

## VITALCEM: un cemento dental regenerador con base en el cemento PORTLAND de construcción

*VITALCEM: a regenerative dental cement based on construction portland cement*

Figueroa-A.<sup>1</sup>  
Obando-G.<sup>1</sup>

### Resumen

El Agregado trióxido agregado (MTA) es un cemento dental que tiene como base el cemento portland de construcción. Posee buenas propiedades estructurales y regeneradoras. El objetivo de este estudio fue comprobar si el cemento Yura Portland posee las mismas características estructurales, químicas y regeneradoras que el MTA.

**Palabras clave:** biofilm, *Enterococcus faecalis*, cemento dental.

### Abstract

The mineral trioxide aggregate is a dental cement which is based on portland cement for construction. It has good structural and regenerative properties. The aim of this study was to test if the Yura Portland cement has the same structural characteristics, chemical and regenerating the MTA.

**Key words:** biofilm, *Enterococcus faecalis*, dental cement.

### Introducción

El Agregado Trióxido Mineral (MTA) fue descrito por primera vez en la literatura científica

dental por Lee et al (1993)<sup>1</sup>, sin embargo fue aplicado y patentado en 1995 por Torabinejad & White (1995, 1998)<sup>2,3</sup>. Posee la aprobación de la Administración Federal de Drogas (Federal Drug Administration) de los Estados Unidos de Norte América y está disponible como MTA ProRoot (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA). Sin embargo, existen otros tipos de MTA fabricados por otras casas comerciales, como es el MTA-Angelus (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil)<sup>4</sup>. El MTA, es un material que ha demostrado que ser superior a otros materiales en términos de habilidad de sellado, biocompatibilidad y capacidad de regeneración del ligamento periodontal<sup>5,6</sup>. El MTA Pro-Root posee diversos componentes como SiO<sub>2</sub>, CaO, MgO, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaSO<sub>4</sub><sup>7</sup>. El principal componente químico es el cemento Portland, el cual es una mezcla de silicato dicálcico, silicato tricálcico, gypsum y aluminoferrito tetracálcico<sup>7</sup>. El proceso de la reacción de hidratación del silicato tricálcico y del silicato dicálcico, permiten que este biomaterial alcance tres horas después de la mezcla un pH 12,5; atribuyendo así una mayor resistencia a la compresión<sup>8</sup>.

También posee excelentes propiedades antimicrobianas, de radiopacidad, de estabilidad di-

<sup>1</sup> Docentes Facultad de Odontología, Universidad Católica Santa María, Arequipa, Perú.

mensional y de tolerancia a la humedad<sup>7,8</sup>. Clínicamente, el MTA está siendo utilizado en procedimientos dentales, por ejemplo para tratamientos de la pulpa vital<sup>9-11</sup>, apexificaciones<sup>12,13</sup>, reparación de perforación del canal radicular<sup>14,15</sup>, retro-obturaciones<sup>2</sup>, blanqueamiento interno<sup>16</sup> y reparación de defectos de reabsorción<sup>17,18</sup>.

Las lesiones periradiculares son caracterizadas por la inflamación de tejidos conectivos, la cual es acompañada por la reabsorción ósea cerca del área afectada por la lesión adyacente al ápice del diente. Diferentes tipos de células han sido observadas y descritas en estas lesiones, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, principalmente<sup>19,20</sup>. Estas células juegan un rol importante en la patogénesis de la inflamación y principalmente generan la transcripción y liberación de citosinas pro-inflamatorias. Los macrófagos son por excelencia las primeras células en llegar a la lesión y tomar contacto con cuerpos extraños, direccionando así la inflamación, mediante la liberación de citosinas que promoverán la iniciación, perpetuación y dirección de la respuesta inmune<sup>10</sup>.

La inflamación de lesiones endodónticas es caracterizada por la presencia de citosinas inflamatorias del tipo factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-6 y otros mediadores inflamatorios. Las citosinas IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  son responsables mayormente de la reabsorción ósea activa en lesiones periapicales en humanos. Similarmente, cantidades de IL-6 se han encontrado en dichas lesiones<sup>21-25</sup>. Otros modulares óseos relacionados con la reabsorción ósea están presentes en dichas lesiones: RANKL y RANK, responsables de la activación, supervivencia de los osteoclastos. La molécula OPG, encargada de inhibir la activación de los osteoclastos, se encuentra en cantidades imperceptibles<sup>26-29</sup>.

