

COLEGIO ODONTOLÓGICO

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE INTERLEUQUINA 4 (IL-4) E INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ) EN PULPAS DENTALES DESPUÉS DE UTILIZAR IONÓMERO DE VIDRIO COMO BASE INTERMEDIA

Carreño H., Puerto L., Rivera A., Rojas O. V.*
Chamorro V.**
Hurtado, C.***
López, C.****

Modalidad Oral
Categoría Postgrado

RESUMEN

Contexto: El ionómero de vidrio es utilizado rutinariamente en la práctica clínica como base intermedia. El conocimiento claro de la respuesta biológica pulpar a éste material es útil para prevenir injurias al complejo pulpo-dentinal. **Objetivo:** Determinar la presencia de citoquinas proinflamatorias, IL-4 e IFN- γ , en pulpas dentales humanas expuestas al tratamiento con ionómero de vidrio como base intermedia. **Materiales y métodos:** Ensayo clínico, controlado, aleatorizado, ciego, paralelo en 22 dientes de 11 pacientes, entre 14 y 25 años, distribuidos en grupo experimental y control. Criterios de inclusión: dientes premolares sanos, con ápices cerrados, para exodoncia con fines ortodónticos con exclusión de pacientes sistémicamente comprometidos. Se evaluaron valores de liberación de IL-4 e IFN- γ , a la exposición durante el tratamiento con ionómero de vidrio, observando la presencia de las interleuquinas mediante citometría de flujo con isotipos específicos marcados con fluorocromo. **Resultados:** En las 22 pulpas, se observó un promedio de liberación de IL-4 en el grupo experimental (51.1 \pm 38), en los controles (43.6 \pm 28); el IFN- γ en el grupo experimental (51.1 \pm 32) y en los controles (44.8 \pm 39), la aplicación de ionómero de vidrio como base intermedia no incrementó la presencia de citoquinas, y hubo una correlación en IL-4 entre casos y controles ($r=0.80$) e IFN- γ entre casos y controles ($r=0.90$). **Conclusiones:** se observó en las 22 pulpas estudiadas que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, la liberación de IL-4 e IFN- γ y no aumento al aplicar el ionómero de vidrio como base intermedia.

Palabras claves: pulpa dental, Interleuquina-4, interferón gamma, inflamación, ionomero de vidrio, citotoxicidad

ABSTRACT

Objectives: To determine proinflammatory cytokines release IL-4 and INF- γ in human dental pulps exposed to the treatment with glass ionomer as a liner. **Materials and methods:** Randomized controlled blind clinical trial in 22 extracted teeth of 11 patients from the Graduate Orthodontics and Orthopedics Clinic. **Inclusion criteria:** subjects aged between 14 and 25 years, with healthy premolar teeth, closed apices, which needed extractions for orthodontic purposes. Systemically compromised patients were excluded. The variables were interleukin release values, exposure to treatment with glass ionomer, Teeth were randomly assigned to experimental and control groups, 11 for each group. The presence of interleukin was observed by means of flow cytometry with fluorochrome marked specific isotypes. **Results:** In the 22 pulps average IL-4 liberation was observed in the experimental group (51.1 \pm 38), and in controls (43.6 \pm 28.). INF- γ in the experimental group (51.1 \pm 32) and in controls (44.8 \pm 39). The application of glass ionomer as a liner didn't increase the presence of cytokines. There was a correlation in IL-4 and INF- γ between the case and the control ($r=0.80$) and ($r=0.90$) respectively. **Conclusions:** In the present study there were no significant statistically differences between the groups. The IL-4 and IFN- γ release did not increase by the glass ionomer application as an intermediate base.

