



Institución
Universitaria
COLEGIOS
de Colombia
UNICOC
COLEGIO ODONTOLÓGICO

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE IL- 6 E IL- 8 EN PULPAS DENTALES DESPUES DE UTILIZAR IONOMERO DE VIDRIO COMO BASE INTERMEDIA

Coral C., Cortes J., Enciso D., Gómez M., Mejía J., Polanco M., Ruíz V.*

Chamorro V.**

Hurtado, C.***

López, C.****

Modalidad Oral
Categoría Postgrado

RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en pulpas dentales humanas expuestas al tratamiento con ionomero de vidrio como base intermedia. **Materiales y métodos:** Ensayo clínico controlado aleatorizado ciego, en 22 dientes de 11 pacientes de la clínica de postgrado de Ortodoncia y Ortopedia. Los criterios de inclusión: sujetos con edad entre 14 y 25 años, dientes premolares sanos, con ápices cerrados, para exodoncia con fines ortodónticos. Se excluyeron pacientes sistémicamente comprometidos. Las variables fueron valores de liberación de Interleuquina, exposición al tratamiento con ionómero de vidrio. Se realizó asignación aleatoria, 11 dientes para grupo experimental y 11 para grupo control. La presencia de las interleuquinas se observó mediante de citometría de flujo con isotipos específicos marcados con fluorocromo. El análisis estadístico fue mediante prueba t - student para datos pareados, $p \leq 0.05$, coeficiente de correlación y concordancia. **Resultados:** En las 22 pulpas se observó en promedio mayor liberación de IL-6 en casos (59.6%), en controles (57.4%). En IL-8 en casos (2.9%) y en controles (3.7%). No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La aplicación de Ionómero de vidrio como base intermedia no incremento la presencia de citoquinas. Hubo correlación en IL-6 entre el caso y el control ($r=0.90$). **Conclusiones:** Se observó, en las 22 pulpas estudiadas, que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados. Hubo mayor liberación de IL-6, que no se incremento al aplicar el ionómero de vidrio como base intermedia.

Palabras claves: Pulpa dental, IL-6, IL-8, Inflamación, Ionómero de vidrio, Citotoxicidad

ABSTRACT

Objectives: To determine proinflammatory cytokines release IL-6 and IL-8 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 exodontias for orthodontic purposes. Systemically compromised patients were excluded. The variables were interleukin release values, exposure to treatment with glass ionomer, 11 teeth in the experimental group and 11 in the control group were randomly assigned; The presence of interleukin was observed by means of flow cytometry with fluorochrome marked specific isotypes; The Statistical Analysis was carried on by means of Student's T test for paired data, $p \leq 0.05$, concordance correlation coefficient. **Results:** In the 22 pulps most of the release of IL-6 was seen on average in the cases (59.6%), and in controls (57.4%). IL-8 in cases (2.9%) and in controls (3.7%). There were not statistically significant differences between the groups. The application of glass ionomer as a liner didn't increase the presence of cytokines. There was a correlation in IL-6 between the case and the control ($r=0.90$). **Conclusions:** It was observed in the 22 pulps under study, that there were not statistically significant differences between the evaluated groups. There was a mayor IL-6 release, which was not increased by the glass ionomer application as an intermediate base.

Key words: Dental pulp, IL-6, IL-8, Inflammation, Glass ionomer, Cytotoxicity

*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 inmune¹. La pulpa contiene todos los componentes para producir una respuesta de defensa a diferentes estímulos, incluyendo la inflamación pulpar². La respuesta se caracteriza por la acumulación de células como macrófagos y leucocitos polimorfos nucleares, las cuales liberan sustancias mediadoras que inducen una respuesta inflamatoria aguda en el diente.³

Durante los procesos de infección, inflamación y cicatrización la prostaglandina E2 (PGE2) es uno de los mediadores que se liberan a nivel celular de la pulpa, participando en el incremento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y dolor.⁴ La formación de PGs a partir del ácido araquidónico es catalizado por las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Se ha observado que en tejido pulpar inflamado los fibroblastos y macrófagos expresan proteínas de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) responsable de la producción de PGE2, adicionalmente la COX-2 es estimulada por sustancias como las citoquinas pro inflamatorias.⁵