Debido a que el MTA tiene resultados prometedores en las terapias endodónticas, y es muy utilizado en la clínica dental, el objetivo del este estudio fue comparar el MTA comercial y el cemento portland Yura, tanto químicamente como biológicamente.

## Material y métodos

### Análisis de la composición química por difracción de rayos X y microestructura

Se usaron cemento MTA-Angelus gris (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil) y cemento portland Yura S.A. (Yura S.A. Arequipa, Perú). En un disco de resina de 25,4 mm de diámetro con 6 pozos de 3mm de profundidad y 1 mm de diámetro fueron colocadas las muestras de cemento MTA Angelus y cemento portland Yura S.A. en triplicado, posteriormente fueron inmersas en solución salina normal (NaCl 0,9%) y almacenadas en una incubadora a 37°C por 48 horas<sup>30</sup>. Transcurrido el tiempo de la incubación, las muestras fueron pulidas usando una pasta de diamante (1  $\mu$ m), seguidas de un baño en carbón (metalizador Denton Vacuum). Para analizar la microestructura y la composición química de las partículas de ambos cementos de estudio, se utilizó el microscopio electrónico de barrido 1000x (JEOL JSM5600pv JEOL, Japón) equipado con un sistema NORAN X-ray detector m/n 620F-1SPS para el análisis de difracción de rayos X<sup>30</sup>.

### Preparación de los cementos para cultura celular

Los cementos de estudio fueron preparados siguiendo las indicaciones del fabricante. Los cementos fueron mezclados en cámara de bioseguridad bajo condiciones de asepsia y colocados en el fondo de pozos de cultura celular (placas



de cultura de 24 pozos, Nunclon, NUNC), formando un área uniforme. Los especímenes fueron incubados por 24 horas a 37°C a 100% de humedad. Después de las 24 horas, 1 mL de medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino y gentamicina (50 ug/mL) fue depositado en cada pozo. El material fue incubado a 37°C a 100% de humedad y los sobrenadantes fueron colectados después de las 24 horas y filtrados por filtro Millipore de 0.2 um, y alicuotados en tubos de 1,5 mL y almacenados a -20°C hasta su posterior uso 6,31.

#### Obtención de macrófagos peritoneales y cultura celular

Macrófagos peritoneales murinos fueron colectados de ratones C57Bl/6 wild type de 7 semanas de edad. Se inyectó 1 mL de solución de tioglicolato al 3%. Después de 4 días, los ratones fueron sacrificados por asfixia usando CO<sub>2</sub> y fueron sumergidos en etanol 70%. Seguidamente, el peritoneo fue expuesto y fue inyectado 5 mL de RPMI suplementado. Se realizó un pequeño masaje peritoneal y fue colectado 4 mL de contenido peritoneal y colocado en tubo falcón de 15 mL. La concentración final de células fue calculada para 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. 1 mL de células fue colocado en placas de cultura celular de 24 pozos e incubado a 37°C con ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95% por 2 horas para provocar la adherencia de los macrófagos a la placa. Seguidamente se realizó un lavado para retirar células no adheridas. Los macrófagos adheridos fueron incubados con los sobrenadantes de cementsos experimentales y control negativo (medio RPMI sin tratamiento) y el positivo (RPMI con 1 ng/mL de LPS) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad de 95% por 24 horas<sup>6,31</sup>. Después de las 24 de estimulación con los cementsos y controles, los macrófagos fueron

procesados con trizol para la extracción total de RNA. El RNA fue obtenido y colectado en tubos de 0.20 mL y almacenados a -70°C hasta su posterior uso. Para la transcripción reversa se utilizó el kit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión fue leída por medio de PCR en tiempo Real.