Key words: dental pulp, IL-4, INF- γ , Inflammation, glass ionomer, citotoxicity

*Investigadores residentes de Endodoncia de la Institución Universitaria Colegios de Colombia

**Director científico, director del postgrado de Endodoncia, docente

***Asesora metodológica y docente de investigación.

****Asesor estadístico y docente de investigación.

INTRODUCCION

La pulpa dental es un tejido único que presenta células altamente especializadas que incluyen odontoblastos, fibroblastos, células presentadoras de antígenos, fibras de tejido conectivo y células del sistema inmune¹⁰. La pulpa contiene todos los componentes para producir una respuesta de defensa a diferentes estímulos, incluyendo la inflamación pulpar²⁴. La respuesta se caracteriza por la acumulación de células como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, las cuales liberan sustancias mediadoras que inducen una respuesta inflamatoria aguda en el diente¹⁷.

La elaboración de una cavidad como objetivo terapéutico durante un procedimiento restaurativo produce un aumento no controlado de la temperatura, y el estímulo mecánico produce una respuesta pulpar inflamatoria con un desplazamiento de los núcleos odontoblásticos hacia los túbulos dentinales como resultado del aumento en la presión pulpar y lesión en la membrana celular. En cavidades profundas se puede llegar a lesionar directamente las prolongaciones odontoblasticas¹⁸.

La lesión pulpar se vuelve más grave a medida que la preparación se profundiza debido a que el corte de las prolongaciones odontoblásticas es capaz de causar daño a los odontoblastos. Se ha demostrado en estudios histológicos que un espesor de dentina remanente mayor a 2mm no produce ninguna o muy poca respuesta pulpar²³.

Una reducción de tejido, cerca de la unión dentina-esmalte, tiene como respuesta probable una leve irritación, sin influencia clínica⁴.

About y col. realizando un análisis morfométrico de odontoblastos humanos, encontró que el número total de estas células en la pulpa disminuye a medida que se reduce el grosor de la dentina remanente luego de preparaciones cavitarias clase V². El promedio en el número de odontoblastos en una cavidad con dentina remanente menor a 0.25 mm es 23% menos que con un grosor de dentina entre 0.25 y 0.5 mm, observándose leve actividad inflamatoria. Otros estudios han reportado que en

cavidades con un remanente dentinal de 0.5 mm no se presenta ninguna alteración en el número de odontoblastos¹⁸.

Al realizar una cavidad se produce una reacción mecánica cortando los túbulos dentinarios originando cambios en el protoplasma lesionado, que a su vez causa la salida del líquido, lo que puede llegar a producir una respuesta inflamatoria pulpar²¹.

Las citoquinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica, sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias¹, son derivadas de las células T y se producen en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños, la IL4 desempeña una función importante en las reacciones inflamatorias mediadas por IgE y eosinófilos puesto que estimulan moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) sobre las células endoteliales produciendo un aumento de IL4 induciendo a una reacción inflamatoria. El IFN- γ promueve las reacciones inflamatorias ricas en Th1 (Helper 1) y macrófagos, a la vez que suprimen las reacciones ricas en Th2 (Helper 2) y eosinófilos¹.

La biocompatibilidad de los materiales dentales para procedimientos restaurativos es de gran importancia, pero la inconsistencia de muchos estudios en lo concerniente a biocompatibilidad, ha sido materia de debate en cuanto al material de elección. En un estudio de cultivo celular con referencia a la capacidad citotóxica de los cementos de Ionómero y otros agentes restaurativos, Hume demostró la presencia de citotoxicidad, la cual se vio reducida después de 6 semanas¹¹.

Investigaciones presentadas acerca del Ionómero de vidrio refieren estar indicados en tratamientos restaurativos para preservar la estructura dental y como protectores pulpares^{9,25}.

El cemento de Ionómero de vidrio tiene óptimas características como actividad mecánica, biocompatibilidad, liberación de flúor, contracción volumétrica y un componente de expansión térmica similar a la del diente.^{9,25} La actividad inflamatoria de la pulpa dental y la respuesta a la colocación

de cementos como ionómero de vidrio dependerá de la preparación cavitaria y de las variables en la restauración realizada en presencia o ausencia de bacterias¹⁹.

El objetivo de esta investigación, es determinar la presencia de IL-4 e IFN- γ en pulpas dentales humanas luego de la utilización del ionómero de vidrio como base intermedia.

