20°C . La mezcla de sustrato reconstituyente puede ser guardada de 6-8 semanas a -20°C sin perder su actividad. El control positivo de LDH, la solución lisis (10x) y la solución de parada

a 4°C. El producto es estable por 6 meses cuando se guarda 6 meses y es manejado correctamente.

Consideraciones generales

Correcciones de la absorbancia indeterminada:

Dos factores del medio de cultivo pueden contribuir a la absorbancia indefinida usando el Cytotox 96. Rojo fenol y LDH del serum animal. La absorbancia indefinida de los factores es corregida mediante la inclusión de un medio de control de cultivo. Los valores de absorbancia determinados desde este control son usados para normalizar los valores de absorbancia obtenidos desde otras muestras. La absorbancia indefinida desde el rojo de fenol puede ser también ser eliminada usando un medio libre de rojo fenol.

La cantidad de LDH en el serum animal puede variar dependiendo de muchos parámetros incluyendo la especie, la salud o el tratamiento del animal antes de recolectar el suero. El suero humano AB es relativamente bajo en actividad de LDH contribuyendo a la absorbancia indefinida. En general, la disminución de la concentración de suero al 5% puede reducir significativamente la indeterminación sin afectar la viabilidad celular. El uso de 1% BSA en lugar de suero no es recomendado para las pruebas de citotoxicidad mediadas por células.

4.1.5 Pruebas de Biocompatibilidad

En 1972, el consejo de materiales dentales, instrumentos y equipos del instituto estandarizado nacional americano de la Asociación Dental Americana (ADA) aprobaron el documento No. 41 "para recomendar la practica estandarizada para la evolucion biológica de materiales dentales" lo que agrupa cuatro recomendaciones para pruebas compuestas acordando sus usos destinados.

La prueba inicial ahora incluye ensayos para citotoxicidad, lisis de membrana de células rojas (hemólisis), mutagénesis y carcinogénesis a nivel celular y afección fisiológica aguda y muerte a nivel de todo organismo. Las bases de los resultados

de estas pruebas, aparentemente materiales benéficos son probados por una o más pruebas secundarias en animales pequeños por inflamación o potencial inmunogénico (irritación, implantación y pruebas de hipersensibilidad).

Finalmente, estos materiales pasan a una prueba secundaria y mantener fijo el potencial para ser sujetos a uno o más pruebas (que es el uso de los materiales y sus contextos propuestos, primero en animales grandes, a menudo primates y finalmente aprobados por la Administración de Comida y Drogas en Humanos).

*Clases de pruebas de biocompatibilidad. La ANSI/ADA escribieron 41 documentos para ayudar a investigadores a desarrollar un perfil toxicólogo de los materiales desarrollados para odontología.

Hay tres estados de pruebas inicial, secundario y prueba pre-clinica. Es importante hacer un conjunto de pruebas de los materiales porque las pruebas de citotoxicidad miden solo los resultados a termino corto.

-Pruebas iniciales. -Métodos de cultivos celulares. En general estas pruebas miden los efectos producidos de los materiales en algunas funciones metabólicas de un sistema de pruebas celulares.

Si un material es probado a ser altamente tóxico por una de estas pruebas hay varias formas para producir un material conveniente.

- Producir el nivel de sustancias tóxicas
- Considerar el uso de materiales en el cual no produzcan efectos en el individuo
- Usar una forma para destinar el propósito

En todas estas pruebas iniciales es obvio que el sistema de pruebas celulares puede ser no tóxico, estéril y reproducible así como que no interfiere con el análisis de los materiales.

Las pruebas de citotoxicidad tiene un grupo de ventajas:

- Pruebas para la función metabólica de la célula aislada de otros eventos
- Una trama larga de números de simples formas baratas
- Cantidad de resultados
- Gran sensibilidad a materiales
- Estandarización potencial de pruebas

Desventajas de pruebas de citotoxicidad:

- Limitación de la prueba usualmente a solo tipo de célula en un tiempo
- Desemejanza entre células
- Falta de inflamatoria y otros mecanismos protectores de tejido en el cultivo. La injuria celular, en general puede ser categorizada por el efecto del agente injurioso en:
 - Respiración mitocondrial
 - Integridad de las membranas celulares
 - Enzimas y proteínas; y
 - Aparatos genéticos de la célula

La unión celular y crecimiento usualmente envuelve un lugar con material estéril de dimensiones específicas (o agua en concentración específica) en fuentes de cultivo y luego colocar las células en una densidad particular con el cultivo de tejido completo en un periodo de 1 a 3 días. Este procedimiento permite determinar si el material interfiere con la unión celular, la proliferación celular o alguna otra función celular. Los resultados pueden ser cuantificados por la medida de la anchura de la zona, calculando la densidad de las células dentro de la zona, comparando con las células fuera de la zona o como en el caso de la prueba de agua – productos solubles, midiendo algún rasgo como densidad celular.

Biológicamente sustancias inertes como el teflón y algunos polímeros siloxanos pueden ser usados como controles negativos. Las células tienden a crecer sobre las superficies de discos o arriba de la periferia de los discos de materiales que son inertes. Varios materiales como plastificados clorhidropolivinilo o agua-fenol soluble, han sido usados como controles positivos.

Variaciones en la unión – crecimiento celular incluye la medida de alguna función biológica como la síntesis de DNA, síntesis proteica o análisis histoquímico enzimático. El análisis de síntesis de DNA o proteínas por células en una fuente es mejor hecho por el uso de radioisotopos – marcados precursores en la incubación media seguidos por análisis de radioisotopo (por ejemplo ^3H -timidina o ^3H -leucina) incorporado dentro de la macromolécula de DNA proteína por líquido, seguida por análisis bioquímico de la cantidad de DNA o proteína en la fuente, obviamente estos métodos destruyen células. Si el material es sólido, la incorporación de radioisotopos pueden ser probados después de trasladada la prueba de muestra (discos) por autoradiografía o métodos de titulación de líquidos.

Finalmente ambas pruebas de la muestra tanto sólido como extractos solubles de materiales pueden ser probados por enzima histoquímica, citoquímica o bioquímica.

Aunque el detalle de la medida bioquímica de la actividad enzimática es posible, esto destruye las células, y no da la información concerniente a la variación de la zona de la actividad enzimática que histoquímica o citoquímicamente dan. Toda clase de enzimas pueden ser usadas, por ejemplo nucleótidos cíclicos, ácidos y fosfatasa alcalinas y enzimas del ciclo de ácido cítrico.

Hay otro grupo de pruebas que miden la muerte celular y pérdida de permeabilidad de la membrana, las menos simples y tal vez el método mas antiguo es el de prueba azul por muerte y tinción celular. En adición radioisotopos compuestos como Na_2CrO_4 , H-timidina y H-uridina también pueden ser usados.

El ensayo de liberación de cromo, la sola citotoxicidad descrita en la ANSI/ADA involucra incubando un peso de suspensiones de cromo con varias concentraciones de materiales tóxicos solubles (o solo sólidos) por ambas 4 o 24 horas comparando la relación de cromo desde las pruebas simples con positiva (fenol) y negativa (no tratados) controles. A esta relación de cromo parece ser bastantemente un ensayo cuantitativo con buenas guías para interpretar la citotoxicidad donde hay contacto íntimo entre tejido y material.

Métodos in vitro basados sobre difusión son usados para probar efectos de 1 o 2 líquidos o materiales sólidos en establecer monocapas de células. Una de las pruebas es la de sobreponer agar en el cual una monocapa de cultivo celular es establecida antes agregando 1% de agar o agarosa mas una sustancia colorante vital (como un rojo neutro) a un cultivo fresco. El gel de agar forma una plataforma protectora sobre las células. Nutrientes, gas y sustancias tóxicas solubles pueden difundirse a través de agar. El rojo neutro puede ser transportado dentro y retener solo células vitales que son capaces de retener la membrana citoplasmática semipermeable.

En un numero de estudios se han reportado que la dentina forma una barrera alrededor de materiales tóxicos más difuso en orden a llegar al tejido pulpar. Los ensayos han sido y están siendo desarrollados para incorporar polvo dentinal o discos de dentina entre la muestra de la prueba y el sistema de ensayo celular.

La utilización de discos de dentina ofrece la ventaja de difusión direccional cuando hay continuidad de fluidos en los tubulos dentinales entre el material restaurativo y el medio de cultivo.

Ensayos de quimiotaxis y ensayos de reacciones inmunes no están descritos en el artículo 41 de la ANSI/ADA.

*Ensayos mutagénicos. Por que los exámenes de sustancias con animales de laboratorio como roedores, los ensayos mutagénicos iniciales pueden ayudar a

identificar si químicos o materiales son capaces de producir cáncer. Hay ensayos mutagénicos en la literatura para detectar un cambio en morfología o función metabólica de un tipo celular por toxicidad genética (como mutación causada por químicos).

En el documento 41 de la ANSI/ADA se describen dos pruebas: la prueba de Ames y la prueba de transformación de estilos celulares.

La prueba mas usada para termino corto de mutagenesis es la de Ames, usando como material mutante la Salmonella Typhimurium requiriendo histidina exógena. En un reciente reporte cuatro pruebas a corto plazo (SST) para gen tóxico fueron comparadas. Las pruebas Ames fueron las mas especificas (86% de no carcinogénicos dando una prueba negativa). La prueba Ames la más acertada.

La segunda prueba descrita en el articulo 41 de la ANSI/ADA es la transformación de estilos celulares la cual es una de las que usa muchos ensayos con células madres para la evaluación de mutagénesis. La característica de transformar fibroblastos es lo único para correlacionar con la habilidad de producir tumores in vivo.

Finalmente otra prueba para monitorear el potencial mutagénico de los químicos en animales es descrito en el articulo 41 de la ANSI/ADA como la prueba letal dominante. Espermatogénesis y eventos embrionarios tempranos sirven para medir la mutagenicidad. Una dosis dominante letal de la química es dando agua por inyección intraperitoneal a ratón macho. El macho es colocado con la hembra al 13 día después de la fertilización las hembras son sacrificadas y el valor pre y post implantación el huevo perdido es medido para determinar el efecto mutagénico de la química en pre y post de estados meioticos de espermatogénesis.

-Otro ensayo. Otros ensayos iniciales en el documento 41 incluye el seguimiento: Varios materiales o químicos que pueden dañar las células sanguíneas dando hemólisis. Esto es especialmente importante cuando el

material puede llegar a estar en contacto con o entrar en los vasos sanguíneos en el tejido conectivo.

También hay pruebas para determinar los efectos letales agudos de agentes administrados tempranamente por vía oral o intraperitoneal.

- Pruebas secundarias o intermedias. Después de un número de materiales que han sido intolerantes por pruebas iniciales, hay una serie de pruebas a término largo para identificar agentes que serían causantes de inflamación o reacciones inmunes.

Los controles y los sitios de pruebas son examinados y el espesor de las reacciones del tejido en el animal son registrados y fotografiados en color. Los animales son luego sacrificados y se hacen biopsias, son preparadas para evaluación histológica de cambios inflamatorios. Hay una prueba para el desarrollo de la hipersensibilidad de la piel en la cual los agentes son inyectados intradérmicamente. Varios días después esta inyección es seguida por tratamiento secundario con parches adhesivos con pruebas de sustancias aplicadas en el parche. Una prueba final de parche en la piel da un espectro desde no reacción a un color rojizo e hinchazón.

Aunque en especificaciones de la ADA sugieren colocar los materiales en tubos de polietileno, hallazgos recientes indican que algunos plásticos pueden ser la fuente de reacción del tejido.

- Pruebas de irritación pulpar o intradental. De acuerdo con la ANSI/ADA los materiales probados en la pulpa dental son colocados en cavidades Clase V en dientes humanos sin caries, monos u otros animales. La preparación debe ser uniforme, por ejemplo, 1.5 en dimensión cervical oclusal, 3 de diámetro para el ancho y una profundidad óptima que de 0.5 mm de dentina remanente.

Después de la anestesia y una profilaxis del diente, se preparan las cavidades bajo condiciones estériles. 15 dientes para la prueba y un mínimo de 10 dientes control. 5 cavidades son preparadas para cada prueba compuesta y para sustancias control en evoluciones de tres días, cinco semanas y ocho semanas.