#### Análisis de los datos

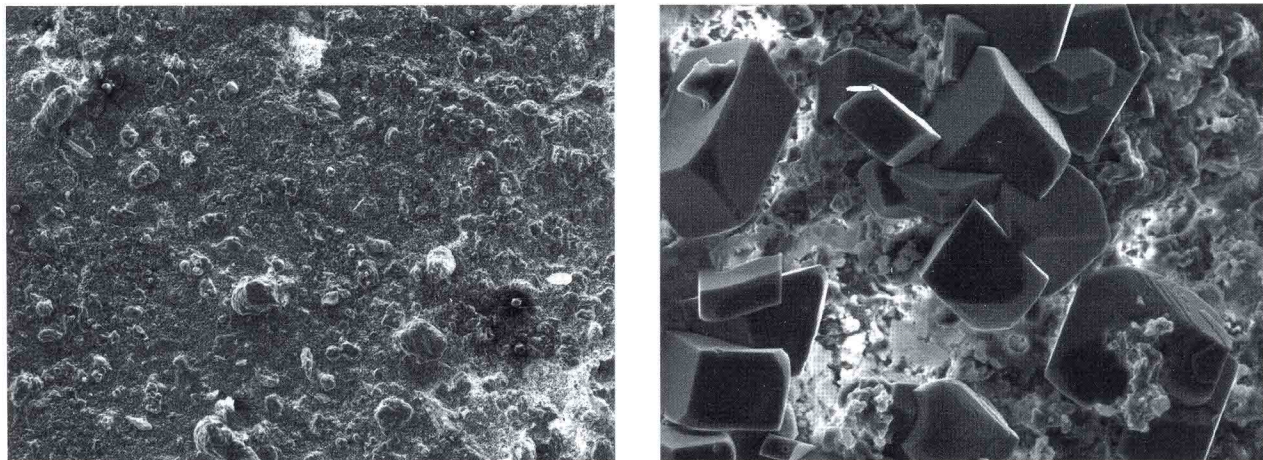
Para la expresión de RNA total, fue calculado por el método de Threshold de acuerdo con el boletín de la Applied Biosystem. Las medias de valores Ct fueron calculadas usando la expresión de los genes blanco normalizadas con el control interno (b-actina) usando la fórmula  $\Delta Ct$ . La estadística fue realizada empleando la prueba de ANOVA – Tukey. La probabilidad para considerar significativa fue de  $p < 0.05$ .

## Resultados

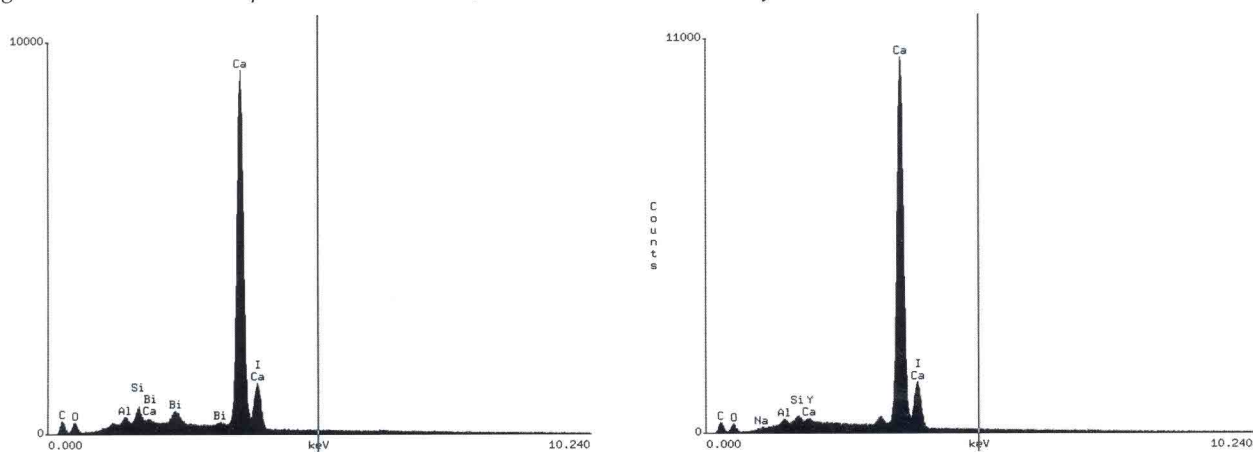
#### Composición química y estructura

El microscopio electrónico de barradura mostró que el MTA-Angelus posee partículas cristalinas con tamaño aproximado de 10 micrómetros sobre una capa de material amorfo. Así mismo el cemento portland Yura con yodoformo, posee partículas cristalinas de un tamaño aproximado de 80 micrómetros sobre una capa de material amorfo (**figura 1**).