MATERIALES Y METODOS

Ensayo clínico controlado aleatorizado ciego. Se seleccionaron 22 dientes de 11 pacientes con un rango de edad entre 14 y 25 años del postgrado de Ortodoncia y Ortopedia del Colegio Odontológico Colombiano. Se incluyeron dientes premolares sanos, con ápice cerrado, extraídos con fines ortodónticos. Se excluyeron pacientes sistémicamente comprometidos. Se distribuyeron aleatoriamente en grupo control y experimental (11 dientes para cada grupo). Dentro de las variables del estudio se observaron los valores de liberación de citoquinas IL-4 e IFN- γ al utilizar ionómero de vidrio como base intermedia.

Previa extracción de los dientes se obtuvo consentimiento informado de los pacientes. El estudio experimental fue aprobado por el comité de ética institucional y de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia fue clasificada sin riesgo.

La prueba piloto se realizó en el primer paciente, tomada la muestra se llevó al laboratorio donde quedó programado el citómetro de flujo para la prueba experimental.

Preparación de la muestra

Inicialmente se tomó una radiografía periapical para determinar que no existiera ninguna patosis apical y presencia de caries, se utilizó anestesia sin vasoconstrictor pricanest 3% felipresina a nivel del nervio mentonero y alveolar medio derecho e izquierdo; se realizó aislamiento del campo

operatorio y se procedió a realizar una cavidad clase V con una fresa No.2 utilizando una pieza de mano de alta velocidad de triple irrigación (Kavo), con dimensiones de 2mm de profundidad y 3mm de ancho verificada con una sonda periodontal en ambos grupos, se colocó ionómero de Vidrio tipo IV (Voco) en la cavidad del diente experimental, se esperó 10 minutos y posteriormente se realizó la exodoncia. En el diente control se realizó el mismo procedimiento sin ionómero de vidrio.

Procesamiento de la muestra

Obtenida la muestra se secciona el diente siguiendo el eje axial con fresa zecrya, el tejido pulpar expuesto se retira con cucharilla de black No. 5 y se coloca en el medio de transporte TransFix. Posteriormente se realizó la disgregación de la pulpa con mango de bisturí y hoja No. 15 en caja de petri, recolectando la muestra disgregada a 1 ml y transfiriéndola al medicon (Consul TS, Orbassano, Italy), para continuar la disgregación mecánicamente en el Medimachine (Consul TS, Orbassano, Italy) en 2 ciclos cada uno de 1 min.

Se recolectaron las células ya disgregadas por centrifugación, se re-suspendieron en 300 μ l de solución fijadora (eBioscience); este volumen fue alicuetado en 3 tubos de polipropileno 12x75 (100 μ l por tubo), de la siguiente manera; tubo 1: células sin marcar; tubo 2: control isotipo; tubo 3: Anti FITC IL-4 y Anti PE INF-g. Se incubaron los tubos en esta solución por 20 min. a temperatura ambiente, posteriormente a los tubos 2 y 3 se les retiró el sobrenadante y se les adicionó solución de permeabilización (1:10, eBioscience), durante 5 min. Incubándolos a temperatura ambiente. Se recolectaron por centrifugación y se adicionó nuevamente a cada tubo 100 μ l de la misma solución y se procedió a marcar con los fluorocromos; al tubo 2 se le adicionó 3 μ l de los isotipos control IgG-FITC e IgG PE, mientras que al tubo 3 se le agregó 3 μ l de Anti FITC IL-4 y 2 μ l de Anti PE INF-g. Igualmente a los tres tubos se les adicionó 7AAD para determinar la viabilidad celular de la muestra, estos

tubos se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en cuarto oscuro; se realizo la lectura en el Citómetro de flujo (CyAN ADP 2 laser, 7 colores – Dako technologies) de los 3 tubos por diente (con ionómero y sin ionómero).

Análisis Estadístico

Los datos fueron tabulados en Excel versión 2007, se procesaron en SPSS versión 13. El análisis estadístico se realizo mediante prueba T- Student para datos pareados. $P \leq 0.005$ y con coeficiente de correlación y concordancia.