- Polímeros y composites. Aunque polietileno y polipropileno han encontrado usos en el campo de la ortopedia y uno hay efectos tóxicos significativos en los tejidos, a ellos le faltan características físicas que podrían ser buenas en odontología.

Restauraciones con resina compuesta de otra manera, son completamente resistentes al desgaste.(40)

4.1.6 CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular no es una técnica nueva; existe desde principios del siglo. Inicialmente fue utilizado como método para estudiar el comportamiento de células animales que estuviesen libres de variaciones sistémicas que pudieran producirse en un animal bien sea durante una homeostasis normal o bajo el estrés de un experimento.

Hay 3 métodos diferentes de iniciar un cultivo así:

1. Cultivo de órganos.
2. Cultivo de explantes primarios.
3. Cultivo celular que implica que el tejido o el resultado del explante primario sea dispersado (mecánica o enzimáticamente) dentro de una suspensión celular, la cual será cultivada posteriormente como una monocapa sobre un sustrato sólido, o como una suspensión en el medio de cultivo.

El cultivo celular primario, puede ser obtenido de varias formas, por medio de migración celular así fragmentos de tejido adhesivo al sustrato adecuado o por disociación de tejido enzimático o mecánicamente, produciendo una suspensión de células o en últimas se da la unión a un sustrato.

Las enzimas usadas más frecuentemente son las preparaciones de tripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa o combinaciones.

El cultivo primario se puede obtener por 2 técnicas primordialmente:

1. *Técnica de explante*: Es un método originalmente desarrollado por *Harrison en 1907 y Carrel en 1912 (Freshney en 1987)*. Consiste en tomar un fragmento de tejido que es embebido en plasma sanguíneo o en linfa, mezclado con extracto embrionario y suero, promoviendo la migración de células del explante hacia el sustrato. Esta técnica es particularmente usada para pequeñas cantidades de tejido, tal como biopsias de piel en la que existe un alto riesgo de pérdida celular durante la disociación enzimática o mecánica. Dentro de las desventajas que exhibe esta técnica se puede anotar una pobre adherencia de algunos tejidos y la difícil selección de células en crecimiento. En la práctica los fibroblastos, los miofibroblastos, glia y los tejidos de origen embrionario migran exitosamente.
2. La disociación enzimática: En este método la disolución enzimática o mecánica de los tejidos evitan problemas de selección por migración siendo esto importante porque se produce un alto número de células representativas de un tejido en corto tiempo. Sin embargo, los explantes primarios seleccionan las bases de la migración celular y la técnica de disociación teniendo un gran efecto sobre el cultivo ya que detiene la capacidad de adhesión.

La tripsina es la enzima más usada en la disociación enzimática tisular, es tolerada completamente por la mayoría de las células, es efectiva para muchos tejidos y

cualquier actividad residual es eliminada después del lavado y es neutralizada por el suero o el medio de cultivo.

Es importante minimizar la exposición de las células a la cantidad enzimática de la tripsina, para preservar al máximo la viabilidad, por lo tanto cuando la tripsinización completa del tejido se da a 36.5° C se debe hacer preferiblemente por una hora para después ser removida por centrifugación y neutralizada con suero en medio.

Otra de las desventajas del uso de la tripsina en tejidos disgregados es el daño que puede resultar después de la exposición prolongada de la tripsina a 36.5° C, lo necesario para sembrar células luego de 30 min. De incubación con el método de tripsina caliente lo que las puede exponer por varios tiempos (3 a 4 h) que es lo que se requiere para disgregar el tejido intacto.

Un método simple para disminuir el daño de las células durante la disolución es humedecer el tejido en tripsina a 4°C para permitir la penetración de la enzima con poca actividad. El método con tripsina fría usualmente da una mayor producción celular si se compara con el método de calor. El método es conveniente y no requiere centrifugación. Una indicación particular del método de tripsina fría es manejar pequeñas cantidades de tejido.

La disociación con colagenasa es otra técnica en conjunción con la tripsina. Freshney en 1972, formula que la utilización de esta técnica es muy simple y efectiva para tejidos embrionario normal y adulto maligno. La colagenasa cruda es usada frecuentemente y su acción depende de la contaminación tisular con otras proteasas no específicas.

Subcultivos

El primer subcultivo representa una transición importante para el cultivo, ya que una vez que el cultivo primario es sub cultivado o pasajeado este se convierte en una línea celular.

La formación de una línea celular de una cultivo primario implica:

1. Un incremento en el número total de células a partir de varias generaciones.
2. Las células o líneas celulares con una aumentada capacidad de crecimiento van a predominar resultando en un grado de uniformidad en la población celular.

Cuando las células son seleccionadas para un cultivo, por clonación o algún otro método, la sublínea es conocida como "células transformadas" o sea células que sufren una mutación volviéndose aneuploides (ausencia de la serie normal de cromosomas); mutación que ocurre al azar después de cierto número de pasos.

La línea celular o las células transformadas pueden ser propagadas como una monocapa adherente o en una suspensión. Un cultivo de monocapa significa que las células se unieran al sustrato brindando así la posibilidad de sospechar un comportamiento similar en la propagación de las células normales.

Casi todas las células normales se dividen por un tiempo y luego mueren aun en condiciones optimas, como el fibroblasto humano que conserva su número de cromosomas ordinario diploide y solo se divide de 40 a 50 veces.

Medios de Cultivo

El descubrimiento de las células de explantes pueden ser subcultivadas y propagadas in vitro permite que se intente proporcionar medios mas definidos para el crecimiento celular y que puede reemplazar el medio natural.

Un medio de cultivo conveniente es aquel que contiene los elementos nutricios esenciales en concentraciones adecuadas, la cantidad salina necesaria y adecuado volumen de agua. Se debe encontrar exentos de sustancias inhibitorias y tener la consistencia deseada, la reacción pH conveniente para el metabolismo de cultivo y sobre todo debe ser estéril.

El medio esta designado por los materiales que estos contienen o por la respuesta esperada de los cultivos celulares. Se divide de acuerdo a si es sintético o compuesto por componentes definidos completamente o suplementados, que contienen fluidos naturales y aditivos como suero o extractos orgánicos.

Los medios varían complejamente desde medios definidos como el DMEN de Eagle, el cual contiene aminoácidos esenciales, vitaminas y sales, hasta medios compuestos como el 199 (Morgan y Col. 1950), CMRL 1066 (Moore y Col 1967) y F12 (Ham 1965); los cuales contienen un gran numero de aminoácidos diferentes y vitaminas.

Muchos cultivos primarios y líneas celulares derivadas de humano, roedor y fibroblasto de aves, pueden ser mantenidas en un medio relativamente simple como el DMEN de Eagle, suplido con suero bovino.

Solución salina balanceada

Las soluciones salinas balanceadas (BSS) se usan como diluyente para los medios mas complejos no provee crecimiento pero son utilizadas para limpiar las células y almacenarlas durante la manipulación experimental por un corto plazo (menos de 4 h) y para otra variedad de propósitos los cuales requieren una solución isotónica no necesariamente nutricional.

Una solución salina balanceada (BSS) esta compuesta por sales inorgánicas, usualmente incluyen bicarbonato de sodio y es suplida con glucosa aunque muchas veces la glucosa y el bicarbonato son omitidos.

Entre las (BSS) mas usadas en cultivos celulares se encuentra la solución salina balanceada de Hank (HBSS), la de Earls (EBSS) y el fosfato de buffer salino de Dulbecco. Estas y otras soluciones buffer tienen el mismo objetivo, principalmente proveer un pH normal salino y un medio osmótico para que sobrevivan las células. Para eso se utilizan HEPES que es el buffer comúnmente mas efectivo en pH entre 7.2 - 7.8 y la TRICINA en pH entre 7.4 - 8.0.

- HEPES: Con la introducción de las sustancias buffer dentro de los cultivos hubo algunas especulaciones respecto a que el CO₂ no era necesario para estabilizar el pH y podía ser omitido. Aunque el HEPES puede controlar el pH dentro de los rasgos fisiológicos, la ausencia de CO₂ atmosférico permite la adecuación en la que eventualmente se elimina el CO₂ disuelto. Cuando el HEPES es usado en presencia de CO₂ se ha encontrado que la concentración debe ser el doble que la del bicarbonato para adecuar la sustancia buffer.

Si estas soluciones se emplean como base de medio de crecimiento requieren ser fortificadas con varios extractos o soluciones naturales sintéticas. El aditivo mas popular es el suero de origen animal.

Suero

El suero mas comúnmente usado es el SFB, aunque también existe suero de becerro, caballo y humano. Entre las propiedades que el suero posee podemos enunciar:

1. Viscosidad: La viscosidad del medio de cultivo esta influenciado principalmente por el contenido de suero y en algunos casos tienen pequeños efectos en el

crecimiento celular. Este suero se puede usar agitándolo en células en suspensión o disociándolo con tripsina.

2. Temperatura: Aparte de la reacción directa de la temperatura sobre el crecimiento celular, esta puede influenciar el pH incrementando la cantidad de CO₂ en altas temperaturas, haciendo posible el ajuste del pH en 0,2 unidades por debajo de lo normal, ya que cada vez que el medio se abre para ser utilizado se va creando un mayor espacio en el frasco produciéndose una alcalinización del medio.

Aunque algunas líneas celulares todavía requieren de suplemento por medio de suero y no hay muchas sustancias donde los cultivos se puedan mantener y proliferar sin suero, se ha demostrado que este puede ser reducido u omitido sin alteración celular sin las modificaciones nutricionales y hormonales son hechas para medios apropiados para las líneas celulares.

Los cultivos celulares con presencia de suero tienen varias desventajas:

1. El suero, como es sabido, está constituido en su gran mayoría por albúmina pero sus otros componentes pueden tener un efecto indeseado sobre el crecimiento celular, entre estos están: Factores de Crecimiento, hormonas, minerales y lípidos. La presencia y acción de estos ha sido completamente determinada.
2. El cambio de suero requiere pruebas extensas para asegurarse que la reposición es posible: Las pruebas son de crecimiento, funciones especiales y hasta se pueden involucrar diferentes líneas celulares.
3. Si se usa más de un tipo celular cada uno puede requerir una porción diferente de suero.
4. El suero es frecuentemente contaminado con virus muchos de los cuales pueden resultar inocuos para los tejidos, pero presentan un factor desconocido adicional. Afortunadamente las técnicas de esterilización de los sueros han mejorado y eliminan el riesgo de infección del micoplasma.

5. El costo también ha sido citado con una de las desventajas en la utilización de suero.
6. Los factores de crecimiento del suero derivados del factor de crecimiento (PDGF) tienden a estimular el crecimiento fibroblástico en cultivos mezclados y pueden también inducir la diferenciación de células epiteliales.
7. La estandarización y la producción experimental del suero se dificulta.

Hoy en día el suero utilizado es de altísima calidad libre de toxinas, virus y probado para cultivo, de ahí su alto costo

Entre los medios más usados se encuentran:

- Medio mínimo esencial (MEM): Este medio contiene aminoácidos esenciales, vitaminas solo del grupo B y sales. Es deficiente en Ca para reducir la agregación y la unión celular.
- MEM de Dulbecco (DMEM): Es una modificación del MEM que contiene altas concentraciones de nutrientes. Sus composición es

Muchas modificaciones se han venido haciendo a partir de la fórmula original que aparece en la literatura entre estas tenemos el DMEM (Medio Eagles modificado de Dubelco). Es una modificación del medio basal Eagle (BME) el cual contiene una concentración mayor cuatro veces de aminoácidos y vitaminas además de los componentes suplementarios.

La fórmula original de DMEM contienen 100 mg/Lt de glucosa y fue el primero de ser reportado para cultivo de células de embrión de rata. La alteración con 4,500 mg/Lt de glucosa ha provisto de un buen resultado cuando se cultiva ciertos tipos celulares la selección de un nutriente para un medio está fuertemente influenciado por:

- Tipo Celular
- Tipo de Cultivo (Monocapa, Suspensión, o Clonal)
- Grado de Definición Química necesaria

Entre las propiedades físicas del medio debemos tener en cuenta:

1. pH
2. Osmolaridad
3. Sales
4. Glucosa
5. Vitaminas
6. Solución Buffer

La integridad celular se corrobora con técnicas colorantes como el Azul trypan, solución al 0,4%, es isotónica y estampada, se utiliza para el recuento de células en suspensión y para apreciar su viabilidad, contiene mentil-p-hidroxibelzoato, como antiséptico, el colorante no penetra en las células viables pero si en las células viables que tiñen de azul.