Al análisis por difracción de rayos X se observa que los elementos carbono, oxígeno, aluminio, sílice, calcio, yodo y bismuto son componentes comunes del MTA-Angelus y del cemento portland Yura a excepción del bismuto (**figura 2**).



**Fig. 1.** Imagen electrónica del cemento MTA-Angelus y del cemento portland Yura S.A. (1A) el cemento MTA-Angelus posee partículas finas de un tamaño de  $10 \pm 2 \mu\text{m}$ . (1B) el cemento portland Yura S.A. posee partículas cristalinas más grandes de un tamaño aproximado de  $80 \pm 2 \mu\text{m}$ , sobre un material amorfo visible. 1000X.



**Fig. 2.** Energía dispersiva por espectros mediante difracción de rayos X. (2A) el MTA-Angelus posee elementos como calcio, aluminio, carbono, oxígeno, zinc y bismuto. (2B) cemento portland Yura S.A. posee elementos como calcio, aluminio, carbono, oxígeno, zinc. Otros elementos han sido encontrados en baja proporción, comunes en los dos cementos.

Expresión génica de citosinas pro-inflamatorias.

La expresión de mRNA para TNF-a en presencia del MTA-Angelus y los cementos portland (**figura 3a**) no mostraron diferencias estadísticas, sin embargo el control positivo mostró una gran expresión de esta citosina. La expresión de IL-1b tuvo similares títulos para el MTA-Angelus y los cementos portland (**figura 3b**). El control positivo mostró alta expresión de esta citosina. Para la IL-6, no se observó diferencias estadísticas en la expresión para lo cementos MTA-Angelus y

cementos portland, sin embargo sí hubo gran expresión para el control positivo.

**Discusión**

Este estudio corroboró otros estudios que mostraron que el MTA-Angelus posee elementos principales como calcio, sílice y bismuto, sin embargo, no se repostó la presencia de fósforo como elemento fundamental. Así mismo podemos verificar, junto con otros estudios de que