RESULTADOS

Luego de analizar los resultados obtenidos por el citómetro de flujo se observo una variabilidad positiva o negativa en los grupos de estudio, presentando una tendencia a disminuir del grupo experimental de IL-4 de -7.4 con un intervalo de confianza IC= 95% (-22.1 a 7.2). En las figura 1a y 1b se observo que al comparar los promedios de liberación de IL-4 entre casos (51.1±38) y controles (43.6±28) no hay diferencia estadísticamente significativa ($p=NS$), con una correlación de $r=0.80$ y un CCC=0.002

La variabilidad positiva y negativa en el grupo de IFN- γ presento una tendencia a disminuir del grupo experimental de -6.2 con un intervalo de confianza IC= 95% (-19.5 a 6.9). En la figura 2a y 2b se observo que al comparar los promedios de liberación de IFN- γ entre casos (51.1±32) y controles (44.8±39) no hay diferencia estadísticamente significativa ($p=NS$). con una correlación de 0.90 y un CCC= 0.008.

No existe un aumento en la expresión de citoquinas en el tejido pulpar de dientes utilizando el ionómero de vidrio como base intermedia. La IL-4 presenta menos variación y dispersión en los valores obtenidos en los resultados.

No existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de casos y controles en la liberación de citoquinas IL-4 e

IFN- γ . El ionómero de vidrio puede ser utilizado como base intermedia por sus bajos niveles de citotoxicidad demostrados en este estudio.