Las células a contar se resuspenden en 1 ml de DMEM, para realizar una buena coloración diferencial. A 0.05 ml de la suspensión celular se añade 0.05 ml de azul trypan al 0.4% obteniendo una relación 1:1 homogeneizando con una pipeta.

Se deberá hacer el recuento entre los 5 y 15 minutos después de haber mezclado con el colorante, luego se deposita una gota de la suspensión coloreada bajo el cubre objetos de la cámara y se deja sedimentar unos instantes antes de hacer el recuento en el microscopio.

Para un recuento exacto habrá que tener en cuenta la aportación del colorante como un factor de dilución, y no se establecerá el porcentaje de células viables hasta haber contado un numero suficiente (un centenar por lo menos)..

1. MANTENIMIENTO DE LINEAS CELULARES

Adherencia Celular

El medio de cultivo se cambia 24 horas después de la iniciación de las células simples, las células que no se han adherido tiene la apariencia de estar muertas. Luego de esto el medio se cambia cada tres días. Cuando las células fueron sembradas a baja densidad, a veces con la presencia de células nutricias, estas se demoran en crecer 7 días después del cambio de medio fresco.

Esto involucra lavar el frasco en un medio libre de suero o fosfato de buffer salino y se le agrega tripsina al 0.1%, la cual remueve las células del substrato. Cuando la monocapa del frasco es desprendida, la actividad de la tripsina es detenida agregando un medio que contenga suero ya que este inhibe la acción de la tripsina por medio del Alfa - 1º antitripsina. Las células son sedimentadas por centrifugación, y lavadas con medio de cultivo, contadas y sembradas en medio fresco de 104 - 105 células por ml. Con un cultivo primario, donde la eficiencia de siembra no es conocida, son usados números grandes. Cuando se realizan subcultivos de líneas celulares, se hace con las mismas características de un cultivo primario.

2. CONTEO CELULAR

El conteo celular da una medida del estado del cultivo a través del tiempo. Es esencial cuando se hacen subcultivos o cuando se miden los efectos de tratamiento experimentales en células. El conteo celular puede ser expresado en números de células por ml de medio o por cm² de áreas de la superficie adherida.

Muchos métodos para este fin son aceptables, entre estos están:

- a. Hemocitometria

1. MANTENIMIENTO DE LINEAS CELULARES

Adherencia Celular

El medio de cultivo se cambia 24 horas después de la iniciación de las células simples, las células que no se han adherido tiene la apariencia de estar muertas. Luego de esto el medio se cambia cada tres días. Cuando las células fueron sembradas a baja densidad, a veces con la presencia de células nutricias, estas se demoran en crecer 7 días después del cambio de medio fresco.

Esto involucra lavar el frasco en un medio libre de suero o fosfato de buffer salino y se le agrega tripsina al 0.1%, la cual remueve las células del substrato. Cuando la monocapa del frasco es desprendida, la actividad de la tripsina es detenida agregando un medio que contenga suero ya que este inhibe la acción de la tripsina por medio del Alfa - 1^o antitripsina. Las células son sedimentadas por centrifugación, y lavadas con medio de cultivo, contadas y sembradas en medio fresco de 104 - 105 células por ml. Con un cultivo primario, donde la eficiencia de siembra no es conocida, son usados números grandes. Cuando se realizan subcultivos de líneas celulares, se hace con las mismas características de un cultivo primario.

2. CONTEO CELULAR

El conteo celular da una medida del estado del cultivo a través del tiempo. Es esencial cuando se hacen subcultivos o cuando se miden los efectos de tratamiento experimentales en células. El conteo celular puede ser expresado en números de células por ml de medio o por cm² de áreas de la superficie adherida.

Muchos métodos para este fin son aceptables, entre estos están:

- a. Hemocitometria

- b. Conteo de rejilla counter
- c. Citometris de fluido
- d. Métodos bioquímicos

Recuentos Celulares

Se usan en vidrio modificado grabado con dos rejillas de conteo en un área conocida el cual es cubierto con un cubre objetos de un espesor preciso, para luego ser aplicado el volumen necesario para llenarlo. Son económicos, fáciles de usar y proporcionan un conteo reproducible si hay un número suficiente de células.

Para realizar este conteo se utiliza la cámara de Neubauer que tiene dos rejillas idénticas. Cuando el cubre objetos esta en la posición adecuada, la cámara tiene una profundidad de 0.1 mm. La suspensión celular es introducida en la cámara con una pipeta Pasteur. Dependiendo del número de células presentes, las células son contadas en la rejilla central donde los cuadros están limitados por líneas triples. El área de esta rejilla 1 mm² que corresponde a un volumen de 0.1 mm³, es decir que las células contadas en un cuadro son las que están presentes en 0.1 mm³ y para hallar el número total de células del cuadro las multiplico por 10.

Algunas células son encontradas en las líneas que limitan el cuadro, entonces es usual contra las encontradas en las líneas de arriba y a mano izquierda, pero debe ignorar las que están en el fondo a mano derecha.

Si el conteo celular es bajo es necesario contar las cinco rejillas en este caso:

$$\frac{\text{Número de Células}}{\text{MI}} = \frac{\text{Número Total}}{5 \times 10^4}$$

Precauciones al usar la cámara de Neubauer:

- a. Solamente use los cubre objetos correctos.

- b. Asegurese que el cubre objetos este en posición correcta.
- c. Si es posible trate de contar un mínimo de 200 células especialmente si el conteo es bajo.
- d. Resuspenda las células justo después del muestreo. Cunte las células adheridas rápidamente después de la tripsinización si es posible pues hay tendencia de aglutinarse.

Conteo Nuclear

Cuando el aglutinamiento de células adherida es el mayor problema las células pueden ser separadas con (0.1 ml. de ácido cítrico) y el nucleo se tiñe de color violeta cristal.

Los fibroblastos se llevaran a un medio de cultivo específico conservandose y almacenándose en una incubadora.

Estos cultivos se deben mantener sin contaminación y sin muerte celular por un periodo de tiempo determinado.

El cultivo *in vitro* permite controlar las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno, y CO₂) y fisiológicas para ser reproducibles los experimentos.

Conteo de la Viabilidad por Hemocitometria:

El método usual es el test de exclusión de tinción el cual es confiable para la tinción de células vivas y tiene la habilidad de teñir cruzando la membrana celular. Las células muertas son permeables las cuales van a extraer el colorante. El test provee información sobre la integridad de la membrana celular por eso no nos indica su funcionamiento.

Por otra parte las células vivas que han sido recientemente tripsinizadas para ser subcultivadas o aquellos tejidos primarios de tejido sólido o las descongeladas de una mezcla que contenga dimetilsulfóxido puede tener membranas permeables siendo más susceptibles para la absorción de colorantes. Una tinción que se puede mencionar utilizada para observar la viabilidad es el trypan azul al 0.4% en 0.81% de NaCl.

Esta tinción tiene desventaja de brindar un alto antecedente de tinción si el medio contiene suero. Usualmente las células son suspendidas en un medio sin suero. Una alícuota (0.2ml) de células es adicionada a un volumen igual de trypan azul mezclado por 2 minutos. Las células son introducidas en la cámara y se cuentan el número de células teñidas y no teñidas.

$$\text{Número de células viables} = \text{Número} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Número de células no teñidas} \times 100}{\text{Total números de células}}$$

4.2 MARCO CONCEPTUAL:

Diamino fluoruro de plata: agente cariostático

Cultivos celulares : cultivos de monocapas de células

Formocresol: sutancia fijadora de proteínas más utilizada en el tratamiento de pulpotomías; compuesta de tricresol, formaldehído-agua y glicerina.

CytoTox 96: prueba de citotoxicidad no radioactiva.

Células HeLa: células uterinas epiteliales cancerosas humanas

4.3. HIPOTESIS:

El diamino fluoruro de plata causa toxicidad en las células HeLa cultivadas, que puede ser detectada con un ensayo colorimétrico.

5. DISEÑO METODOLÓGICO:

5.1 Tipo de Estudio: Experimental

5.2 Método de Investigación: Se realizará 3 experimentos cada uno con 4 replicas donde se realizara la aplicación de diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición de diamino fluoruro de plata sobre cultivos de células HeLa.

5.3 Población y Muestra:

In vitro: Se utilizaran 72 pozos (3 cajas) con cultivos de células HeLa.

5.4 Eleccion y Categorización de las Variables:

Variable independiente:

Concentraciones diferentes del diamino fluoruro de plata (7,6mg/ml, 3,8mg/ml, 1,9mg/ml, 0.95mg/ml, 0,47mg/ml, 0,23mg/ml)

Tiempos de exposición diferentes del diamino fluoruro de plata sobre los cultivos celulares (1, 15, 30 y 60 minutos)

Variable dependiente:

- Viabilidad celular
- Muerte celular

Variable interviniente:

- Excipientes del medicamento

DISEÑO GRAFICO

*Diferentes concentraciones y tiempos de exposición
del diamino fluoruro de plata*

X

Viabilidad celular

Y

Excipientes del medicamento

Z

5.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:

El experimento se iniciara descongelando las células HeLa, para sembrarlas en botellas de 25cm²; posteriormente se procederá a realizar la tripsinización, para sembrar en caja de 96 pozos.

Luego se realizaran diluciones del diamino fluoruro de plata, las cuales se colocaron sobre las células de cada pozo (se utilizara 4 replicas para cada dilución), a tiempos de exposición elegidos. Al retirar el diamino se procedera a realizar la prueba de toxicidad, para lo cual se utilizara el kit de cytotox 96 (prueba colorimétrica, no radioactiva) o conteo, previa tinción con azul trypan.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En vista de que se realizaron diferentes diluciones del DAFP se decidió realizar análisis de ANOVA de una vía; para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre por lo menos dos grupos.

Adicionalmente se realizó un test de comparación múltiple de medias; el DMS (diferencia mínima significativa), el cual se efectúa cuando las pruebas de t múltiples cada una al nivel α , solo si a la prueba F es significativa al nivel α . esta tenía el fin de detectar entre que grupos existía diferencia significativa.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Procedimiento

El experimento se inicio, descongelando células HeLa las cuales se sembraron en 2 botellas de 25 cm², con medio más antibiótico y suero fetal bovino (DMEM +AB+SFB) al 10%, a los dos días se cambia el medio con SFB al 10%; se observa que no hay crecimiento de estas células, por lo cual se deciden sembrar otras, observándose a los pocos días que su crecimiento es lento; aproximadamente 3 días después se observa un cambio de color en el medio y se decide realizar la tripsinización (tripsina al 0.25%)

7.2 Protocolo de tripsinización

1. Se desecha el medio de la botella.
2. Se agregan 3ml de tripsina al 0.25 % a la botella de 25cm² y 6ml a la botella 75cm².
3. Se agita 10 veces y se desecha
4. Se colocan otros 3ml de tripsina y se incuba 5 a 8 min, hasta observar desprendimiento celular completo
5. Se adicionan 5ml de medio con suero al 5%, para detenerla actividad de la tripsina (Es importante precalentar el medio antes de utilizarlo)
6. Recoger en tubo de falcon de 15ml, y centrifugar 4min /200 g (1000 rpm)
7. Desechar el sobrenadante
8. Resuspender el precipitado en 3ml de medio con SFB al 5%
9. Realizar Conteo celular en cámara de Neubauer, para lo cual se utiliza azul de trypan en igual proporción que las células (30ul x 30ul)

7.3 Curva de Calibración Cytotox 96

El primer paso fue realizar una curva de calibración según el protocolo del kit de CytoTox 96 ; para esto se sembraron 4 pozos en cada fila de una caja de 96 pozos con diferentes diluciones celulares los cuales se dejaron incubando por 24 horas, en cámara de CO₂ al 5% a 37° C.