Es conocido que la reacción biológica normal de la pulpa dental ante una injuria genera inflamación además de la liberación de sustancias celulares induciendo una respuesta de defensa.⁶ Dentro de estas sustancias se encuentra la IL-6 que es una citoquina con actividad pleiotropica que puede ser producida por diferentes células como son: Linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y osteoblastos. La función principal de la IL-6 es la regulación de la respuesta inmune induciendo la diferenciación de las células B en células productoras de plasma y anticuerpos, además de activar células T las cuales expresan el receptor de IL-2 en la superficie celular, induciendo hematopoyesis y la subsiguiente leucocitosis; sin embargo, estas reacciones pueden salirse de control durante los procesos de inflamación y por consiguiente ocasionar la destrucción del tejido; de otra parte, en la pulpa humana inflamada se

producen altos niveles de IL-6, comparados con pulpas sanas.⁷

La IL-8 es otra citoquina que esta considerada como factor quimiotactico para Neutrofilos humanos; células como monocitos y macrófagos la secretan en respuesta de agentes pro-inflamatorios, en vista de esto, un incremento en su producción es observado en pulpitis irreversible y muy poca cantidad se encuentra presente en pulpas normales.⁴

En la actualidad el propósito de la odontología es solucionar los diferentes tipos de problemas de origen patógeno, en los cuales, es necesario realizar múltiples tratamientos restaurativos, siendo importante considerar que estos tratamientos provocan una respuesta inflamatoria, por lo cual, se han mencionado las bases intermedias como agentes protectores de la pulpa dental ante una injuria.⁸

El grosor del remanente dentinal (RDT) bajo preparaciones cavitarias ha sido materia de debate en cuanto a modificar la respuesta pulpar ante el uso de materiales dentales, al respecto, Pameijer y col. en 1991 reportaron que el RDT de 1mm o más puede ser suficiente para proteger los tejidos pulpares de los efectos citotóxicos como Ionómero de Vidrio con resina modificada. Stanley en 1994 sugirió que el RDT de 2mm protege la pulpa de injurias causadas por procedimientos y materiales restaurativos.¹⁰

Dentro de estos materiales, el Ionómero de vidrio se asocia a una irritación pulpar o posible necrosis pulpar debido a la reacción ácido base que se produce durante los primeros 10 minutos.^{11, 12}

Los cementos de Ionómero de vidrio y resina modificada (RMGICs) son materiales híbridos los cuales presentan una reacción ácido base y además presentan polimerización a través de radicales libres ya que contiene grupos de metacrilato polimerizable.¹³ Pueden presentar variaciones en su composición por su diferencia comercial, encontrando Ionómeros de vidrio con fluoro aluminio silicato y solución acuosa de un copolímero de acrílico y ácido maleico, 2-hidroxi-etil metacrilato (HEMA), agua y activadores. Algunos RMGICs presentan su composición libre de HEMA, y al utilizar

el ácido amino amifílico en lugar de HEMA se observa mayor biocompatibilidad con los tejidos dentales.¹³

Finalmente, 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 bacterias.¹⁴

Con base a lo anterior, el objetivo de esta investigación, es determinar la presencia de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8, en pulpas de dientes humanos posterior a la utilización del ionómero de vidrio como base intermedia.

La hipótesis nula del estudio es que no existen diferencias estadísticamente significativas en el aumento en la expresión de citoquinas en el tejido pulpar de dientes humanos utilizando ionómero de vidrio como base intermedia.

MATERIALES Y METODOS

Ensayo clínico controlado aleatorizado ciego. A partir de 38 dientes obtenidos de pacientes del postgrado de Ortodoncia y Ortopedia del Colegio Odontológico, se seleccionaron 22; que por asignación aleatoria fueron distribuidos, 11 dientes en el grupo experimental y 11 para el grupo control para evaluar la liberación de IL-6 e IL-8. Los criterios de inclusión fueron pacientes entre 14 y 25 años que autorizaron donar para el estudio los premolares que fueran extraídos con fines ortodónticos. Los dientes fueron premolares sanos con ápices cerrados; se excluyeron pacientes sistémicamente comprometidos. Dentro de las variables del estudio se trataron los valores de liberación de citoquinas, exposición al tratamiento con ionómero de vidrio. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional que de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia es clasificada sin riesgo.

Se evaluó la concordancia en la técnica y las observaciones intraobservador, tanto en el cirujano como en los operadores que realizaron las aperturas y disección en dientes naturales extraídos. La prueba piloto se realizó en el primer paciente en cavidad oral, tomada la muestra se llevó al laboratorio donde quedó programado el

clitómetro de flujo para la prueba experimental.

A los pacientes se les tomó radiografía periapical y en los premolares a tratar se realizó cavidad clase V, a una profundidad de 2x3mm. Que se corrobora con una sonda periodontal.