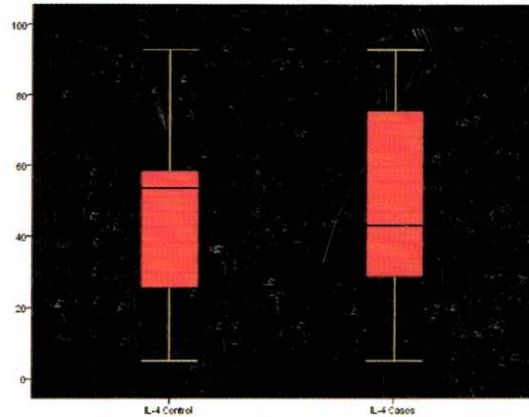


Figura 1a. Valores promedio Interleuquina 4 en casos y controles

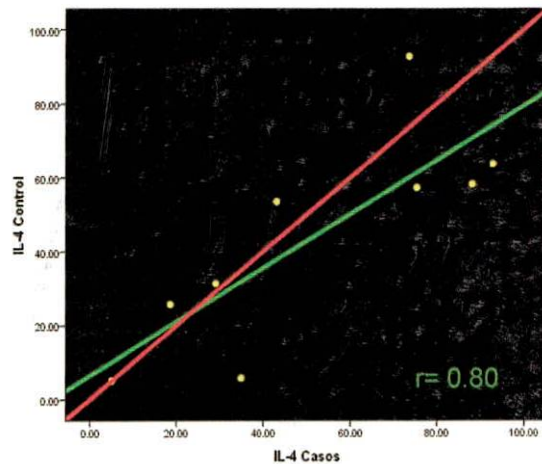


Figura 1b. Correlación de muestras relacionadas entre IL-4 casos y controles

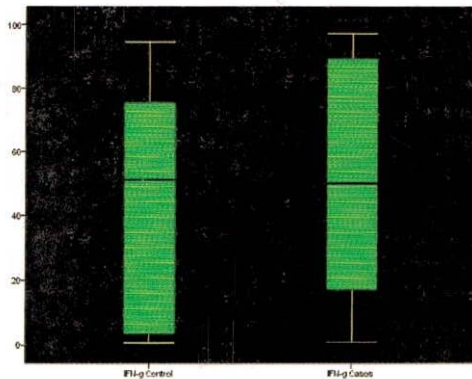


Figura 2a. Valores promedio interferón gamma en casos y controles

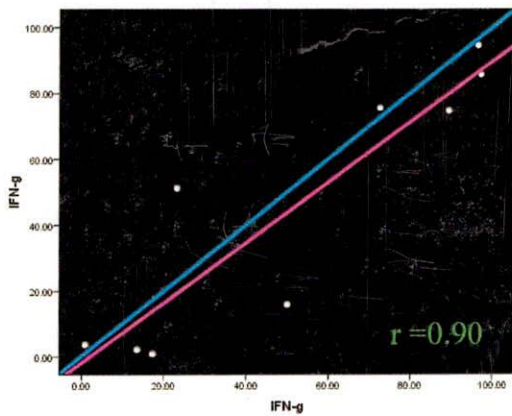


Figura 2b. Correlación de muestras relacionadas entre interferón gamma casos y controles

Tabla 1. Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1 IL-4 Control	43.6	9	28.9	9.6
IL-4 Casos	51.1	9	32.0	10.6
Par 2 IFN-g Control	44.8	9	39.2	13.0
IFN-g Casos	51.1	9	38.6	12.8

Tabla 2. Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación (r)	Sig.
Par 1 IL-4 Control y IL-4 Casos	9	0.80	0.009
Par 2 IFN-g Control y IFN-g Casos	9	0.90	0.001

Tabla 3 Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas							
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
				Inferior	Superior			
Par 1 IL-4 Control IL-4 Casos	-7.4	19.1	6.3	-22.1	7.2	-1.1	8	0.2
Par 2 IFN-g Control IFN-g Casos	-6.2	17.2	5.7	-19.5	6.9	-1.0	8	0.3

DISCUSION

Existen múltiples factores etiológicos como bacterias, injuria mecánica y biomateriales dentales que inducen a la liberación de citoquinas inflamatorias como mecanismo de respuesta pulpar ^{22,6,9,27,15,11,26,13,12}

Se ha reportado en varios estudios ^{22,6} reacciones inflamatorias pulpares leves encontrando que hay una fuerte relación entre los niveles de inflamación pulpar con la infiltración de bacterias ²² y es más intensa cuando están más cerca a la pulpa, debido a la injuria pulpar presente por el paso de las bacterias (*Streptococo Mutans*) a través de los túbulos dentinales, mostrando la presencia de interferón gamma (27%) e IL4 (19%) obtenidas en cavidades con caries poco profundas ⁶.

Así mismo, existen estudios que reportan diferentes respuestas inflamatorias pulpares ante la utilización de biomateriales dentales ^{11,26,13}. El ionómero de vidrio tiene un potencial de toxicidad pulpar cuando es colocado sobre la dentina intacta, demostrando una baja toxicidad en tales circunstancias. Los ionómeros de vidrio no parecen ser materiales deseables para la colocación directa sobre el tejido pulpar. Se recomienda la colocación de hidróxido de calcio como protector pulpar. ¹¹. Estudios realizados por Sidhu y Watson ²⁶ mencionan que los ionómeros de vidrio con una pequeña adición de resina como hidroxietil metacrilato (HEMA) contiene grupos no saturados lo cual los hacen carecer de biocompatibilidad e histopatológicamente producen reacciones pulpares poco aceptables. Además Jontell y col. ¹³ afirmaron que es la acidez de los materiales la que contribuye para el efecto citopático de los mismos.

En el presente estudio se observó que al colocar ionomero de vidrio como base intermedia en cavidades clase V se presentó una variabilidad mostrando aumento o disminución en la liberación de IL-4 e IFN- γ . Esta variabilidad pudo ser debido a varios factores como diferencias en el espesor del

punteo dentinal remanente, el cual no fue estandarizado viéndose influenciado por la morfología de la estructura dentaria y la respuesta inmunológica de cada participante, limitando su comparación con otros estudios.