La caja se distribuyo de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fila A DMEM sin SFB

Fila B DMEM + SFB

Fila C 2000 células

Fila D 4000 células

Fila E 8000 células

Fila F 16000 células

Fila G 32000 células

Fila H 64000 células

A las 24 horas se agregan 10 µl de solución de lisis (composición es de 9% v/v Triton X-100) con el fin de producir la lisis celular para que se libere la enzima lactato deshidrogenasa, se incuba por 45 min. Posteriormente se transfieren 50 µl de cada pozo, hacia la otra mitad de la caja y se añaden 50 µl de substrato reconstituido a cada pozo y se cubre la caja con papel aluminio durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añaden 50 µl de solución de parada (ácido acético

1M). El ensayo resulta en la conversión de la sal de tetrazolium en rojo formazan que puede ser leído en lector de Elisa a una absorbancia de 490nm.

Esto se realizo para determinar el numero optimo de células para usar con el Cyto Tox 96 (según protocolo de Promega)

Debido a que en el microscopio la apariencia a las 24 horas de las filas C, D, E era de bajo numero celular y las demás filas mostraban mucha confluencia, se decidió sembrar otra caja con diluciones celulares menores, la primera fila sirvió de control (medio de cultivo sin SFB, ni células), así:

Fila A DMEM sin SFB

Fila B 1000 células

Fila C 2000 células

Fila D 4000 células

Fila E 8000 células

Fila F 12000 células

Fila G 16000 células

Se determino que el numero optimo celular es de 12000, debido a que al observarlo al microscopio a las 24 horas, el numero celular era suficiente y los espacios que quedan entre ellas eran mínimos, se observaba una confluencia aproximada del 90%.

7.4 Curva de toxicidad del formocresol

El siguiente paso fue realizar la curva de toxicidad con el formocresol, se sembraron pozos con 12.000 células cada uno, donde se realizo 6 diluciones de formocresol (19% formaldehido), el cual fue filtrado; cada dilución fue colocada en una fila diferente, las diluciones que se realizaron fueron:

1. 1:10 -----1.9% de formaldehido
2. 1:5 -----0.9%
3. 1:2.5 -----0.47%
4. 1:1.25 -----0.2%
5. 1:0.6 -----0.11%
6. 1:0.3 -----0.07%

7.5 Prueba de toxicidad del Diamino Fluoruro de Plata

Se inician las pruebas con el diamino fluoruro de plata (DAFP), inicialmente las cajas se distribuían de la siguiente forma:

En las columnas 1,2,3, y 4 de todas las filas se sembraron 12.000 células por cada pozo. En la columna 5 se colocó solamente DMEM + AB +SFB al 5%. Los pozos de la fila A correspondían al control sin células y sin DAFP:

Para iniciar se sembraron cuatro pozos con 12000 células, en cada fila, se incuban por 24 horas, luego se retira el medio y se aplica 100 µl de diamino fluoruro de plata durante 30 y 60 minutos, sobre las células y también en la columna 5(control). Después del tiempo indicado se toma 50 µl de cada pozo y se coloca en el otro extremo de la caja, a cada pozo se le adicionaba 50 µl de mezcla de sustrato, la caja se cubría con papel aluminio y se incubaba durante 30 minutos, a temperatura ambiente, luego se agregaba 50 µl de solución de parada a cada pozo. Posteriormente se realizaba la lectura, en el lector de Elisa. Las concentraciones iniciales que se utilizaron fueron:

1. 1:10 ----- 0.38 %
2. 1: 20 ----- 0.19 %
3. 1: 40 ----- 0.09 %
4. 1: 80 ----- 0.04 %
5. 1: 160 -----0.02 %
6. 1: 320-----0.01 %

7. 1: 640-----0.005 %

En vista de que era imposible leer correctamente las absorbancias, se realiza la evaluación por conteo directo usando azul trypan.

Se realiza el experimento con iguales diluciones y tiempos de exposición de 15 y 30 minutos, en la cajas de 96 se sembraban 28 pozos con 12.000 células cada uno, para cada tiempo de exposición se utilizaban 2 columnas, el Diamino fluoruro de plata se colocaba sobre las células al tiempo de exposición elegido y luego se retiraba y se desechaba, las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4, al retirarlo perfectamente se aplicaba 40 μ l de tripsina 0.25% hasta que se observara por microscopio desprendimiento, y se agregaba 40 μ l de DMEM+ AB+SFB 5% a cada pozo. Posteriormente se realizaba conteo de cada pozo, con azul trypan.

Se usaron diluciones mayores de DAPF de 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0,009%), 1/800(0.004), 1/1600 (0.002%). En una caja de 96 pozos, se sembraron 24 pozos, 4 pozos en las seis primeras filas, la caja se dejó incubar 24 horas. Luego el Diamino fluoruro de plata se colocaba sobre las células a un tiempo de exposición de un minuto, se retiraba de cada pozo y se desechaba, las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4, al retirarlo perfectamente se aplicaba 40 μ l de tripsina 0.25% hasta que se observara por microscopio desprendimiento, y se agregaba 40 μ l de DMEM+ AB+SFB 5% a cada pozo. Posteriormente se realizaba conteo de cada pozo, con azul trypan. El experimento se repitió tres veces.

8. RESULTADOS

8.1 Aspecto Morfológico de las células HeLa.

Las células que fueron obtenidas a partir de botellas de 25cm², y fueron sembradas a una concentración de 12000 células por pozo se observan a las 24 horas con una confluencia del 90%. En la monocapa se observa mayor densidad celular hacia el centro del pozo (Fig. 1A). El aspecto morfológico de las células HeLa muestra una forma dendrítica con polos de crecimiento citoplasmático, que se proyectan a los espacios intercelulares. Se evidencia núcleos definidos y presencia de dos nucleolos, predomina la cromatina extendida, relación de nucleo-citoplasma de 1 a 3. (Fig. 1B).

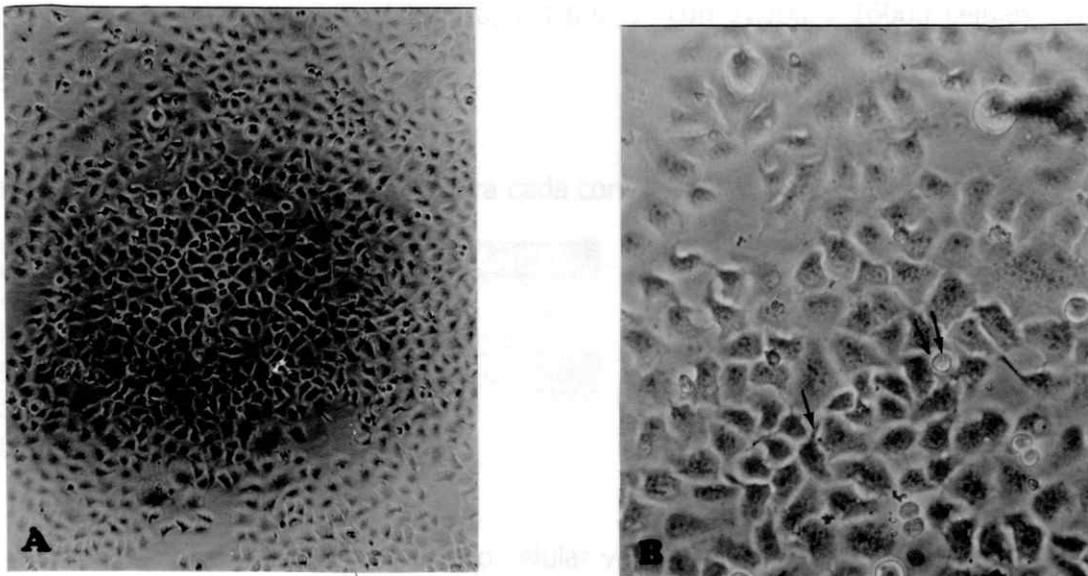


Figura 1 A. Vista panorámica de un pozo (x 10), a las 24 horas después de haber sido sembrado con 12.000 células HeLa. Mayor confluencia hacia el centro. B. Aspecto morfológico células HeLa (x 4): predominan las formas dendríticas. (flecha). Presencia de artefactos o células no adheridas. (2 flechas)

8.2 Curva de calibración del Kit Cytotox 96

Esta se realizo según el protocolo de promega para el kit de Cytotox 96, con el fin de determinar el número optimo celular a sembrar.

El primer paso fue realizar una curva de calibración según el protocolo del kit de cytoTox 96; para esto se sembraron 4 pozos en cada fila de una caja de 96 pozos con diferentes diluciones celulares (1000, 2000, 4000, 8000, 12000 y 16000), la primera fila sirvió de control (medio de cultivo sin células); los cuales se dejaron incubando por 24 horas, en cámara de CO₂ al 5% a 37° C. El procedimiento se realiza de acuerdo a lo anotado en materiales y métodos. Luego se procede a realizar la lectura en lector de Elisa a una absorbancia de 490nm

El promedio de absorbancia de cada concentración de células sembradas, se observa en la tabla 1 iniciando con el blanco; los pozos con 12000 y 16000 células las absorbancias estaban por encima de 2.

Tabla 1. Promedio de absorbancia para cada concentración celular.

# CELULAS	PROMEDIO ABSORBANCIA
BLANCO	0.036
1000	0.493
2000	0.722
4000	1.5283
8000	1.9256

La curva de calibración entre el numero celular y la absorbancia obtenida para cada una de ellas, se observa en la figura 2. El coeficiente de correlación lineal fue de 0.90

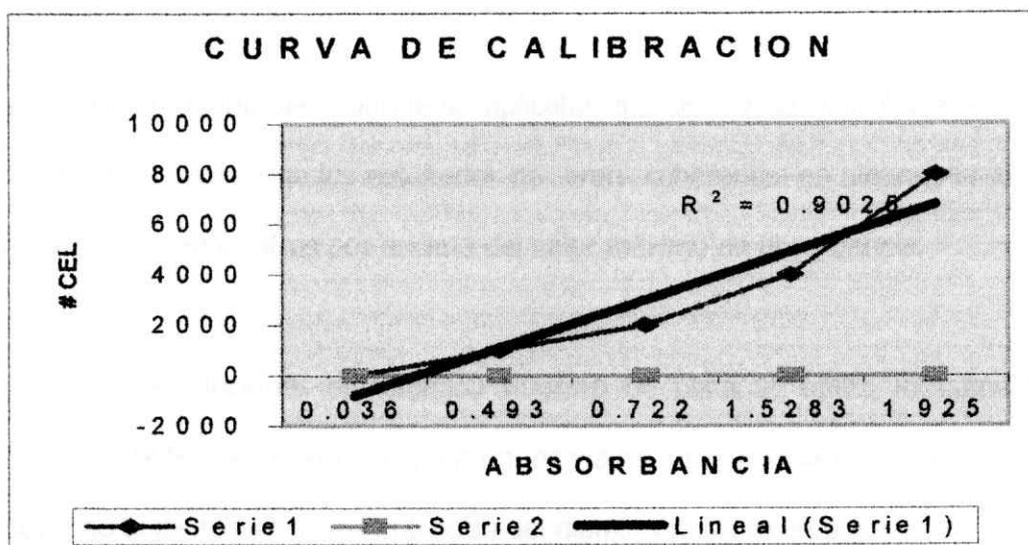


Figura 2. Curva de calibración entre el número celular y la de absorbancia obtenida para cada una de ellas, en la prueba con el kit citotox.

Se determino que el número optimo celular es de 12000, debido a que al observarlo al microscopio a las 24 horas, el número celular era suficiente y los espacios que quedan entre ellas eran mínimos, se observaba una confluencia aproximada del 90%.

8.4 Curva de Calibración del formocresol

Al realizar la lectura de la caja de 96 pozos, donde se había aplicado el formocresol en diferentes diluciones se determina que el aspecto microscópico de los pozos muestra precipitación por lo cual los valores de absorbancia en las diferentes longitudes de onda probadas muestran interferencia con el medio de cada pozo, haciendo imposible realizar la lectura

8.5 EXPERIMENTO CON DAFP

En los experimentos iniciales donde se aplicaba el DAFP y se utilizaba el kit del Cytotox 96, se encontró que los resultados no eran coherentes en algunos casos y en otros se observaban cifras por encima del valor máximo de absorbancia.

Para realizar las diluciones del diamino fluoruro de plata se utilizó inicialmente DMEM + AB + SFB 5%, y se observaba en los viales una precipitación la cual iba disminuyendo al disminuir la concentración del diamino fluoruro de plata.