Los 22 dientes seleccionados fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimental y control. Los grupos fueron: el grupo 1: control (11 dientes) sin ionómero de vidrio, el grupo 2 experimental (11 dientes): con ionómero de vidrio. Para iniciar con los procedimientos se utilizó anestesia sin vasoconstrictor pricanest 3% felipresina; se realizó aislamiento del campo operatorio y se procedió a realizar la cavidad clase V con dimensiones de 2mm de profundidad y 3mm de ancho en ambos grupos, utilizando una pieza de mano de alta velocidad de triple irrigación (Kavo) y con fresa redonda de diamante #2, se procede a la colocación del ionómero de Vidrio (Vitremmer 3M), en el diente experimental, esperando 10 minutos para realizar la exodoncia.

En el diente control se realiza el mismo procedimiento sin ionómero de vidrio. Obtenida la muestra se secciona el diente con fresa zecrya, llevando con cucharilla el tejido pulpar expuesto al medio de transporte TransFix. Seguidamente se realiza la disgregación de la pulpa con mango de bisturí y hoja No. 15 en caja de petri, recolectando la muestra de 1 ml y transfiriéndola al medicon (Consul TS, Orbassano, Italy), para ser disgregado mecánicamente en el Medimachine (Consul TS, Orbassano, Italy) en 2 ciclos cada uno de 1 min. Se recolectaron las células por centrifugación ya disgregadas se resuspendieron en 300 µl de solución fijadora (eBioscience); este volumen fue alicueteado en 3 tubos de polipropileno 12x75 (100 µl por tubo), correspondiendo a el tubo 1: células sin marcar; tubo 2: control isotipo; tubo 3: Anti FITC IL-8 y Anti PE IL-6. Se incubaron los tubos en esta solución por 20 min. a temperatura ambiente, posteriormente a los tubos 2 y 3 se les retira el sobrenadante y se les adiciona solución de permeabilización (1:10, eBioscience), durante 5 min. e incubándolos a temperatura ambiente, se recolectaron por centrifugación y se adiciona nuevamente a cada tubo 100 µl de la misma solución y se procedió a marcar

con los fluorocromos; al tubo 2 se le adicióno 3 µl de los isotipos control IgG-FITC e IgG PE, mientras que al tubo 3 se le agrego 3 µl de Anti FITC IL-8 y 2 µl de Anti PE IL-6. Igualmente a los 3 tubos se les adicióno 7AAD para determinar la viabilidad celular de la muestra, estos tubos se incubaron 20 min. a temperatura ambiente y en oscuridad; se hizo 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).

PROCESAMIENTO Y ANALISIS

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 (CCC).

RESULTADOS

Las siguientes figuras representan el comportamiento de las muestras analizadas mediante el Citómetro de flujo: la Fig.1 y 2 nos muestra la población de células sin marcar sobre la cual se selecciono la población a estudiar viendo su comportamiento por tamaño y complejidad. En la Fig.3 se observa una viabilidad 86.86%, determinando la celularidad de la muestra control. La Fig.4 en la muestra control se observa en el Gate 3 la población mas para IL-8 intracitoplasmática con un 4.69% de positividad. La Fig.5 en la muestra control en el Gate 4 se observa la población con un 3.26% de viabilidad celular y en la Fig. 6. se observa en el Gate 4 la población positiva con un 29.5% en la muestra experimental.

(NOTA ACLARATORIA: Sin marcar indica que no tiene ninguno de los isotipos de los reactivos)