Un estudio in vivo previo demostró que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la liberación de IL-6 e IL-8 al utilizar el ionómero de vidrio como base intermedia ¹⁵. En el presente estudio aunque se observó una variabilidad en la liberación de IL-4 e IFN- γ no se encontró diferencia estadísticamente significativa corroborando los resultados encontrados por Mejía y col. ¹⁵, lo que demuestra que el ionomero de vidrio como base intermedia tiene una biocompatibilidad aceptable y produce una irritación pulpar leve. Resultados similares en premolares humanos fueron reportados por ², encontrando una respuesta pulpar de leve a moderada

Así mismo, Costa 1996 y Tarim 1988 ^{8,27}, demostraron que los ionómeros de vidrio aplicados en cavidades profundas clase V de ratas y monos respectivamente en periodos de experimentación cortos (3 a 7 días) originan reacciones inflamatorias leves, proceso que fue resuelto a través de periodos experimentales intermedios y largos; razones por las cuales puede decirse que tiene una aceptable compatibilidad biológica siendo irritantes leves para el complejo pulpo-dentinal. Del mismo modo Cooper ⁷, observó que el ionómero de vidrio causa reacciones inflamatorias intensas en periodos cortos (más o menos 16 días) en su mayoría resueltos en periodos de experimentación largos.

Holand y col. ¹², realizaron un estudio en perros, encontrando que el ionómero de vidrio presentó una respuesta leve en un periodo experimental largo (180 días). Mientras que Tobías y col. ²⁸, encontró presencia de respuesta inflamatoria durante un periodo experimental corto (14 días), en tanto que en el periodo experimental intermedio (28 días) en la mayoría de los especímenes el proceso inflamatorio revirtió,

y en el período experimental largo (1 año) el proceso se detuvo.

Es importante aclarar que en el presente estudio las preparaciones cavitarias fueron estandarizadas. Sin embargo, no se valoró el grosor de remanente dentinal de las muestras. Este factor puede producir efectos en los hallazgos emitidos en este estudio. Se recomienda la utilización de microtomografía computarizada para estudios posteriores.

Se presentaron eventos críticos en dos de las muestras debido a un retardo en el tiempo de evaluación de estas, lo cual produjo disminución en la supervivencia celular, mostrando una elevación en los niveles de IL-4 e IFN- γ relacionado posiblemente a la respuesta del sistema inmunológico de cada paciente, donde es posible un aumento o disminución en la liberación de citoquinas como mecanismo de respuesta celular.

CONCLUSION

La liberación de IL-4 e IFN- γ evaluada al colocar ionómero de vidrio durante este estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales y grupo control, por lo que se recomienda su utilización como base intermedia en cavidades clase V no mayores a 2mm de profundidad.

El comportamiento del ionomero de vidrio al ser utilizado como base intermedia demostró baja citotoxicidad, protección pulpar y menor irritabilidad del tejido de acuerdo al comportamiento variable observado en la liberación de IL-4 e IFN- γ como respuesta pulpar.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios donde el tiempo de exposición del ionómero de vidrio sobre la pulpa dental sea más prolongado determinando los niveles de liberación de la IL-4 e IFN- γ .

Llevando a cabo la misma metodología aplicada en este estudio valorar en futuras investigaciones la liberación de Interleuquinas en cavidades clase I y clase II y en distintos grupos etéreos.

Realizar estudios con grupos comparativos en dientes con pulpas sanas y con compromiso pulpar.

Se recomienda incluir la variable en cuanto al remanente dentinal que no puede ser obtenido radiográficamente, por lo cual se sugiere la utilización de microtomografía computarizada.

Realizar estudios donde el diente control no se le realice ningún procedimiento para determinar los promedios de las medidas basales y poder compararlos con la reacción inflamatoria inicial como respuesta pulpar mediante la cuantificación de la liberación de citoquinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abul k. Abbas. Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober. Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias. Abbas Immunology .2005.
2. About I. Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Pulpal inflammatory responses following noncarious class V restorations. Oper Dent 2001; 26 (4): 336-42.
3. About J, Murray PE, Franquin J, Remusat M, Smith AJ. The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers dental repair. Journal of dentistry. 2001; 29: 109-117.
4. Athanasia Bletsas, Ellen Berggreen, Frige fristad, Olav tenstad and Helge Wiig. Citokine signaling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during lipopolysaccharide induced acute inflammation, J physiol 573.1 2006 pp 225-236.
5. Brannstrom. Physiologic overview. Vol 12 No. 10 October 1986.