Después de realizar varios experimentos se determinó por observación directa y microscopio que en las cajas de 96 pozos, había precipitación del diamino fluoruro de plata.

Analizando cada experimento se llegó a la conclusión de que el diamino fluoruro de plata podría estar reaccionando con el suero fetal bovino (SFB) por lo tanto se decidió utilizar Medio (DMEM) + antibiótico (ab) sin SFB, para preparar las diluciones del diamino; a la vez se realizaron diferentes tiempos de exposición a 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos.

A pesar de esto después de varias pruebas, tanto al preparar las diluciones y en las cajas se continuaba observándose precipitación, lo que seguía impidiendo realizar la lectura espectrofotométrica.

El experimento se decide realizar con las concentraciones iniciales (a 15 y 30 min), el DAFP es colocado durante los tiempos de exposición elegidos, luego se retiraba y

se desechaba, las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4; al retirarlo se aplicaba 40 µl de tripsina 0.25%, hasta que se observaba por microscopio desprendimiento y se agregaba 40 µl de DMEM + AB + SFB al 5% a cada pozo, luego se realiza conteo en la cámara de Neubauer y se determino la viabilidad econtrandose que no quedaban células vivas en ninguna de las diluciones , a los diferentes tiempos de exposición utilizados.

Por lo cual posteriormente, en una caja de 96 pozos se sembraron 28 pozos con 12.000 células cada uno, la caja se dejo incubar por 24 horas; luego el Diamino fluoruro de plata a diluciones de 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0,009%), 1/800(0.004), 1/1600 (0.002%), se colocaba sobre las células durante un minuto, cada concentración se aplico en 4 pozos de cada fila, luego se retiraba y se desechaba; las células de cada pozo se lavaban 3 veces con buffer fosfato 7.4, al retirarlo se aplicaba 40 µl de tripsina 0.25% hasta que se observara por microscopio desprendimiento, y se agregaba 40 µl de DMEM+ AB+SFB al 5% a cada pozo y se realizaba el conteo de cada pozo en la cámara de Neubauer. El experimento se repitió tres veces, en cada experimento se realizo 4 replicas.

Después de colocar un minuto el DAFP dentro del pozo se observa un desprendimiento de la monocapa y un cambio de color de esta. El aspecto de los pozos varia según la dilución utilizada, en las diluciones menores, la tinción de la monocapa es mayor. El conteo celular de la dilución 1/50 en el microcopio invertido de contraste de fase, se observa en la figura 3. El aspecto de la monocapa celular un minuto después de haber aplicado la dilución 1/100, se observa en la figura 4A.

La figura 4B. muestra el conteo celular con azul trypan a las células HeLa a las que se les aplico la dilución 1/100. El aspecto de las células dentro del pozo despues de aplicar un minuto la dilución 1/400, se muestra en la figura 5A. La figura 5B muestra el conteo celular a las células que se les coloco la dilución 1/400.

Se evidencia que el número de células muertas va disminuyendo a medida disminuye la concentración del DFAP, tanto que a partir de las diluciones 1/400 (0.009%), se presentan pocas células vivas y el número de estas va aumentando a medida aumenta la dilución. El promedio de células muertas es alto.

En las diluciones mayores aunque también se observa un desprendimiento de la monocapa, las células se encuentran más integras. La Figura 6A muestra las células HeLa después de un minuto de haber aplicado una dilución 1/800. La figura 5B. muestra el conteo celular con azul trypan a las células que se les aplico la dilución 1/800.

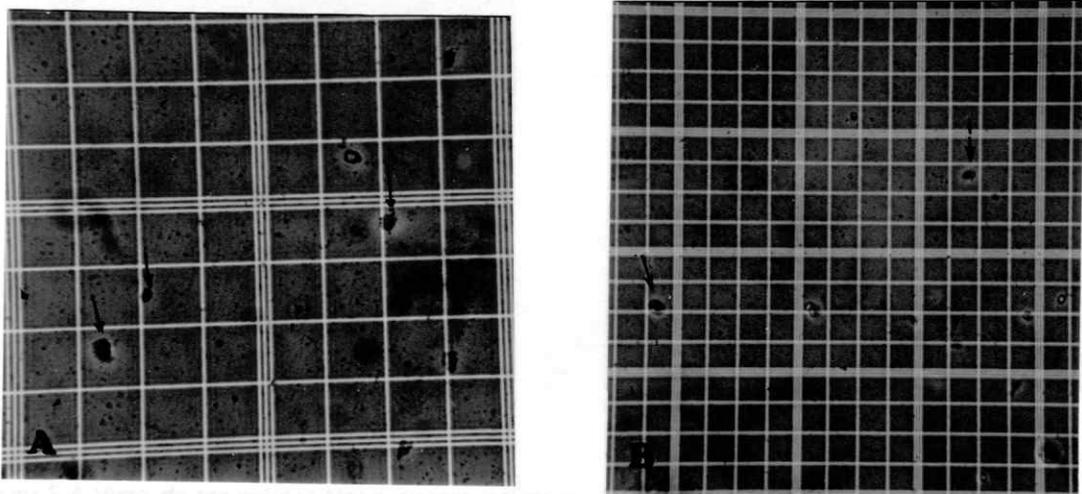


Figura 3. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución de DAFP 1/50. A mayor aumento(x20)Se observan células teñidas con azul trypan (flechas)y gran cantidad de desechos celulares en el fondo. B. A menor aumento. (x10)

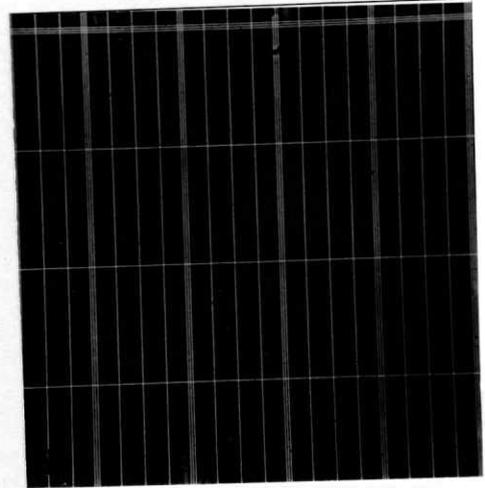
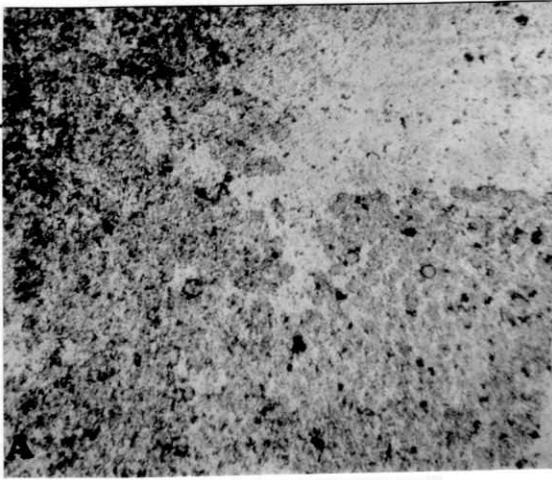


Figura 4.A. Vista de las células HeLa dentro del pozo ($\times 10$), al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución $1/100$. Se observa una gran disrupción de la monocapa. B. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución $1/100$.

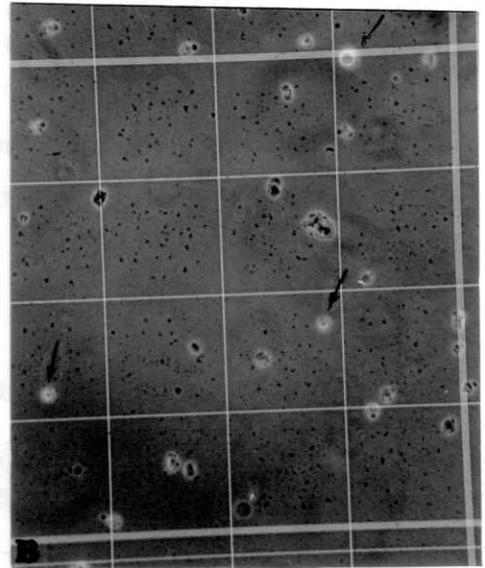
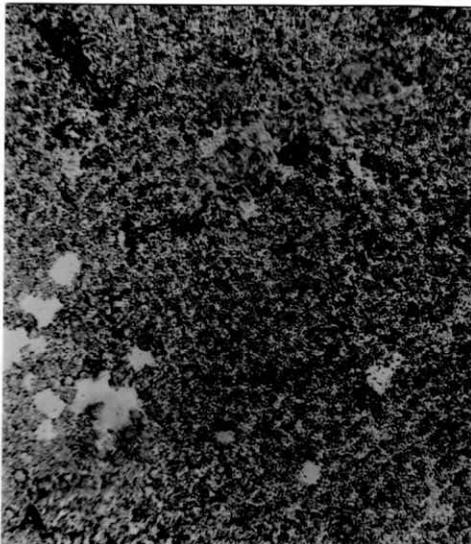


Figura 5.A. Vista de las células HeLa dentro del pozo, al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución $1/400$. No hay integridad de la monocapa. B. Conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido, dilución $1/400$. Se empieza a observar células birefringentes (flechas).

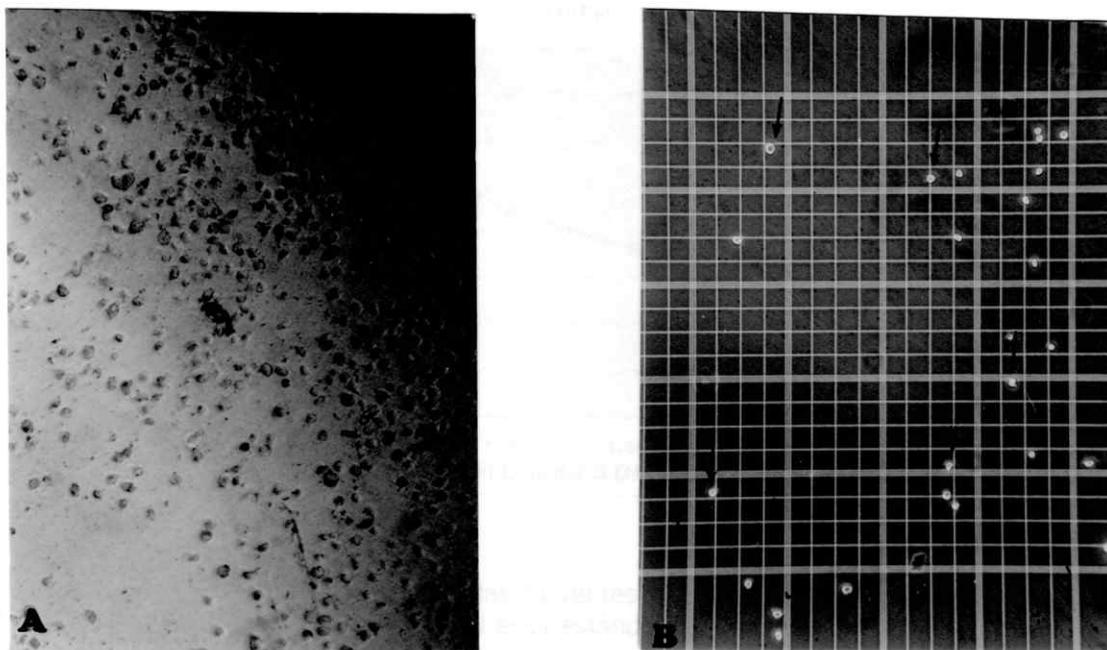


Figura 6. A. Vista de las células HeLa dentro del pozo, al haber aplicado el DAPF por un minuto, en una dilución 1/800. La desintegración de la monocapa no es tan severa como la observada en diluciones mayores. B. Conteo celular en microscopio invertido, dilución 1/800. El número de células birefringentes aumenta.

En cada dilución se obtuvo una cifra de células muertas y vivas (Figura 7 y 8), el número total se promedió, se obtuvo la desviación estándar y error de la media (Tabla 2) Se muestra el promedio de células vivas y muertas, y el error estándar de la media

Tabla 2. Resultado de los Conteos de Células Posterior al Tratamiento con DFAP.