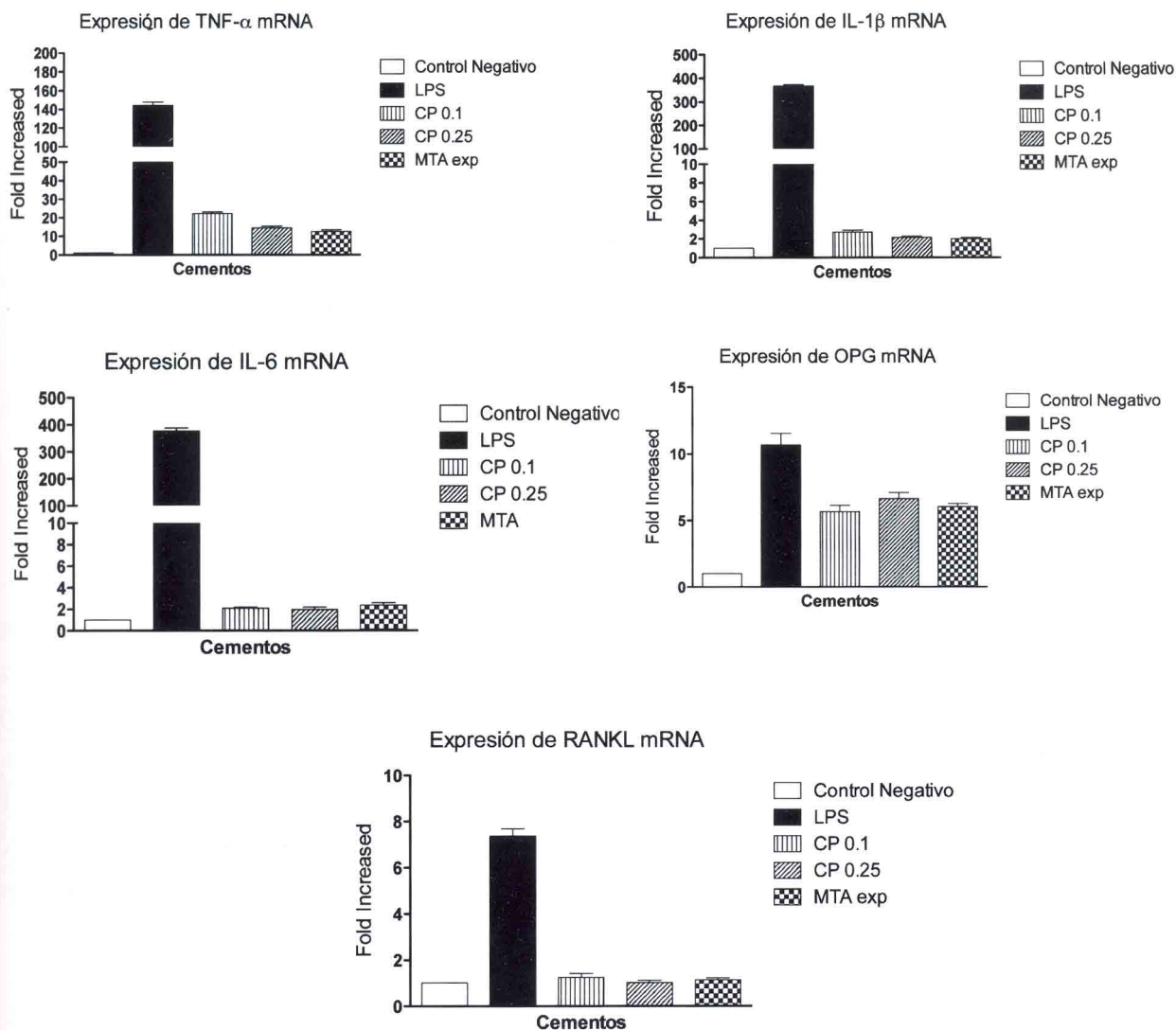


Fig. 3. Expresión génica de citosinas inflamatorias y moduladores óseos: la expresión de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), RANKL (D), fue menor comparada con el control positivo y esta no tuvo acción biológica. La expresión de OPG (E), fue superior al control negativo.

hay similitud entre estos cementos, siendo que la única excepción es la presencia de bismuto en el MTA y no en el portland<sup>4,7</sup>. Los resultados del presente estudio demuestran que el tamaño de la partículas de cristales del cemento MTA-Angelus son menores que las del cemento portland, y que su composición química, su estructura microscópica y macroscópica son similares, exceptuando el bismuto.

Los cementos fueron expuestos a macrófagos con el objetivo de medir expresiones de citosinas

y modulares óseos. Esta célula es muy importante debido a que juega un rol importante tanto en la injuria tecidual y la infección, promoviendo la inflamación, reclutamiento de células a los sitios infectados. Nuestros datos revelan que los niveles de TNF- $\alpha$  para los cementos son elevados en comparación del control negativo. De acuerdo con Silva los niveles de TNF- $\alpha$  son elevados en los periodos tardíos de la respuesta inflamatoria<sup>32</sup>. Similar cinética fue observada por Rezende que describió que hubo títulos elevados de TNF- $\alpha$  al incubar MTA en fibroblastos por 24 horas<sup>33</sup>.

Nuestros datos demostraron que la expresión de esta citosina IL-1B es similar para los cementos y el control negativo, indicando que esta citosina no alcanza un umbral necesario para provocar una función biológica. Algunos estudios describe que el MTA produce un incremento en los niveles de IL-1B cuando es comparado con otros materiales endodónticos en cultura de fibroblastos<sup>34</sup>. Sin embargo, los niveles mostrados para esta citosina, pueden sugerir una función de reparo inducida por los macrófagos para limpiar el sitio de la injuria. Nuestros datos mostraron que la expresión para esta citosina fue similar con respecto al control negativo<sup>21</sup>. De acuerdo con Gomez-Filho y Silva nuestros resultados sugieren que la respuesta biológica del MTA promueve un rol importante en el control de la inflamación promoviendo el proceso de reparo<sup>32,35</sup>.