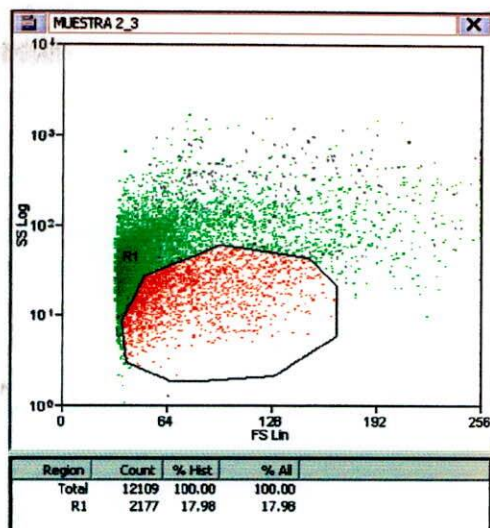


Fig.1 Población de células sin marcar

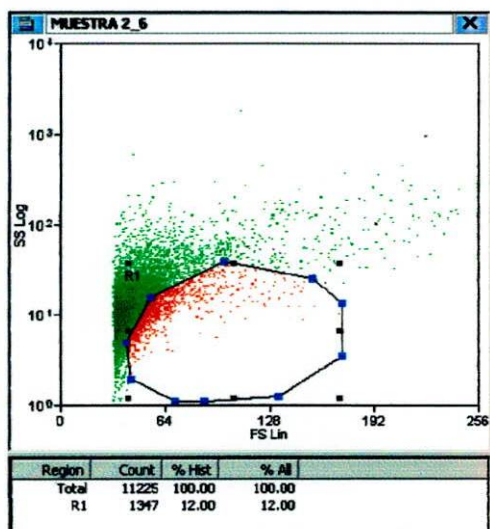


Fig.2 Población celular muestra experimental

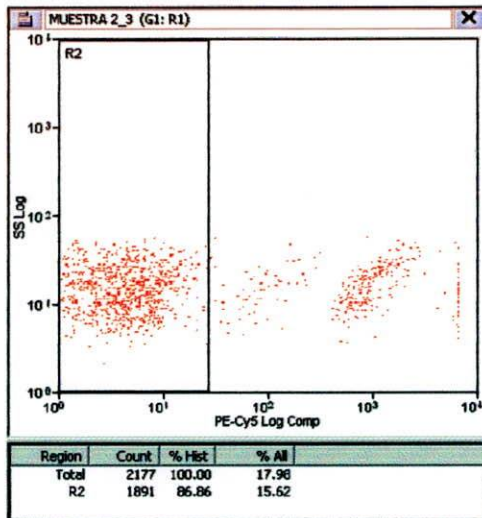


Fig.3 Determinación celular muestra control

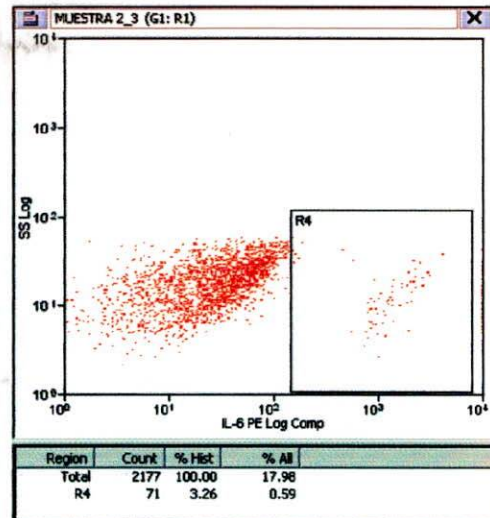


Fig.5 Determinación muestra control en el Gate 4

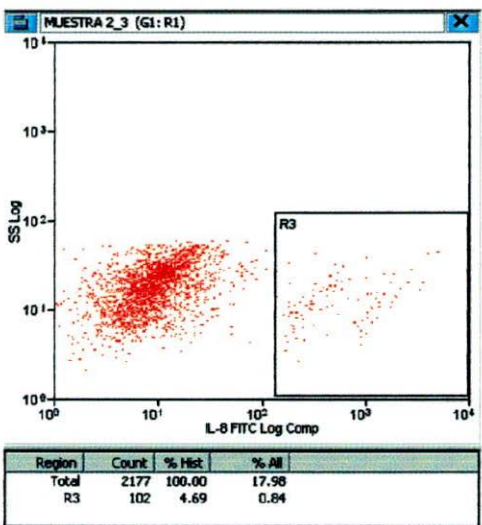


Fig.4 Determinación muestra control en Gate 3.

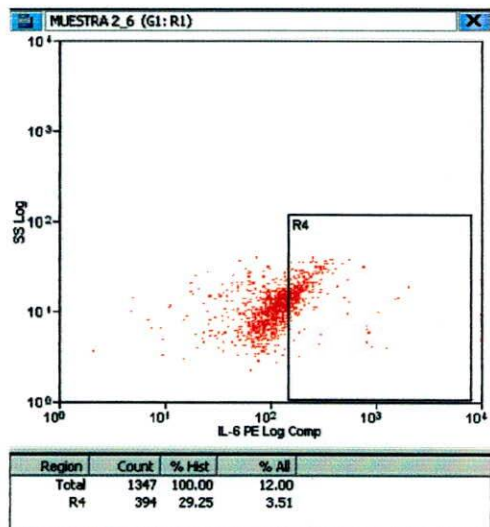
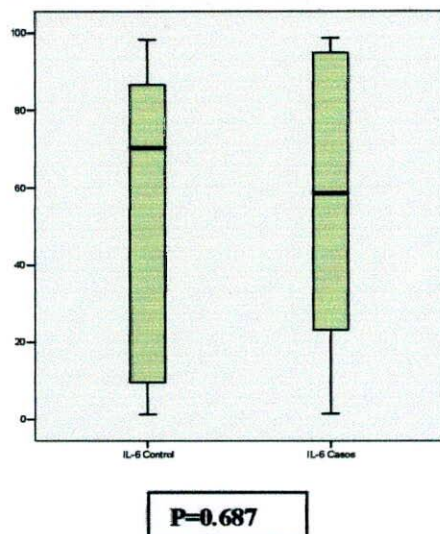