DILUCIONES DAFP	PROMEDIO MUERTAS	CEL.	PROMEDIO CELULAS VIVAS
1/50	14.432,8 ± 624.24	0	
1/100	11.712 ± 294.83	0	
1/200	8.930 ± 241.9	0	
1/400	7.296 ± 183.51	2.960 ± 582.4	
1/800	4.080 ± 395.4	4.032,5 ± 762.42	
1/1600	3.702,8 ± 521.89	9.200 ± 775.62	

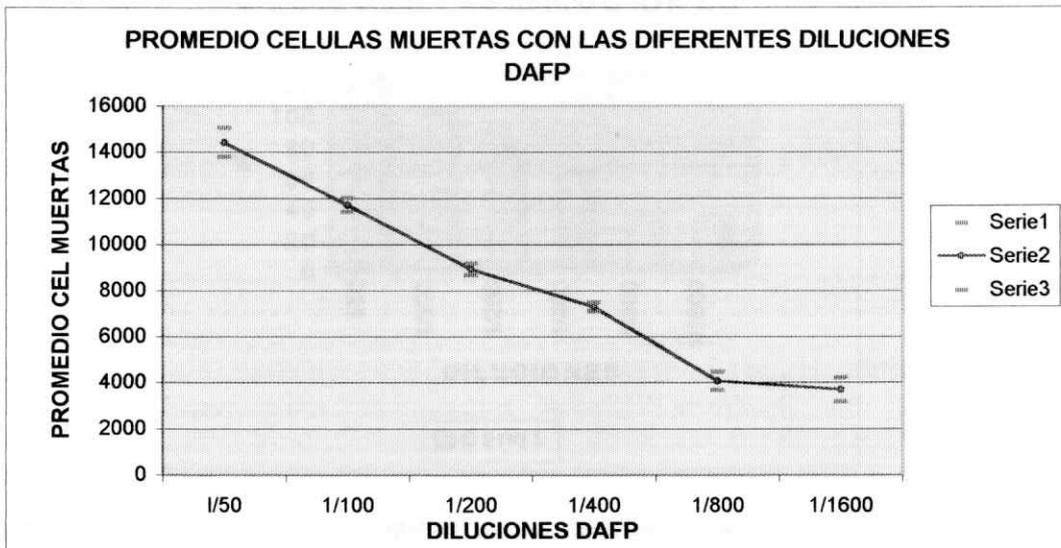


Figura 7 Numero células muertas con las diferentes diluciones de diamino fluoruro de plata. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media.

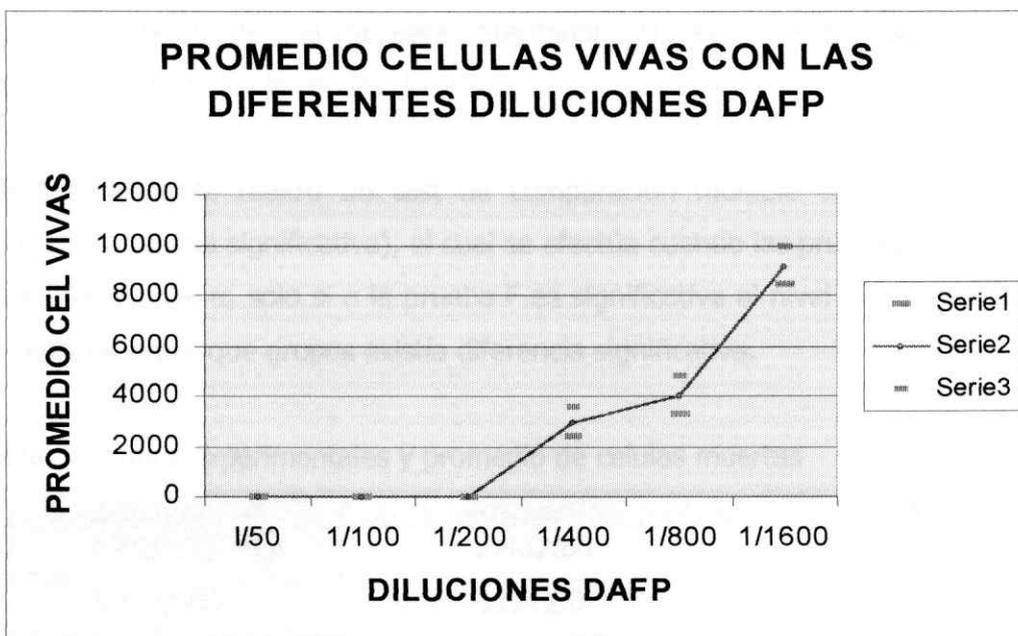


Figura 8. Número célula vivas con las diferentes diluciones de diamino fluoruro de plata. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media.

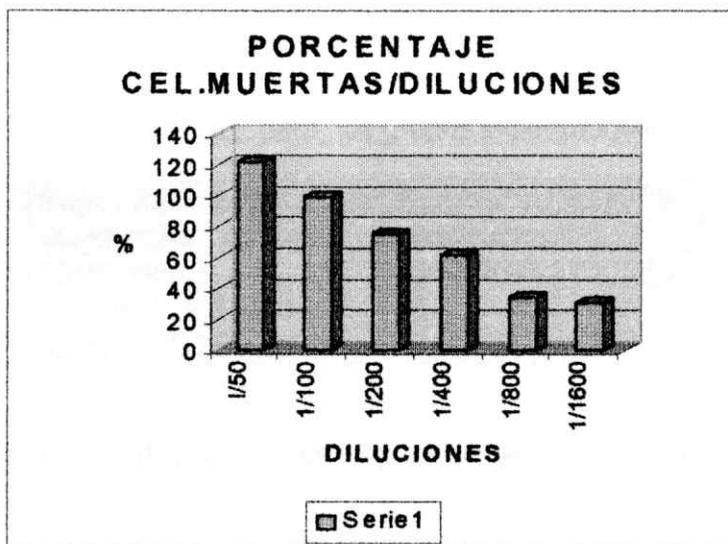


Figura 9 Relación entre el porcentaje de células muertas en cada dilución utilizada, teniendo como referencia el promedio de células vivas en el control.

8.1 Análisis estadístico

En vista de que se realizaron diferentes diluciones del DAFP se decidió realizar análisis de ANOVA de una vía; para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre por lo menos dos grupos.

Adicionalmente se realizó un test de comparación múltiple de medias; el DMS (diferencia mínima significativa), el cual se efectúa cuando las pruebas de t múltiples cada una al nivel α , solo si a la prueba F es significativa al nivel α . esta tenía el fin de detectar entre que grupos existía diferencia significativa.

Tabla 3. Grupos experimentales y promedio de celulas muertas

Grupo dilucion	Promedio	n
1 (1/50)	14432.80	10
2(1/100)	11712.0	10
3(1/200)	8930.90	11
4(1/400)	7296.0	10
5(1/800)	4080.0	8
6(1/1600)	3702.85	7

Promedio de medias: 8771.571

Tabla 4 Valores de la prueba F para los grupos experimentales

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Promedio de cuadrados	rel F	Probabilidad
Entre	784938466.3	5	156987693.27	108.17	0.000E+00
Dentro	72562579.366	50			
Total	857501045.71	55			

Tabla 5 Datos de estadística descriptiva para los datos de celulas muertas en cada grupo experimental

CONCENTRACION	MEDIA	DS	VARIANZA	n	Suma de Cuadrados
1/50 (X1)	14432.8	3741.63	3896838.4	10	38968384
1/100 (X2)	11712	932.34	869262.22	10	8692622.2
1/200 (X3)	8930	802.6	773485.71	11	8508342.8
1/400 (X4)	7296	580.32	336782.22	10	3367822.2
1/800 (X5)	4080	1118.36	1250742.85	8	10005942.8
1/1600 (X6)	3702.85	1380.79	1906590.47	7	13346133.29

gl: 50 (GRADOS DE LIBERTAD)

TOTAL: 82889247.3

La diferencia minima significativa (DMS) es un método que se usa para efectuar pruebas de t multiples cada una al nivel α , solo si la prueba F es significativa al nivel α .

La DMS al nivel α para comparar μ_j con $\mu_{j'}$ está dada por la ecuación:

$$DMS = t_{\frac{\alpha}{2}, v} \sqrt{\frac{1}{n_j} + \frac{1}{n_{j'}}}$$

Se concluye que $\mu_j \neq \mu_{j'}$, si $|\mu_j - \mu_{j'}| > DMS_{\alpha}$

Valor de DMS en este experimento es: 2111,89

Valor absoluto de la diferencia entre medias de grupos vecinos

- X1-X2 = 2720.8
- X2-X3 = 2782
- X3-X4 = 1634
- X4-X5 = 3216
- X5-X6 = 377.15

La prueba consiste en detectar el valor de las diferencias entre grupos que serán significativos si son mayores que los valores de la DMS calculada:

$X_1 - X_2 = 2720.8$	$>$	2111.89
$X_2 - X_3 = 2782$	$>$	2111.89
$X_3 - X_4 = 1634$	$<$	2111.89
$X_4 - X_5 = 3216$	$>$	2111.89
$X_5 - X_6 = 377.15$	$<$	2111.89

Para una significancia de 0.05 con 50 gl se encuentra una diferencia significativa entre la concentración 1/50 y 1/100; 1/100 y 1/200; y 1/400 y 1/800; ya que la diferencia de medias entre los grupos es mayor que el valor de DMS.

9 DISCUSION

En el área de la odontología pediátrica se investiga permanentemente, uno de los fines es lograr el tratamiento de las lesiones cariosas sin eliminar la totalidad de la dentina afectada, promoviendo actividades que disminuyan los niveles de la intervención profesional. Se ha ensayado por mucho tiempo el uso de nitrato de plata, la adición de flúor a diferentes productos odontológicos, fluoruro de estaño y el diamino fluoruro de plata, con el fin de ofrecer alternativas más económicas y menos traumáticas para los pacientes pediátricos.

El DAFP ha sido usado por varias escuelas de odontología en el mundo para el tratamiento de caries incipientes. En la revisión realizada no se han encontrado datos sobre los efectos tóxicos del compuesto, por lo tanto nuestro trabajo consistió en hacer una primera aproximación al estudio del comportamiento de éste compuesto in vitro.

Se han descrito las reacciones químicas que ocurren sobre la dentina al ser aplicado el DAFP y se postula que el grado de insolubilidad alcanzado por éstos cristales es mucho mayor que con otros compuestos, favoreciendo la detención de los procesos cariosos.

El DAFP ha sido usado por temporadas en varios países, en la actualidad su estudio se ha vuelto de particular interés, por las repercusiones en la salud y en la economía que podría traer su uso generalizado.

La mayoría de referencias se encuentran en el Japón, en Estados Unidos no se encuentra mención sobre el producto. En la información conseguida se considera la aplicación de DAFP como un método "no traumático" para tratar la caries dental. La mayoría de los estudios que se han realizado reportan ensayos de tipo clínico, los cuales muestran que pincelando el DAFP, actúa como un cariostático en lesiones cariosas incipientes, su acción no solo es atribuida al flúor sino a la reacción con la

plata (Barreiro 1984), a la cual se le atribuyen acción bacteriostática e inhibidora de enzimas, adicionalmente a la formación de cristales de plata altamente insolubles y precipitados de Proteína-plata (18).