La tríade RANK/RANKL/OPG tiene un papel importante en la maduración y activación de osteoblastos durante la inflamación y otros procesos patológicos<sup>26</sup>. Nuestro estudio ha mostrado

que la expresión de RANKL para los cementos experimentales bajos títulos similares al control negativo. Por otro lado, la expresión de OPG mostró altos niveles en comparación al control negativo. Coon y colaboradores mostraron que la expresión de RANKL era disminuida al MTA sugiriendo que este no estimula una formación ni activación osteoclástica<sup>27</sup>. Nuestros datos corroboran este hallado y además proponen que los cementos experimentales poseen una buena capacidad de regeneración ósea.

## Conclusiones

Los cementos MTA-Angelus, portland con 10% de yodoformo, portland con 20% de yodoformo no promueven la expresión de citosinas proinflamatorias sugiriendo una buena capacidad antiinflamatoria. Así mismo, no promueven la expresión de RANKL, sino, la expresión de OPG indicando una regulación positiva en la regeneración ósea.

## Referencias

1. Lee, S. J., et al., Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of endodontics* (1993) 19 (11), 541
2. Torabinejad, M., et al., Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *Journal of endodontics* (1995) 21 (12), 603
3. Torabinejad, M., et al., Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *Journal of endodontics* (1997) 23 (4), 225
4. Santos, A. D., et al., Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J* (2005) 38 (7), 443
5. Main, C., et al., Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *Journal of endodontics* (2004) 30 (2), 80
6. Noetzel, J., et al., Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clinical oral investigations* (2006) 10 (1), 77
7. Camilleri, J., et al., The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* (2005) 21 (4), 297
8. Dammaschke, T., et al., Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater* (2005) 21 (8), 731
9. Caicedo, R., et al., Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Australian dental journal* (2006) 51 (4), 297



10. Nair, P. N., et al., Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J* (2007),
11. Tuna, D., and Olmez, A., Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. *Int Endod J* (2007),
12. El-Meligy, O. A., and Avery, D. R., Comparison of apexification with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *Pediatric dentistry* (2006) 28 (3), 248
13. Simon, S., et al., The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* (2007) 40 (3), 186
14. Ford, T. R., et al., Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *Journal of the American Dental Association* (1939) (1996) 127 (10), 1491
15. Nakata, T. T., et al., Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *Journal of endodontics* (1998) 24 (3), 184
16. Tselnik, M., et al., Bacterial leakage with mineral trioxide aggregate or a resin-modified glass ionomer used as a coronal barrier. *Journal of endodontics* (2004) 30 (11), 782
17. Hardy, I., et al., Sealing ability of One-Up Bond and MTA with and without a secondary seal as furcation perforation repair materials. *Journal of endodontics* (2004) 30 (9), 658
18. Lynn, E. A., and Einbender, S., The use of mineral trioxide aggregate to create an apical stop in previously traumatized adult tooth with blunderbuss canal. Case report. *The New York state dental journal* (2003) 69 (2), 30
19. Stashenko, P., et al., Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* (1998) 9 (4), 498
20. Torabinejad, M., et al., Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of endodontics* (1995) 21 (10), 489
21. Helle, M., et al., Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol* (1988) 18 (6), 957
22. Hu, N., et al., Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of SPARC, FADD, Fascin, COL7A1, CK4, TGM3, ECM1, PPL and EVPL in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* (2006) 6 (33), 9
23. Koh, E. T., et al., Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of endodontics* (1998) 24 (8), 543
24. Lin, S. K., et al., Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* (2002) 110 (3), 246
25. Maruyama, K., et al., Receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J Immunol* (2006) 177 (6), 3799
26. Boyce, B. F., and Xing, L., Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* (2008) 473 (2), 139
27. Coon, D., et al., The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *Journal of endodontics* (2007) 33 (4), 432
28. Mitchell, P. J., et al., Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* (1999) 20 (2), 167
29. Roodman, G. D., Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* (1996) 17 (4), 308
30. Asgary, S., et al., A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging. *Journal of materials science* (2006) 17 (2), 187
31. Pfeffer, K., Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) 14 (3-4), 185
32. Silva, M. J., et al., The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2008) 105 (5), e70
33. Rezende, T. M., et al., Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J* (2005) 38 (12), 896
34. Stashenko, P., et al., Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* (1987) 138 (5), 1464