6. Chin Lo CHahn, Al M Best, John G tew. Cytokine induction by streptococcus mutans and pulp pathogenesis. infection and immunity vol 68, N° 12 pp 6785-6789 – 2000
7. Cooper IR. The response of the dental pulp to glass ionómero cement. *Int Endod* 1980; 13 (2): 76-88.
8. Costa et al, Avaliacao preliminar, Comparativa da capacidade de reparacao do tecido conjuntivo subcutáneo de ratos ao implante de um adhesivo dentinario e um cimento de hidróxido de calcio. *Rev. Cent. Est. Fac Odont. UFRJ* 1996; 2(2) 52-57
9. Dasilva Renata, Cilense A, Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment. *Brazilian Dental Journal*, 17; 2.2006.
10. Digka A, Lyroudia K, Jirasek T, Kasampalidis I, Karayannopolou G, Kubinova L. Visualization of human Dental Pulp Vasculature by Immunofluorescent detection of CD34: A comparative Study. *Australian Endodontic journal*, 32; 101-106. 2006
11. Hume W.R and G.J Mount In vitro studies on the potential for pulpar citotoxicity of Glass - Ionomer cements *J Dent Res* 67(6);915 – 918 Junio 1988.
12. Holland Jr. Takayama S. Russo M. Komatsu J. Sasaki T. Quintella L. Pulpal response to a glass ionomer cement histological study in a dog. *Rev. Fac. Odontol. Aracatuba*, 1978; 7(2): 133-37
13. Jonteel M Hanks CT, Bratel J. Bengerholtz G. Effects un polymerized resin components on the function of accesoru cell derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res*. 1995;74(5), 1162-67.
14. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *Journal of endodontics*, 16, 48- 53. 1990.
15. Mejia JR et all. Determinacion de la liberacion de IL-6 e IL-8 en pulpas dentales humanas despues de la utilizacion de ionomero de vidrio como base intermedia. *Mongrafia COC* 2008
16. Mjor IA. The morphology of dentin and dentinogenesi. En: Linde, A, Boca Raton, Fla:CR Press 1984.
17. Min Kyung, Kwon Y, Lee H. Effects of Proinflammatory Cytokines on Expression of mineralization Markers and Heme Oxygenase. *Journal of Endodontics* , 32; 1.2006
18. Murray P, About I, Lumley P, Franquin J, Remusat M, Smith A. Human odontoblastst cell numbers after dental injury. *Journal of Dentistry*. 2000; 28: 211-285
19. Murray P, Hafeez A, Smith A, Cox C. Bacterial Microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dental materials*, 18; 470-478.2002.
20. Murray P, About I. Restorative pulpal and repair responses. *JADA* 132:4. 2001
21. Pashley DH, Dentin permeability, dentin sensitivity and treatment through tubule occlusion. *Physiologic overview*. Vol 12 No. 10 October 1986.
22. Plant CG. Browne RMm Knibbs PJ. Britton SS. Sorohan T. Pulp effects of glass ionómero cemenst. *Int Endod J*. 1984; 17(2): 51-59.
23. Stanley hr, Swerdlow h. reaction of the human pulp to cavity preparation: results produced by eight different operative grinding technics. *j am dent assoc*. 1959; 58: 49-59
24. Seltzer and Bender, Dental pulp, quintenssence, 2002. cap 11, molecular mediators of pulpal inflammation.
25. Schedle A. Franz A, Rausch-Fan X. Cytotoxic Effects of Dental Composites, Adhesive substances, Compomers and Cements. *Dental Material*, 14; 429-440. 1998
26. Sidhu SK. Watson TF. Resin-modified glass ionómero materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J. Denta* 1995; 8(1): 59-67.
27. Tarim B. Hafez A. Cox CH. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. *Quintessence Int* 1998; 29 (8): 535-42.
28. Tobias et al. Pulpal response to a glass ionmer cement. *Br. Dent J*. 1978; 144:35-50.