Estudios recientes sugieren que diferentes iones metálicos pueden ser liberados desde metales dentales u otros biomateriales, pueden causar efectos tóxicos sobre varias células. Schedle (1998) es este estudio muestra el efecto de 14 metales sobre la liberación de histamina desde basofilos, mastocitos. De los 14 metales se encontró que la plata y el mercurio son capaces de inducir liberación de histamina en basofilos y mastocitos, lo que se asocia con signos ultraestructurales de necrosis, pero no de apoptosis como se vio con el platino. (41)

En 1989 (Ellender y Ham) se reportó un estudio en el cual se implantaron microesferas acopladas a plata en el tejido conjuntivo de rata y detectaron una reacción inmediata que consistió en una necrosis localizada e infiltración celular. Los fibroblastos modificaron severamente su ultraestructura y la matriz extracelular sufrió un proceso de disrupción. Adicionalmente se encontraron fibras colágenas en el interior de vacuolas citoplasmáticas indicativas de una fuerte interferencia en la biosíntesis del colágeno. (42)

Rungby (1990) muestra que al exponer ratas en periodo fetal y adultas a la plata resulta en depósitos del metal en diferentes estructuras del sistema nervioso central. Además la toxicidad se midió a nivel celular y se encontró que causa necrosis por coagulación, bioquímicamente causa un incremento en la peroxidación de lípidos (43)

Kameta (1979) realizó un estudio donde se hizo tratamiento sobre caries en dientes anteriores y al grupo experimental se le aplicó fluoruro de plata amoniacal y al grupo testigo se le aplicó agua oxigenada; aunque los porcentajes de severidad del avance superficial y en profundidad de las cavidades son menores para el grupo de

DAFP, los investigadores no encontraron que hubiera diferencia estadísticamente significativa, argumentando que el número de sujetos fue limitado.(34)

Algunos estudios clínicos nos conducen a pensar que si el DAFP es aplicado sobre caries incipientes, con tubulos dentinales expuestos, este puede difundirse hasta la pulpa produciendo una injuria severa; reconociendo que la permeabilidad dentinal no es uniforme en todo el diente, siendo mucho mayor sobre la dentina oclusal específicamente sobre los cuernos pulpares. La rata por medio de la cual los químicos se difunden a la dentina depende de la interacción entre los mecanismos hidrodinámicos en la dentina y la pulpa, además de la interacción con las fibras nerviosas. Este último componente es importante, pues el mecanismo de defensa pulpar, no solo involucra el selle de tubulos dentinales sino también involucra eventos de defensa intrínsecos, producto de la degeneración de las terminales nerviosas pulpares (Pashley, 1991).(4)

Hosoya (1990) realizó un estudio sobre pulpas expuestas en perros, realizando una cavidad pequeña en los molares. Al grupo experimental (28 dientes), se le aplico 0.01 ml de diamino fluoruro de plata al 38% durante 3 minutos, al grupo control no se aplicó ninguna solución. Los especímenes se procesaron histopatologicamente a los 3, 7 y 30 días, a los 3 días , en los dos grupos, se mostraron cambios histopatológicos como necrosis, inflamación supurativa, infiltración celular, sangrado e hiperemia; a los 7 días , en los dos grupos, se encontró necrosis parcial, inflamación supurativa, sangrado e hiperemia pulpar (en porcentajes menores que el grupo anterior); después de 30 días los porcentajes de inflamación supurativa e inflamación disminuyeron en los 2 grupos. Se concluye que el diamino fluoruro de plata al 38% no muestra ningún efecto protector sobre las pulpas dentales. (33)

Rodriguez (1996) realizó un estudio, sobre dientes temporales, en niños entre 2 y 4 años, que presentaban lesiones cariosas que comprometían dentina, reviso 80 pacientes, con antecedentes de aplicación de diamino, en el estudio también se aceptaron pacientes que solo presentaban lesiones cariosas sobre esmalte. Los

resultados fueron los siguientes: 74 pacientes con destrucción generalizada, 40 pacientes con abscesos dentoalveolares, 30 pacientes con fistulas, 15 pacientes con edema facial. Concluye que el empleo del diamino debe ser precedido de un buen diagnóstico, teniendo en cuenta la profundidad de la lesión. (35)

Acerca del flúor, Helgeland (1976) muestra que sobre cultivos celulares el flúor exhibe un incremento en el efecto de citotoxicidad dependiendo de la acidificación del medio de incubación. Se sugiere que el fluor y un bajo pH pueden jugar un papel decisivo en la citotoxicidad de materiales que incluyan flúor. Además se observa un incremento en la actividad glicolítica en presencia del flúor cuando hay disminución del pH.(44) Zeiger (1993) describe que altas concentraciones de flúor inhiben el crecimiento a su vez la síntesis de DNA y proteínas en células mamíferos.(45)

En cuanto a su toxicidad algunas casas comerciales consideran la toxicidad del DAFP casi igual a la del fenol o la formalina. Yu-Chang et al, en 1998, evaluó in vitro sobre fibroblastos pulpares humanos la citotoxicidad (por medio de una prueba de fluorescencia) y genotoxicidad (prueba de precipitación de DNA) de varios medicamentos que se utilizan dentro de canales pulpares, entre ellos evaluó compuestos fenólicos, mostrando que estos reducen el contenido de ácido polinucleico de doble cadena de los fibroblastos en un periodo de 24 horas de cultivo, este fenómeno es dependiente de la concentración administrada, así pues, para el DAFP no es ninguna ventaja tener una toxicidad similar al fenol. (46)

Otras casas comerciales aconsejan diluirlo con agua destilada "para minimizar su acción sobre la pulpa". Desafortunadamente ni los fabricantes ni en la literatura en general, reportan ningún estudio que muestre la toxicidad de este material.(47)

Por medio de la curva de la calibración realizada según el protocolo del kit Citotox 96 y observación directa se determinó que el número celular óptimo a sembrar era de 12.000 células por pozo para una caja de cultivo de 96 pozos.

En los ensayos en los que se utilizó formocresol, con el objeto de usarlo como control positivo de citotox, se determinó que la toxicidad de este no puede ser medida por medio del kit de Cytotox 96, ya que se encuentran datos incoherentes al realizar la lectura, lo que sugiere que hay interferencia con el medio de cada pozo. Además se observa directamente turbidez en cada pozo, al parecer provocada por la reacción entre el sustrato de la LDH y los componentes del formocresol. El porqué de la interferencia, es difícil de explicar debido a que se desconocen los componentes de la mezcla de sustrato del kit de Cytotox 96.

En las pruebas iniciales con el kit de cytotox 96 con el DAFP se utilizaron concentraciones de 1:10 (0.38 %), 1: 20 (0.19 %), 1: 40 (0.09 %), 1: 80 (0.04 %), 1: 160 (0.02 %), 1: 320 (0.01 %) y 1: 640 (0.005 %) y se evaluó con el kit de Cytotox 96.

Los tiempos de exposición inicialmente utilizados fueron de 60 minutos, 30 minutos, 15 minutos; después de varias pruebas se encontró que se presentaba una interferencia al realizar la lectura, la cual se atribuyó a una reacción entre el DAFP y las proteínas del SFB. Al observar los pozos se veía un precipitado, la densidad de este variaba según la concentración de DAFP que era utilizada, por lo tanto se decidió disminuir el tiempo de exposición.

Posteriormente se utilizó las mismas concentraciones a tiempos de exposición de 15 y 30 minutos, pero debido a que se siguió presentando la interferencia con el medio, se decidió hacer la evaluación por conteo directo usando azul de trypan. Al realizar el experimento completo y hacer el conteo celular con cada dilución de DAFP se determinó que en todas las concentraciones utilizadas se observa muerte celular. Debido a los resultados encontrados se utilizaron diluciones mayores.

Realizando diluciones mayores de DAFP, 1/50 (0.07%), 1/100 (0.03%), 1/200 (0.01%), 1/400 (0.009%), 1/800(0.004), 1/1600 (0.002%), se evidencia por conteo directo con azul trypan, que el número de células muertas va disminuyendo a

medida aumenta la dilucion del. DAFP, y a partir de las dilucion 1/400 (0.009%), se presentan células vivas, además el número de éstas va aumentando a medida que aumenta la dilución del DAFP.

Se observa que en la mayor concentración de DAFP, el promedio de células muertas (14.432 cel /pozo) es mayor que el sembrado (12.000 cel/pozo), esto seguramente es debido a que la disrupción de la monocapa es tan severa que lo que se puede estar contando son desechos celulares más que células.

En vista de la dificultad de encontrar información sobre el agente y los resultados encontrados en este estudio, se plantea la necesidad de realizar otros estudios de biocompatibilidad , antes de iniciar su uso en forma masiva.

CONCLUSIONES

1. La toxicidad del DAFP es imposible de determinar con el kit de Cytotox 96 (prueba colorimetrica)
2. El efecto del DAFP sobre la monocapa celular es similar a los diferentes tiempos de exposición utilizados (60 min, 30min, 15 min y 1 min) por lo tanto el procedimiento se relizo a un minuto de exposición.
- 3.
4. Al aplicar DAFP sobre los pozos con las células HeLa se evidenció una grave disrupción de la monocapa celular.
5. La toxicidad del DAFP se midió por medio del método de exclusión con azul trypan, bajo microscopio invertido.
6. El número de células muertas va disminuyendo a medida aumenta la dilución del DAFP.
7. Es importante denotar que en la mayor concentración de DAFP, el promedio de células muertas (14.432 cel /pozo) es mayor que el sembrado (12.000 cel/pozo), esto seguramente es debido a que la disrupción de la monocapa es tan severa que lo que se puede estar contando son desechos celulares más que células.

8. A partir de la dilución 1/400 se observa la presencia de algunas células vivas y el número de estas aumenta a medida que aumenta la dilución de DAFP utilizada.

9. El test de comparación de medias, DMS (minima diferencia significativa) encontró que para una significancia de 0.05 con 50 gl se encuentra una diferencia significativa entre la concentración 1/50 y 1/100; 1/100 y 1/200; y 1/400 y 1/800; ya que la diferencia de medias entre los grupos es mayor que el valor de DMS.

RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios de biocompatibilidad, antes de iniciar el uso del DAFP en forma masiva.
2. Plantear un estudio de citotoxicidad sobre cultivos primarios de fibroblastos de pulpa.
3. Investigar la penetración del DAFP en dentina desmineralizada.
4. Comparar la toxicidad del DAFP con otros materiales que han demostrado mejor comportamiento como es el caso de los barnices fluorados.

REFERENCIAS

1. SELTZER. The Dental Pulp. 3th edition 1993.
2. CATE TEN.Oral y Histology. 4ª edition. Moslay 1994.
3. MARSHALL, JR. Dentina Micro estructura y aracterización. Quinttessence Internacional, #9, 1993.
4. PASHLEY.Correlaciones Clínicas de Estructura y Función Dentinales.Journal of Prosthetic dentistry,1991.
5. SHAFFER, B.M. LEVY. Tratado de Patología Bucal. Nueva Editorial. Interamericana. Mexico. 1987.
6. THYLSTRUP ANDRES. FEJERSKOV OLE. Textbook of Clinical Cariology. Munksgaard. Second Edition. 1994.
7. SILVERSTONE. Caries Dental: Etiología, Patología y Prevención. Editorial El Manual Moderno, S.A. Mexico 1985
8. NEWBURN. Cariology. Quintessence books. 1989. Third Edition. 1989.
9. INGRAM, G.S.; Edgar, W.M. Interactions of Fluoride and Non-Fluoride Agents with the Caries Process. Adv Dent Res 8 (2): 158-165, July, 1994.

10. FEATHERSTONE, J.D.B. y col. Dependence of In vitro Demineralization of Apatite and Remineralization of Dental Enamel on Fluoride Concentration. J Dent Res. 69 (Spec Iss): 620-625, February, 1990.
11. CARDENAS DARIO, OD., M.S.c Fundamentos de odontología. Odontología Pediátrica. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín- Colombia, 1996.
12. INGRAM, G.S.; Nash, P.F.A Mechanism for the Anticaries Action of Fluoride. Caries Res. 14:298-303.1980.
13. NEWBURN, E. Topical Fluoride Therapy: Discussion of Same Aspect of Toxicology, Safety, and Efficacy. J Dent Res 66 (5) : 1084 - 1086, May, 1987.
14. WELFEL, J.S. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression Using Intra - oral Models. J Dent Res 69 (Spect Iss): 626 - 633, February, 1990.
15. SHELLIS, R.P; DUCKWORTH, R.M. Studies on the Cariostatic Mechanism of Fluoride. International Dental Journal, (1994) 44, 263 - 273.
16. EKSTRAND, J. Pharmaco Kinetic Aspects of Topical Fluoride. J Dent Res 66(5): 1061-1065, May, 1987.
17. TEN CATE, J.M. In Vitro Studies on the Effects on De-and Remineralization. J Dent Res. 69(Spec Iss): 614 - 619, February 1990.