Fig. 6. Determina muestra experimental en Gate 4

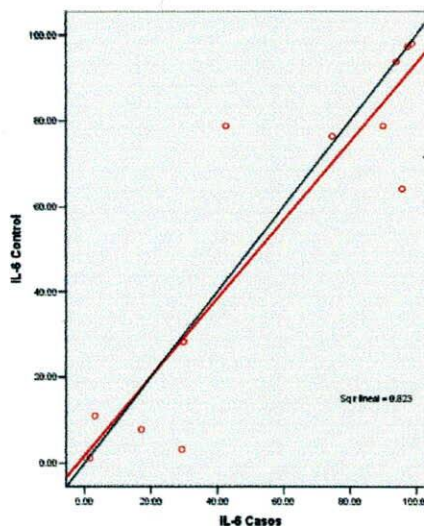
De las 22 pulpas evaluadas, la IL-6 mostro un ($p= 0.687$) y IL-8 ($p=0.625$) en ambos grupos, tanto experimental como control.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el aumento de IL-6 en el grupo experimental al comparar con el grupo control (Grafica 1).

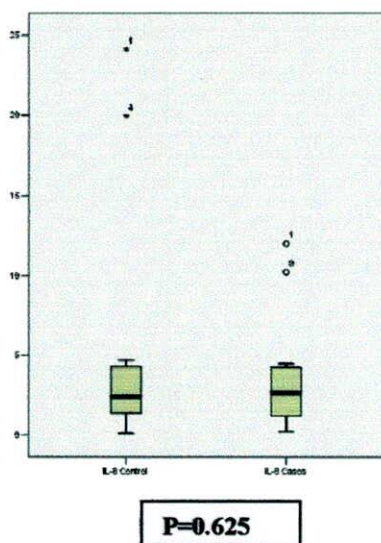
Grafica 1. Prueba T- Student para valores de IL-6 – grupo control y casos.



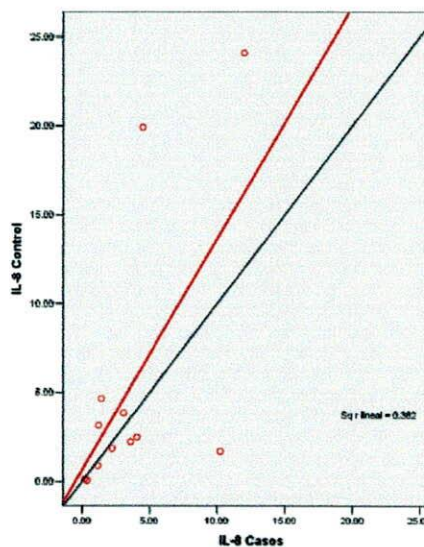
Grafica 3. Correlación muestras experimentales y controles IL-6 r=0,823



Grafica 2. Prueba T- Student para valores de IL-8 – grupo control y casos.



Grafica 4. Correlación muestras experimentales y controles IL-8 r=0,382



La IL-8 se libero en menor porcentaje con respecto a la IL-6 en los grupos. La prueba de correlación y concordancia CCC para la IL-6 tuvo un valor $r=0.823$ (Grafica 3), lo que indica que no hubo concordancia entre grupo experimental y control, igualmente sucedió en la prueba de los dos grupos con IL-8 donde el valor $r=0.382$ (Grafica 4).