18. BARREIRO, A; ALVAREZ, C. Remineralización Dentinaria. Rev- Actual-Estomato-Esp. 1984, May: 44(337).
19. STOOKEY, G.K. Critical Evaluation of the Composition and Use of Topical Fluorides. J Dent Res 69 (Spec Iss): 805-812, February, 1990.
20. RIPA, L.W. Dent Materials Related to Prevention Fluoride Incorporation Into Dental Materials: Reaction Paper. Adv Dent Res 5:56 - 59, December, 1991.
21. RAWLS, H.R. Preventive Dental Materials: Sustained Delivery of Fluoride and Other Therapeutic Agents. Adv Dent Res 5:50 - 55, December, 1991.
22. WEINSTEIN et al, Reult of a Promising Open Trial to Prevent Baby Bottle Tooth Decay: A fluoride Varnish Study. J of Dentistry for Children. Sept. Dec 1994
23. PETERSON LG.Fluoride Mouthrinses and Fluoride Varnishes. Caries Res.1991.27(suppl) 35-42
24. MCDONALDS,S.P; SHEIHAM, A. A Clinical Comparison of Non-Traumatic Methods of Treating Dental Caries. International Dental Journal (1994) 44, 465 - 470.
25. CRAIG, G.G. Y COL. Caries Progression in Primary Molars: 24 Months Results from a Minimal Treatment Programme. Oral Epidemiol. :9(6) 260-265. Diciembre 1981.
26. BRUDEVOLD, F. y col, A study of Zinc in Human Teeth. Arch Oral Biol. Vol 8, pp.135-144, 1963.

27. INGRAM, G.S: y Col. Interaction of Zinc with Dental Minerals. Caries Res. 1992; 26: 248-253.
28. MILLER, W.D. Y COL. Preventive Treatment of the Teeth, with Special Reference to Silver Nitrate. The Dental Cosmos. Vol XLVII. 64. August 1905.
29. HOWE, P:R: A Method of Sterilizing, and at the Same Time Impregnating with a Metal, affected Dentinal Tissue. The Dental Cosmos: 59 (9) Sept 1917.
30. PRIME, J.R. Controlling Dental Caries. J.A.D.A.& D. Cos. Vol 24. December 1937.
31. KLEIN, H. Y COL. Study of Dental Caries. J.A.D.A. Vol 29 (11). August 1, 1942.
32. MELLBERG, J.R. Evaluation of Topical Fluoride Preparation. J Dent res 69 (Spec Iss): 771 - 779, February, 1990.
33. HOSOYA Y, ARITOMI K, GOTO G. Pulpal response to diammine silver fluoride. (2). Application on exposed pulps. Shoni Shikagaku Zasshi 1990 28:2, 327-37.
34. KAMETA, FERNANDEZ. Acción del fluoruro de plata a moniacal en dientes anteriores de la primera dentición con lesiones cariosa. Revista Científica, Técnica y cultural. Organo oficial de la Facultad de Odontología Universidad Nacional Autonoma de Mexico. # 25 Vol. VII, Septiembre-Octubre 1979.
35. RODRIGUEZ DE PADILLA, Ludy. Complicaciones por uso Inadecuado de Fluoruro Amino Plata en Odontopediatría. Acta Odontologica, Octubre 1997. (La Paz-Bolivia).
36. BOLETÍN NAFAMIN. Argentina.

37. OGAARD, B. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression In vivo. J Dent Res 69 (Spec Iss): 813 - 819, February, 1990.
38. PROMEGA. Technical Bulletin. CytoTox 96 Non radioactive Cytotoxicity Assay. Promega Corporation 1997.
39. FRESHNEY. Ian. Culture of Animal Cells. Third Edition. Wisley-liss, 1995.
40. CRAIG. Robert, G. Restorative Dental Materials. Ninth Edition. Mosby 1993
41. SCHEDULE et al. Metal ion induced toxic histamine release from human basophils and mast cells. J Biomed Mater Res, 1998. mar 15 39:4,560-7
42. ELLENDER G, HAM KN, Connective tissue response to some heavy metals III. Silver and dietary supplements of ascorbic acid. Histology and Ultrastructure. Br. J Exp. Pathol 1989, feb 70:1,21-39
43. RUNGBY J. An Experimental Study on silver in the Nervous system and on aspects of its general cellular toxicity. Dan Med Bull 1990, Oct 37:5, 442-9
44. HELGELAND K, LEIRSKAR J. PH and the cytotoxicity of fluoride in on animal cell culture system. Scand. J. Dent. Res. 1976: 84: 37-45.
45. ZERGER. E, S MD, Witt KL Genetic Toxicity of Fluoride Environ Mol Mutagen 1993 21:4 309 - 18.

46. YU-CHAO CHANG et al. In vitro Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Medicines on Human Pulp Fobroblasts. J. Of De. Vol 24 # 9. Sep 1998.

47. BOLETÍN NAFAMIN. Argentina.

BIBLIOGRAFIA

BARREIRO, A; ALVAREZ, C. Remineralización Dentinaria. Rev- Actual-Estomato-Esp. 1984, May: 44(337).

BOLETÍN NAFAMIN. Argentina.

BOLETÍN LABORATORIO NAF. Argentina.

BRUDEVOLD, F. y col, A study of Zinc in Human Teeth. Arch Oral Biol. Vol 8, pp.135-144, 1963.

CATE TEN.Oral y Histology. 4ª edition. Moslay 1994.

CARDENAS DARIO, OD., M.S.c Fundamentos de odontología. Odontología Pediátrica. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín- Colombia, 1996.

CRAIG, G.G. Y COL. Caries Progression in Primary Molars: 24 Months Results from a Minimal Treatment Programme. Oral Epidemiol. :9(6) 260-265. Diciembre 1981.

CRAIG.Robert,G.Restorative Dental Materials.Ninth Edition. Mosby 1993

EKSTRAND, J. Pharmaco Kinetic Aspects of Topical Fluoride. J Dent Res 66(5): 1061-1065, May, 1987.

ELLENDER G, HAM KN, Connective tissue response to some heavy metals III. Silver and dietary supplements of ascorbic acid. Histology and Ultrastructure.Br. J Exp. Pathol 1989,feb 70:1,21-39

FEATHERSTONE, J.D.B. y col. Dependence of In vitro Demineralization of Apatite and Remineralization of Dental Enamel on Fluoride Concentration. J Dent Res. 69 (Spec Iss): 620-625, February, 1990.

FRESHNEY. Ian.Culture of Animal Cells. Third Edition. Wisley-liss,1995.

HELGELAND K, LEIRSKAR J. PH and the cytotoxicity of fluoride in on animal cell culture system. Scand. J. Dent. Res. 1976: 84: 37-45.

HOSOYA Y, ARITOMI K, GOTO G. Pulpal response to diammine silver fluoride. (2). Application on exposed pulps. Shoni Shikagaku Zasshi 1990 28:2, 327-37.

HOWE, P:R: A Method of Sterilizing, and at the Same Time Impregnating with a Metal, affected Dentinal Tissue. The Dental Cosmos: 59 (9) Sept 1917.

INGRAM, G.S: y Col. Interaction of Zinc with Dental Minerals. Caries Res. 1992; 26: 248-253.

INGRAM, G.S.; Edgar, W.M. Interactions of Fluoride and Non-Fluoride Agents with the Caries Process. Adv Dent Res 8 (2): 158-165, July, 1994.

INGRAM, G.S.; Nash, P.F.A Mechanism for the Anticaries Action of Fluoride. Caries Res. 14:298-303.1980.

KAMETA, FERNANDEZ. Acción del fluoruro de plata a moniacal en dientes anteriores de la primera dentición con lesiones cariosa. Revista Científica, Técnica y cultural.

Organo oficial de la Facultad de Odontología Universidad Nacional Autonoma de Mexico. # 25 Vol. VII, Septiembre-Octubre 1979.

KLEIN, H. Y COL. Study of Dental Caries. J.A.D.A. Vol 29 (11). August 1, 1942.

MARTHALER, T.M. Cariostatic Efficacy of the Combined Use of Fluorides. Dent Res 69 (Spec Iss): 797-800, February, 1990.

WHITFORD, G.M. Y COL. Topical Fluoride: Effects on physiologic and biochemical process. J Dent Res 66 (5): 1072-1078, May, 1987.

MARSHALL, JR. Dentina Micro estructura y aracterización. Quinttessence Internacional, #9, 1993.

MC DONALDS,S.P; SHEIHAM, A. A Clinical Comparison of Non-Traumatic Methods of Treating Dental Caries. International Dental Journal (1994) 44, 465 - 470.

MELLBERG, J.R. Evaluation of Topical Fluoride Preparation. J Dent res 69 (Spec Iss): 771 - 779, February, 1990.

MILLER, W.D. Y COL. Preventive Treatment of the Theeth, with Special Reference to Silver Nitrate. The Dental Cosmos. Vol XLVII. 64. August 1905.

NEWBURN. Cariology. Quintessence books. 1989. Third Edition. 1989.

NEWBURN, E. Topical Fluoride Therapy: Discussion of Same Aspect of Toxicology, Safety, and Efficacy. J Dent Res 66 (5) : 1084 - 1086, May, 1987.

OGAARD, B. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression In vivo. J Dent Res 69 (Spec Iss): 813 - 819, February, 1990.

PASHLEY. Correlaciones Clínicas de Estructura y Función Dentinales. Journal of Prosthetic dentistry, 1991.

PETERSON LG. Fluoride Mouthrinses and Fluoride Varnishes. Caries Res. 1991. 27(suppl) 35-42

PRIME, J.R. Controlling Dental Caries. J.A.D.A. & D. Cos. Vol 24. December 1937.

PROMEGA. Technical Bulletin. CytoTox 96 Non radioactive Cytotoxicity Assay. Promega Corporation 1997.

RAWLS, H.R. Preventive Dental Materials: Sustained Delivery of Fluoride and Other Therapeutic Agents. Adv Dent Res 5:50 - 55, December, 1991.

RIPA, L.W. Dent Materials Related to Prevention Fluoride Incorporation Into Dental Materials: Reaction Paper. Adv Dent Res 5:56 - 59, December, 1991.

RIPA, L.W. Topical Fluoride: A Discussion os Risks and Benefits. J Dent Res 66 (5):1079 - 1083, May, 1987.

RODRIGUEZ DE PADILLA, Ludy. Complicaciones por uso Inadecuado de Fluoruro Amino Plata en Odontopediatría. Acta Odontologica, Octubre 1997. (La Paz-Bolivia).

RUNGBY J. An Experimental Study on silver in the Nervous system and on aspects of its general cellular toxicity. Dan Med Bull 1990, Oct 37:5, 442-9

SELTZER. The Dental Pulp. 3th edition 1993.

SCHEDULE et al. Metal ion induced toxic histamine release from human basophils and mast cells. J Biomed Mater Res, 1998. mar 15 39:4, 560-7

SHAFFER, B.M. LEVY. Tratado de Patología Bucal. Nueva Editorial. Interamericana. Mexico. 1987.

SHELLIS, R.P; DUCKWORTH, R.M. Studies on the Cariostatic Mechanism of Fluoride. International Dental Journal, (1994) 44, 263 - 273.

SILVERSTONE. Caries Dental: Etiología, Patología y Prevención. Editorial El Manual Moderno, S.A. Mexico 1985

STOOKEY, G.K. Critical Evaluation of the Composition and Use of Topical Fluorides. J Dent Res 69 (Spec Iss): 805-812, February, 1990.

TEN CATE, J.M. In Vitro Studies on the Effects on De-and Remineralization. J Dent Res. 69(Spec Iss): 614 - 619, February 1990.

THYLSTRUP ANDRES. FEJERSKOV OLE. Textbook of Clinical Cariology. Munksgaard. Second Edition. 1994.

WEINSTEIN et al, Reult of a Promising Open Trial to Prevent Baby Bottle Tooth Decay: A fluoride Varnish Study. J of Dentistry for Children. Sept. Dec 1994

WELFEL, J.S. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression Using Intra - oral Models. J Dent Res 69 (Spect Iss): 626 - 633, February, 1990.

YU-CHAO CHANG et al. In vitro Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Medicines on Human Pulp Fobroblasts. J. Of De. Vol 24 # 9. Sep 1998.

ZERGER. E, S MD, Witt KL Genetic Toxicity of Fluoride Environ Mol Mutagen 1993 21:4 309 - 18.