DISCUSION

Zse Kwan y col, mencionan que la IL-6 se aumenta en procesos inflamatorios y se libera en poco porcentaje en pulpas clínicamente sanas.⁷

Se ha reportado en la literatura la acción de los materiales dentales sobre el proceso inflamatorio causando en algunos casos injuria sobre el tejido pulpar. Los materiales dentales presentan una actividad química que es causa de inflamación pulpar, relacionado con una alta permeabilidad dentinal, característica propia de la estructura dental¹⁵

El presente estudio en dientes con preparaciones cavitarias con y sin ionómero mostró que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles de cada muestra de IL-6 e IL-8, esto posiblemente debido a que no existe un aumento en la liberación de citoquinas en el tejido pulpar de dientes humanos, aplicando RGICs, esto, podría explicarse por los procesos basales de tipo reversible presentados fisiológicamente en la pulpa ante una injuria.

Es importante aclarar que 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.

Eventos críticos fueron presentados en dos de las muestras debido a una elevación en los niveles de IL-6, relacionado posiblemente a la respuesta del sistema inmunológico de cada paciente, donde es factible un aumento o disminución en la respuesta celular.

La IL-8 presentó menos liberación, diferente a lo reportado en estudios previos como el estudio de Isett J y col. en 2003, entre otros, en los que se muestra niveles más altos de IL-8, esto debido a que los dientes fueron diagnosticados con pulpitis irreversible en esos estudios.

CONCLUSIONES

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-8 presenta menos variación y dispersión en sus valores en los resultados

No hubo diferencia estadísticamente significativa en los grupos de controles y casos en la IL-6 e IL-8

El uso del ionomero de vidrio puede ser utilizado como protector pulpar por sus bajos niveles de citotoxicidad

RECOMENDACIONES

Los investigadores recomiendan realizar estudios donde el tiempo de exposición de la pulpa sobre el ionómero de vidrio sea más prolongado determinando los niveles de liberación de la IL-6 e IL-8

Realizar estudios con grupos comparativos en dientes con compromiso pulpar.

Se recomienda incluir las variables en cuanto al remanente dentinal que no pueden ser obtenidas con radiografía.

REFERENCIAS

1. Digka A y col. Visualization of human Dental Pulp Vasculature by Immunofluorescent detection of CD34: A comparative Study. Australian Endodontic Journal, 32; 101-106. 2006.
2. Seltzer and Bender. Molecular Mediators of Pulpal Inflammation Dental Pulp, Quintessence, 2002. Cap 11.
3. Min K y col. Effects of Proinflammatory Cytokines on Expression of mineralization Markers and Heme Oxygenase. Journal of Endodontics, 32; 1, 2006.
4. Isett J y col. Effect of intraosseous injection of Depomedrol on Pulpal concentrations of PgE-2 and IL-8 in Untreated Irreversible Pulpitis. Journal of Endodontics, 29; 4. 2003.
5. Chang Y y col, Proinflammatory Cytokines Induce Cyclooxygenase- 2m RNA and Protein Expression in Human Dental Pulp cell cultures. Journal of Endodontics, 29; 3. 2003.
6. Pezelj-Ribaric S y col, Detection of tumor necrosis Factor Alpha In Normal

- and Inflamed Dental Pulp. Archives of Medical Research, 33; 482-484. 2002.
7. Sze Kwan y col. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by Cytokines through Prostaglandine-Dependent and independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. Journal of Endodontics. 28; 3, 2002.
 8. Dasilva R y col, Surface Roughness of Glass Ionomer Cements Indicated for Atraumatic Restorative Treatment. Brazilian Dental Journal, 17; 2.2006.
 9. Mjör I y col, Pulp dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. Quintessence International, Vol 33, No. 1, 2001.
 10. Murray P y col, Bacterial Microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. Dental materials, 18; 470-478.2002.
 11. Crisp S y Wilson A. col, Reaction in Glass Ionomer Cements: Decomposition of the powder. London national research Development Corporation august 17, 1973.
 12. Smith DC and Ruse ND. Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. JADA, 112: 654-657. 1986
 13. Xie D y col, An Amino Acid-modified and non- HEMA containing Glass-Ionomer Cement. Biomaterials, 25; 1825-1830. 2004
 14. Murray P, Hafeez A, Smith A, Cox C. Bacterial Microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. Dental materials, 18; 470-478.
 15. Souza C, Giro E, Batista A, Teixeira H. Short- term evaluation of pulpo-dentin complex response to a resine modified glass ionomer cement and bondig applied in deep cavities. Dental materials, 19; 739-746. 2003

DIRECCIONES ELECTRONICAS

dra_johana@hotmail.com
marthiica@hotmail.com
joika12@hotmail.com
dianaencisov@hotmail.com
dr.juliomejia@gmail.com
mdm_80@hotmail.com
dra.vickycita@hotmail.com